

**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**

**平成25～27年度 総合研究報告書**

**研究代表者 小田切孝人**

**平成28年(2016)3月**

# 目 次

平成 25~27 年度

## I. 総括研究報告書

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

研究代表者： 小田切孝人 \_\_\_\_\_ P1

## II. 分担研究報告書

1. インフルエンザウイルス検査研究体制における地方衛生研究所間及び国立感染症研究所との連携強化に関する研究

皆川洋子 \_\_\_\_\_ P19

研究協力者：高橋雅輝、齋藤幸一、長島真美、新開敬行、原田幸子、林 志直、秋場哲哉、貞升健志、森川佐依子、廣井 聡、加瀬哲男、戸田昌一、調 恒明、山下育孝、四宮博人、芦塚由紀、吉富秀亮、千々和勝己、駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、川上千春、宇宿秀三、森田昌弘、小淵正次、滝澤剛則、岡山文香、三好龍也、内野清子、田中智之、喜屋武向子、久場由真仁、仁平稔、安井善宏

2. インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)第 1~3 回全国地衛研外部精度管理(EQA)実施結果について

影山努 \_\_\_\_\_ P27

研究協力者：高山郁代、中内美名、高橋 仁

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

今井正樹 \_\_\_\_\_ P99

研究協力者：渡邊真治、岸田典子

4. 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

佐藤裕徳 \_\_\_\_\_ P105

研究協力者：横山勝、伊藤公人

5. 遺伝子解析による変異検出と進化系統樹解析  
藤田信之 \_\_\_\_\_ P111  
研究協力者：小口晃央、花巻朝子、大下龍蔵
6. 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行に関する研究  
高下恵美 \_\_\_\_\_ P119
7. 2013-14年シーズンのインフルエンザワクチンの血清学的評価  
齋藤玲子 \_\_\_\_\_ P123  
研究協力者：日比野亮信、菖蒲川由郷、近藤大貴、樋熊紀男、高橋キイ子
8. 成人層および高齢者層に対する2014-15年季節性インフルエンザワクチン接種後の抗体価反応  
齋藤玲子 \_\_\_\_\_ P131  
研究協力者：近藤大貴、菖蒲川由郷、日比野亮信、八神錬、尾ヶ井マサヨ、樋熊紀男
- III . 研究成果の刊行に関する一覧表** \_\_\_\_\_ P139

## 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 Nastri, Edith F Puruhito, 横  
田(恒次)恭子, 西村 研吾, 影山 努, 高  
原 悠佑, 堀田 博, 清水 一史.  
Comparative analysis for the  
detection of avian influenza H5N1  
virus by using a novel luminescence  
analyzer(POCube) and real-time RT-PCR.  
第62回日本ウイルス学会学術集会. 横浜.  
2014年11月
  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

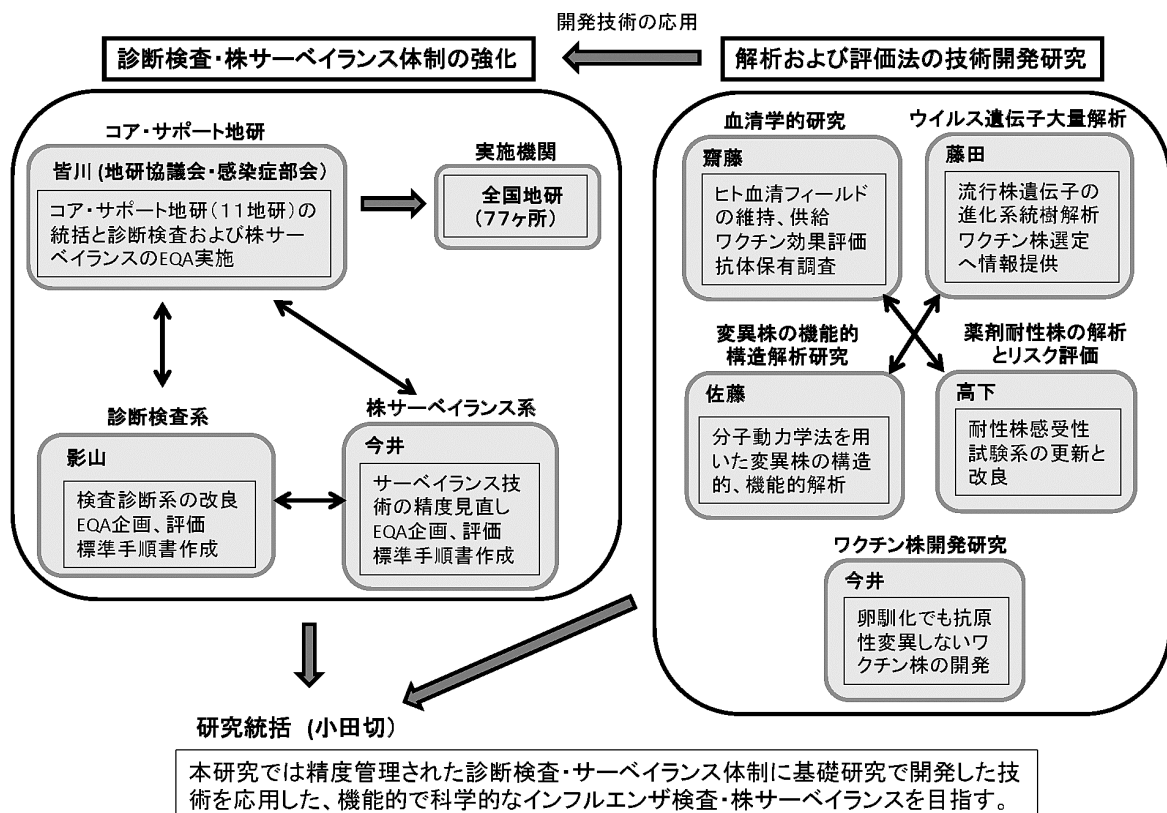
- PCRによる薬剤耐性H1N1pdmの検出系の構築と改良
- 計算科学を応用して、ウイルスリスク評価系の構築、サーベイランスへの応用

- 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

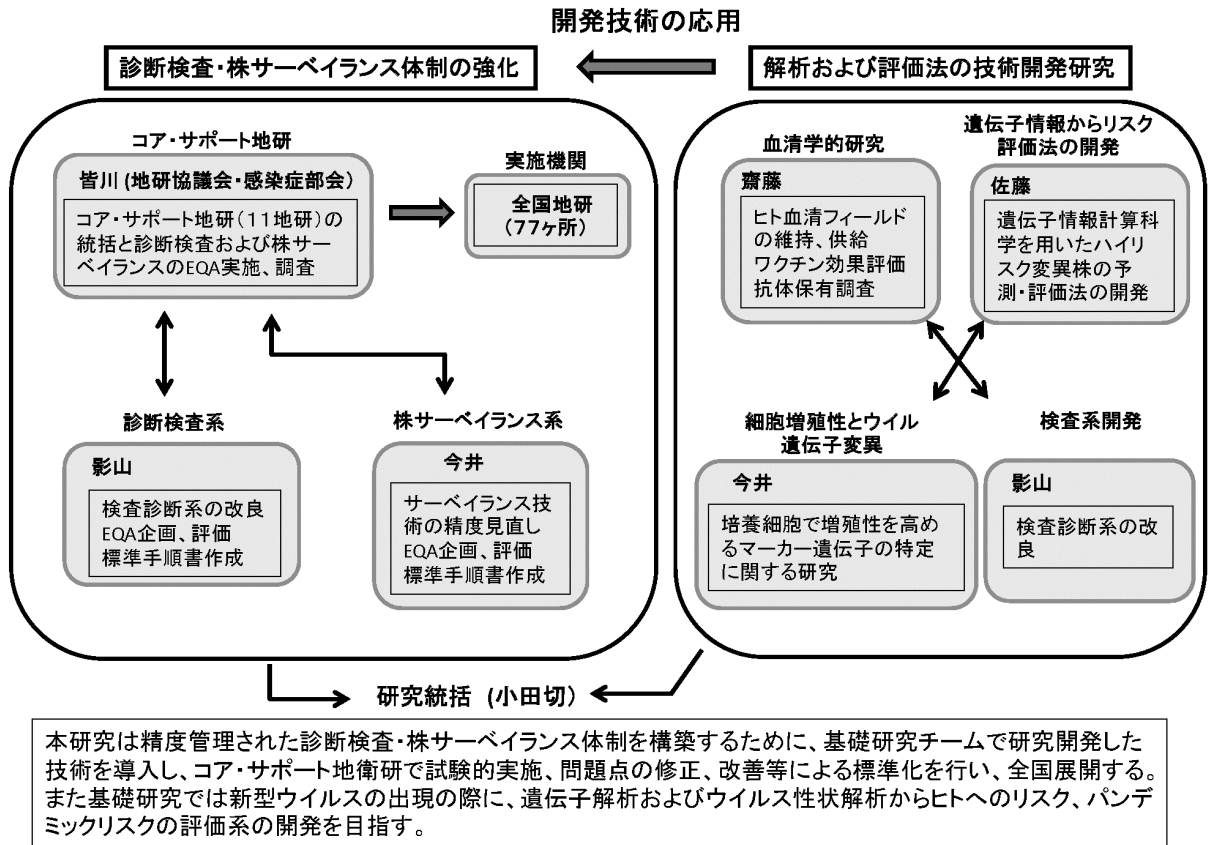
研究開発パート

- 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

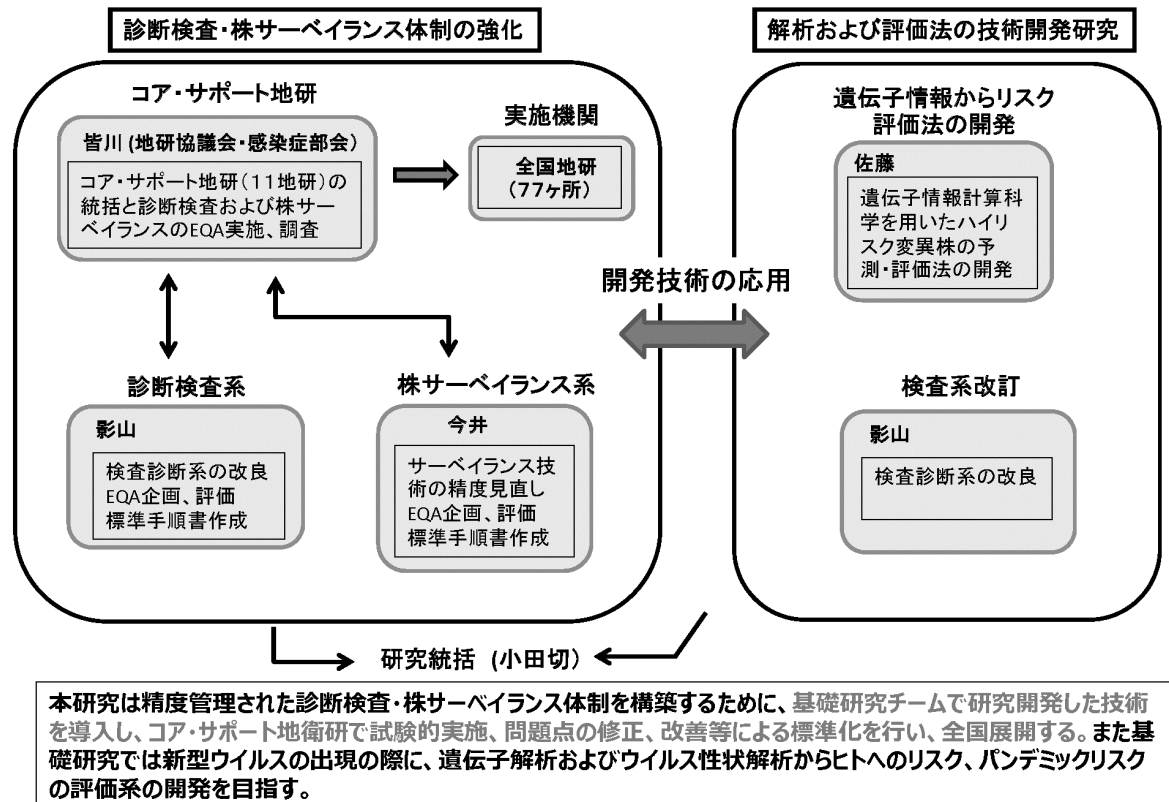
## 研究項目の概要と役割分担および相互関連（H25年度）



## 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%)

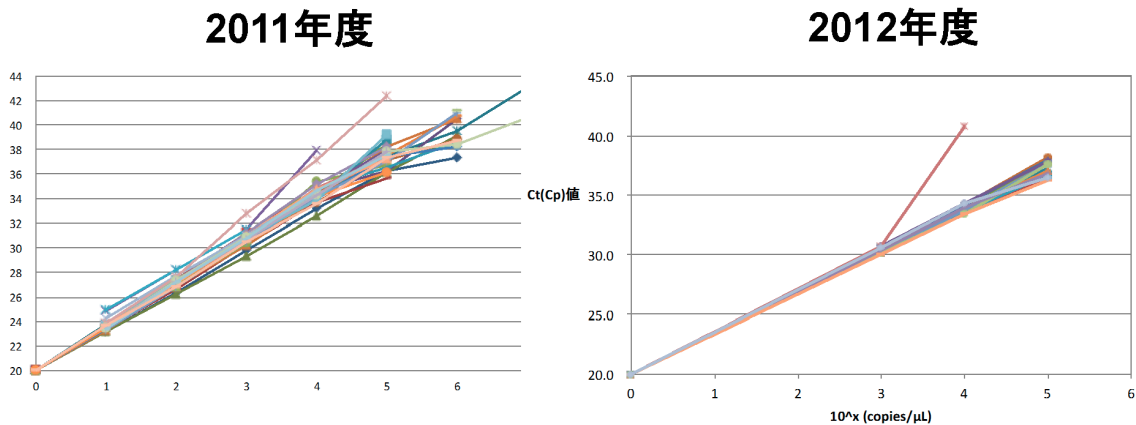
検体	A	B	C	D	E	F
亜型	H1N1pdm09	H7N7	H3N2	H5N2	DW	H5N1
コピー数(/ $\mu$ L)	80	80	8	200	—	80
正解率	100% (73/73)	100% (73/73)	94.5% (69/73)*	100% (73/73)	100% (73/73)	100% (73/73)

\*: 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。

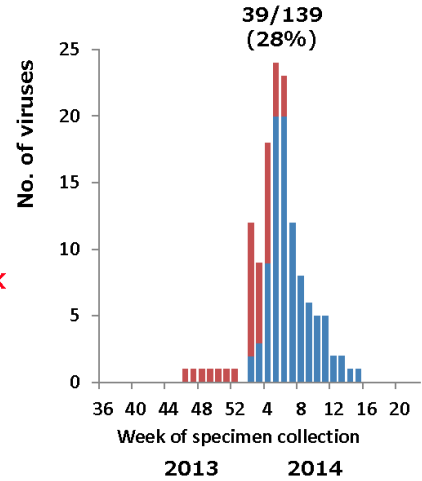
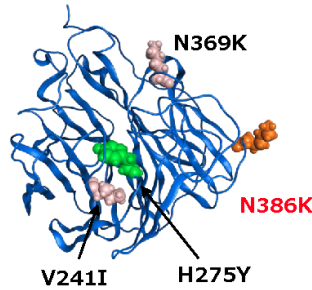
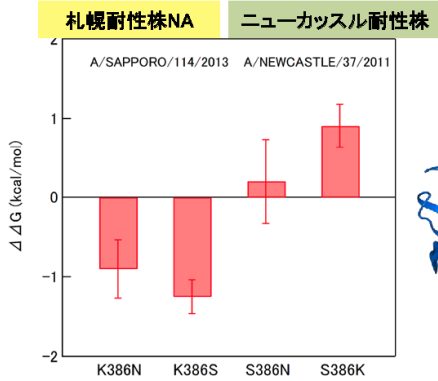
# 変異のリスク予測とサーベイランスによる検証

## (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

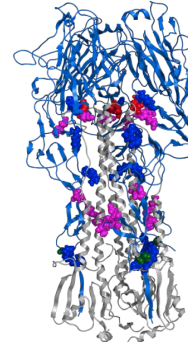
## (2) 伝播リスクを高める二次変異の予測

### 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

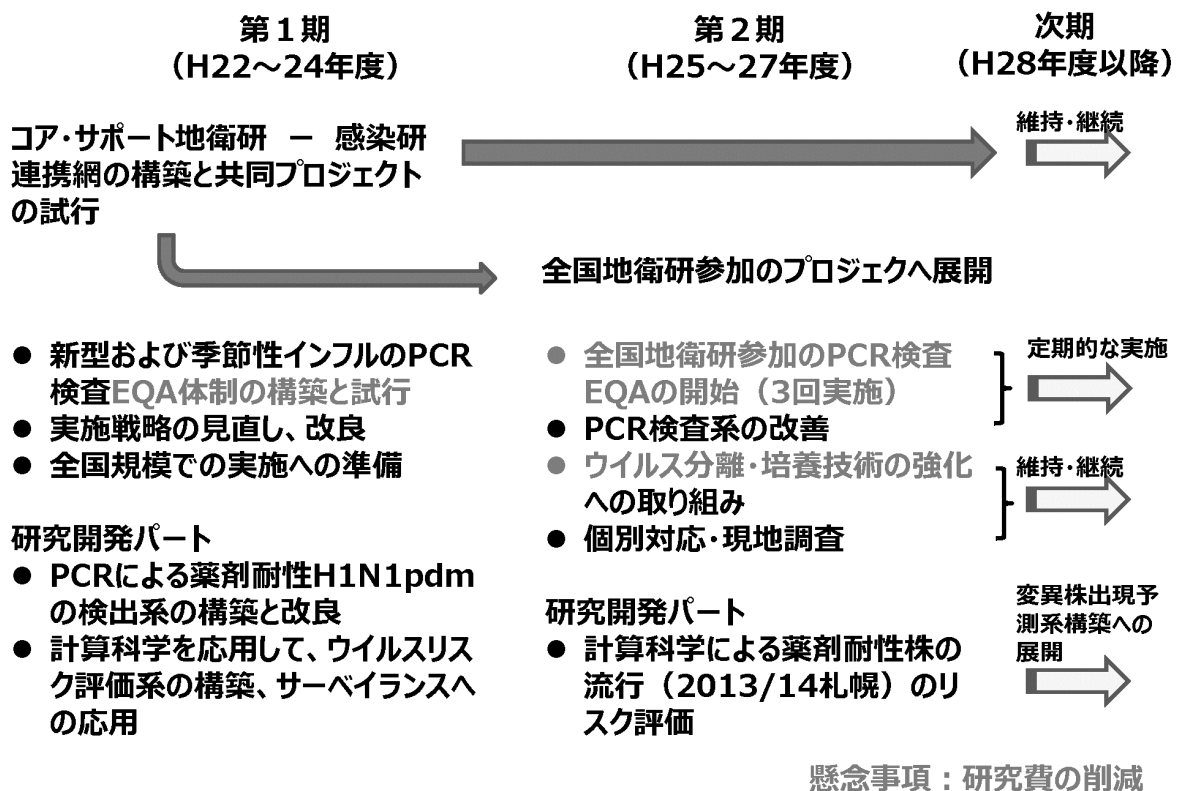
- ❖ 平成26年1月30日現在、予測した変異をもつA(H7N9)株は報告されていない
- ❖ また、A(H7N9)のヒト-ヒトの大規模拡散も報告されていない
- ❖ 『春節』中・後の監視が重要

- 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





## 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。

## 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 及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、齋藤幸一	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、秋場哲哉、貞升健志
	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）
戸田昌一、調 恒明*	山口県環境保健センター（コア地衛研～25年度）
山下育孝、四宮博人**	愛媛県立衛生環境研究所（コア地衛研26年度～）
芦塚由紀、吉富秀亮、千々和勝己	福岡県保健環境研究所（コア地衛研）
駒込理佳、三好正浩、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、三好龍也、内野清子、田中智之	堺市衛生研究所（サポート地衛研）
喜屋武向子、久場由真仁、仁平稔	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）

\* 地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会長（～26年度）

\*\* 地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会長（27年度～）

### 研究要旨

インフルエンザウイルスサーベイランスにおいては、「コア・サポート地衛研体制」として感染研-地研ネットワークが可視化され、検査体制の維持強化が図られている。平成 25-27 年度の間に本体制を活用して急きょ配布された H7 遺伝子検出試薬の感度の検証やウイルス検査の「質」確保に必要な書式等の検討を行うとともに、各研究協力者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。また血球凝集活性の低い分離株の型別対応、影山分担研究者によるウイルス遺伝子検出試験の外部精度管理、高下博士による抗ウイルス剤感受性監視のうち H275Y オセルタミビル耐性変異サーベイランスの維持強化に協力した。平成 25 年度はインフルエンザウイルス検査体制に関するアンケート調査解析結果を報告した。平成 26-27 年度は平成 28 年 4

月に施行される感染症法改正に伴って、新たに必要となる検査関連書式等について検討し、ひな形等を作成した。

## A . 研究目的

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として感染研-地研ネットワークが可視化され、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、ヒトにおける鳥インフルエンザ疑い事例の遺伝子検査に対応している。当該年度の分担研究において、上記インフルエンザウイルス検査体制の維持強化を目的とする調査研究を実施した。さらに平成28年4月1日に施行される改正感染症法においては、他の病原体に先行する形で季節性インフルエンザウイルスの病原体情報収集が定められ、病原体検査のなかでもインフルエンザウイルス検査の「質」の確保が急務となった。そこで、インフルエンザウイルス検査を実施している地衛研が検査の「質」を確保するために定められた省令や要領に基づいて準備すべき書式案等の一部を本研究において作成した。

## B . 研究方法

地方衛生研究所全国協議会(地全協)感染症対策部会と連携し、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(中国四国支部においてコア地衛研の交替があったため12機関が関与)が研究協力者として参画した。

(1)検査精度維持向上:中国におけるH7N9鳥インフルエンザ発生を受けて全地研に検査試薬が配布されたH25年度には、配布直後にH7遺伝子及びM遺伝子検査感度チェッ

クを行い、速やかに地全協会員にフィードバックした。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。

(2)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外部精度管理、渡邊室長(同)による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が現場の実情を反映した実効性の高いものとなるよう、設問のチェック等や結果解析に際して協力した。

(3)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。

(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

各年度研究報告書に記載したとおり、25年度はインフルエンザウイルス検査体制に関するアンケート調査解析結果を報告した。平成26-27年度は平成28年4月に施行される感染症法改正に伴い新たに必要となる検査関連書式等について検討し、ひな形等を作成して報告書に添付するとともに、全国の地衛研に情報提供した。

## 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。

25-27年度は検査法修正等の都度現場として検証し、毎年度希望する全地衛研を対象とするEQA実施に協力するとともに、28年度に施行される法令改正対応に必要な文書書式等を検討し、一部ひな形等を準備した。今回の法改正において特に検体提出制度が適用される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の一環として、地衛研が実施する検査の質の確保には、当該分担研究のようなネットワークの確保と維持が不可欠である。

## E . 結論

感染症法改正に伴い、平成28年度より季節性インフルエンザの病原体サーベイランスは、他の病原体に先駆ける形で検査体制が強化され、全国の指定提出機関より流行期には週1検体、非流行期にも月1検体が提出され、分離株等の病原体情報は、広く国民に還元されることとなる。一定の正確性が担保された有益な情報が速やかに還元されるためには、ウイルス検査における質の確保がこれまで以上に重要となる。

全国の地衛研が分離したウイルス株を用い

て行われるインフルエンザウイルスサーベイランス及び関連する抗インフルエンザ剤感受性監視のレベル維持向上には、感染研-地研ネットワークを活用した不断の情報交換が不可欠であり、外部精度管理の効率的実施にもつながる。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

1) 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 2012/13 シーズン

北海道立衛生研究所報 63, 2013

2) 川上千春、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(2012年9月~2013年5月) 横浜市衛生研究所報 52 69-75, 2013

3) 吉富秀亮・石橋哲也・中村朋史・世良暢之 2012/13 シーズンに分離されたインフルエンザウイルスの抗原性及び系統解析 福岡県保健環境研究所報 40 90-93, 2013

4) 安井善宏、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子 愛知県で2013/14 シーズンに初めて分離されたB型インフルエンザウイルス(Victoria系統)の性状 病原微生物検出情報 34(12) 376-377, 2013

5) 岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、今井正樹、伊東玲子、佐藤彩、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、小田切孝人、田代真人、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 国内インフルエンザ流行株の抗原性解析および薬剤体制株の検出状況(途中経過) 病原微生物検出情報 34 (5)141-142, 2013

6) 岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、土井輝子、伊東玲子、佐藤彩、菅原裕美、江島美穂、金南希、三浦舞、今井正樹、小

- 田切孝人、田代真人、小口晃央、大下龍蔵、藤田信之、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  
2012/13 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 34(11)328-334, 2013
- 7) 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.
- 8) 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* 11(2)386-390, 2015
- 9) Morikawa S, Hiroi S, Kase T Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children. *Journal of Clinical Virology* 64 59-63, 2015
- 10) 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 64 2014
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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 88-91 第41号 2015
- 14) 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
- 15) 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 9-16, 2015
- 16) 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
- 17) 中村一哉、岸田典子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、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 2014/15 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 36(11) 202-207 2015
- 18) 高橋雅輝、岩淵香織 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
- 19) 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
- 20) 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 亜型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
- 21) 安井善宏 インフルエンザウイルスの動向と疫学 The Medical & Test Journal 1331 6 2015
- 22) 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 2014/15 シーズン 北海道立衛生研究所報 65 印刷中 2015
- 23) 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
- 24) 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
- 25) 調 恒明 インフルエンザ病原体サーベイランスの変化とその意味 Pharma Medica 33(11) 15-18 2015
2. 学会発表
- 1) Kawakami C, Ozawa H, Momoki T, Saikusa M, Usuku S, Morita M, Tobita Y, Funayama K, Mizuno T, Mitamura K, Yamazaki M, Ichikawa M Usefulness of nose-blowing specimens for cluster influenza surveillance in Yokohama city, Japan Options for the Control of Influenza VIII Cape Town South Africa 2013 年 9 月
- 2) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘 集団かぜ調査における鼻かみ検体の有用性 第 45 回日本小児感染症学会総会・学術集会 札幌 2013 年 10 月
- 3) 駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、石田勢津子、岡野素彦 オセルタミビル耐性 H3N2 インフルエンザウイルスの迅速検出系の構築 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸 2013 年 11 月
- 4) 藤崎誠一郎、岸田典子、徐紅、高下恵美、今井正樹、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学術集会 神戸 2013 年 11 月
- 5) 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
- 6) 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 2014年5月27日
- 7) 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 2014年5月28日  
( <http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/~farms/kenkyukai.html> )
- 8) 高橋雅輝、佐藤直人、岩淵香織、五日市恵里、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 2015年2月13日
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K, Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T  
Genetic Analysis of Influenza B Viruses isolated during the Five Seasons in Yokohama, Japan  
The 4th isirv-AVG Conference Austin Texas USA 2015年6月
- 17) 高橋雅輝、佐藤直人、小野泰司  
岩手県内で流行したA香港型インフルエンザウイルスのHA遺伝子解析  
日本獣医公衆衛生学会平成27年度東北地区学会 盛岡市 2015年10月
- 18) 高橋雅輝  
呼吸器ウイルスサーベイランス - インフルエンザウイルスとかぜウイルス -

平成 27 年度第 2 回感染症検査ネットワーク  
研修会 盛岡市 2016 年 1 月

19) 高橋雅輝、佐藤直人、岩渕香織、五日  
市恵里、小野泰司

岩手県における呼吸器ウイルスサーベイラ  
ンス - インフルエンザウイルスとその他の  
呼吸器ウイルス -

平成 27 年度 岩手県保健福祉環境行政セ  
ミナー 盛岡市 2016 年 2 月

20) 尾内彩乃、安井善宏、中村範子、廣瀬  
絵美、安達啓一、伊藤雅、小林慎一、山下  
照夫、皆川洋子 2014/15 シーズンに流行し  
たインフルエンザ A 香港型 (AH3) のウイル  
ス性状解析 愛知県公衆衛生研究会 東浦  
町 2016 年 1 月

21) 川上 千春、清水耕平、小澤広規、百木  
智子、七種美和子、宇宿秀三、笹尾忠由  
高下恵美、藤崎誠一郎、小田切孝人

過去 5 シーズンに分離された B 型インフル  
エンザウイルスの遺伝子解析

第 30 回関東甲信静支部ウイルス研究部会  
埼玉 2015 年 7 月

22) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高  
下恵美

横浜市における過去 5 シーズンの B 型イン  
フルエンザウイルスの遺伝子解析

第 47 回日本小児感染症学会 福島 2015  
年 10 月

23) Kawakami C, Momoki T, Saikusa M,  
Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K,  
Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T

Genetic Analysis of Influenza B Viruses  
isolated during the Five Seasons in  
Yokohama

第 63 回日本ウイルス学会 福岡 2015 年  
11 月

24) 川上 千春

インフルエンザの動向について

第 5 回関東甲信静支部公衆衛生情報研究部

会 横浜 2015 年 12 月

25) Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S,  
Shirakura M, Takashita E, Kishida N,  
Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H,  
Akimoto M, Miura H, Odagiri T, 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 福岡 2015 年  
11 月

26) 皆川洋子

V-09 インフルエンザレファレンスセンタ  
ー (コア地衛研) (東海北陸ブロック)

平成 27 年度地方衛生研究所全国協議会東  
海・北陸支部微生物部会 名古屋 2016 年  
3 月

### 3 . その他

(シンポジウム、講演等)

1) 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

AH3 型ウイルスの増殖性と NA アミノ酸変異  
第 27 回インフルエンザ研究者交流の会シ  
ンポジウム 札幌 2013 年 6 月

2) 皆川洋子、安井善宏、山下照夫、平成  
24 年度小田切班コア・サポート地衛研

地衛研のインフルエンザ検査・サーベイラ  
ンス体制の現状と展望 . シンポジウム III  
インフルエンザウイルス 衛生微生物技術  
協議会第 34 回研究会 名古屋市

2013 年 7 月 12 日

3) 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、飛田ゆう子、  
船山和志、水野哲宏

集団かぜ調査における鼻かみ検体導入の試  
み . シンポジウム III インフルエンザウ  
イルス 衛生微生物技術協議会第 34 回研

研究会 名古屋市 2013年7月12日

(検査マニュアル)

4) 中村一哉、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下  
恵美、中内美名、高山郁代、影山 努、小  
田切孝人、長野秀樹、高橋雅輝、林 志直、  
川上千春、滝澤剛則、加瀬哲男、岡山文香、  
山下育孝、千々和勝己、喜屋武向子、安井  
善宏、皆川洋子

インフルエンザ診断マニュアル(第3  
版)2014年9月

#### **G . 知的財産権の出願・登録状況**

なし。

## 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 1～3 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

高橋 仁 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。平成 28 年度には改正感染症法の施行に伴う省令改正により、検査の精度管理の定期的実施および精度管理に関する外部調査の定期的受検など、精度管理への取り組みが大きく変わることとなる。本研究では平成 25、26、27 年度に各一回、全国の地方衛生研究所を対象にしたリアルタイム 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)評価を実施したので、その解析結果を報告する。

### A . 研究目的

平成 24 年 5 月 11 日に「新型インフルエンザ等対策特別措置法」が公布され、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た。また、平成 26 年 11 月には改正感染症法が成立し、平成 28 年 4 月から省令改正により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る予定であり、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。

H5N1 亜型 高病原性鳥インフルエンザウイルスは 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、2016 年 1 月までに 16 カ国 846 人の感染者および 449 人の死者が確認されている。日本では、最近では 2014 年から 2015 年の間、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た。幸いにも世界ではこの亜型のウイルスによるヒト感染例は報告されていない。

さらに 2014 年 4 月には中国で H5N6 亜型

高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が初めて報告され、2016年2月現在、10例の感染者がいずれも中国で報告されている。

また、2013年3月には低病原性の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において世界で初めて報告され、2016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724人の感染者が確認されている。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。

このように、海外ではH5N1、H5N6、H7N7亜型などの高病原性鳥インフルエンザウイルス、H7N9、H10N8、H6N1、H9N2亜型などの鳥インフルエンザウイルス、H1N1、H1N2、H3N2亜型のブタインフルエンザウイルスなど、動物インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が頻繁に報告されており、これらウイルスの遺伝子変異や遺伝子再構成により、容易にヒトからヒトへ感染するようになった新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。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、その診断検査態勢づくりの一環として、平成25年度に74カ所、平成26年度に72カ所、平成27年度に73カ所の地方衛生研究所を対象にしたリアルタイム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の検査精度向上を目的とする外部精度管理(EQA)評価を実施した。

## B. 研究方法

平成25年度は全国74カ所の地方衛生研究所に対して、実施要項(添付資料1)、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行い、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するように依頼し、検査結果を集計して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。

平成26年度は全国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2)および参加確認を兼ねたアンケートを配布し、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日にパネル検体(RNA抽出が不要な6検体で常温輸送でも劣化する事がない抽出核酸の乾燥品)を送付し、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、地方衛生研究所で行っている診断方法により、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するEQAを実施した。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。

平成27年度は全国74カ所の地方衛生研

研究所に対して、2015年7月27日に「EQA2015実施要項」(添付資料3)および参加登録票を配布し、本EQAへの参加を表明した73カ所の地方衛生研究所に対して、2014年8月24日～28日にかけて、パネル検体(RNA抽出が不要な1検体とRNA抽出が必要な5検体で常温輸送でも劣化する事がない抽出核酸の乾燥品)を送付して、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(検査試薬等に関するアンケート調査付き)」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、季節性のA型インフルエンザおよび高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)、鳥インフルエンザ(A/H7N9)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

平成25年度は全国74カ所の地方衛生研究所で行った試験結果および感染研で行った試験結果を集計し、各地方衛生研究所の検査結果について詳細な解析を行い、「結果の解釈について(添付書類4)」、「アンケートおよび結果記入ファイルからの集計(添付書類5)」および各地方衛生研究所向けの「解析結果」をそれぞれ送付した。また、問題が推定された場合は、トラブルシューティングのための参考として、解析結果にコメントを記入し、個別にフィードバック

を行った。

平成26年度は全国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6)、「定量的リアルタイムRT-PCRと精度管理について」(添付資料7)、「「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8)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。

平成27年度は全国73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、「1.第3回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施結果について」(添付資料9)、「2.精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」(添付資料10)、「3.トラブルシューティング時のフローチャート」(添付資料11)、「5.EQA2015の結果およびアンケートの集計」(添付資料12)を本EQA評価に参加した全国73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「4.解析結果2015\_(地衛研名)」(添付資料13)を送付した。

### 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ユ

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。

平成 25 年度の EQA では、全国に配布した H5 および H7 検出用陽性コントロールを共通の標準品として、Type A 検出、H5 および H7 検出の定量的リアルタイム RT-PCR の検査結果を評価する事で、これらの検出系におい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)することを目的に検査結果の解析を行った。この EQA ではこれらの陽性コントロールに問題がない事を前提にして評価を行うため、保管中の陽性コントロールに何らかの問題があった場合(指定濃度に調製されずに保管されている場合、ピペッターの不備など何らかの原因で指定濃度になっていなかった場合、凍結融解の繰り返しによる劣化あるいは冷凍庫の不調など保管状況が適正でなく劣化した場合など)あるいは EQA 実施時に陽性コントロールの希釈や試薬調製の量が正確でなかった場合(希釈時に均一

に混ざっていなかった場合やピペッター分取量が不正確だった場合など)は、正確な評価を行う事が難しい。一方で、明らかに保管していた陽性コントロールあるいはプライマー・プローブに問題があった場合は、感染研で保管された陽性コントロールを新たに配布する、新しいプライマー・プローブを配布するなどしてトラブルシューティングを行ってもらい、問題の解決に繋がったケースも多く、本 EQA はリアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 および H7 検出検査の精度管理に有用であったと考えられた。

平成 26 年度の 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(添付資料 8 ページ 1 表を参照)。この 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/ $\mu\text{L}$  であり、5  $\mu\text{L}$  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 H(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。

平成 27 年度の EQA では、ほぼ全ての地方衛生研究所がほぼ全てのパネル検体に対して、正確に亜型の同定が行っていた(添付資料 12 ページ 1 表を参照)。この EQA では配布パネルのうち RNA 抽出が不要な 1 検体は、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となる。また、RNA 抽出が必要な 5 検体については、RNA 抽出が不要な 1 検体の Ct 値と比較することで、RNA 抽出の効率について比較することが可能となる。これら Ct 値の比較により、既に配布済みの 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の劣化、あるいは測定機器の整備が十分ではなく、検出精度が良くないところがあることも判明した。ただし、今回の EQA 評価では、最も RNA 濃度の薄いパネル検体 C(H3 亜型)で 8 コピー/ $\mu$ L である。5  $\mu$ L 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 8 倍濃い濃度であるため、RNA 抽出方法や検出方法に問題がなければ十分に検出が可能な濃度であるはずである。しかし最も RNA 濃度が低い、この検体 C に関しては正答数が 69/73(95%)となった。RNA 抽出効率の違いにより検出感度が悪くなってしまった事も考えられるため、特に検体 C が検出できない所では、トラブルシューティングにより精度感を向上させる事が必要である。RNA 抽出にやや問題がある所もあったが、H5 と H7 亜型に関していえば、ほぼ全ての地方衛生研究所で検出が可能であり、平成 26 年度の EQA 評価に比べると、検査精度が向上した事は明らか

である。

## E . 結論

平成 25 年度は、陽性コントロールに何らかの問題があり、精度管理がうまく行えないケース、ピペッターに問題がある場合あるいは手技が安定しないケース、陽性コントロールの希釈あるいは反応試薬の分取を正確にできなかったケース、凍結融解の繰り返しによりプライマー・プローブ等試薬に何らかの問題があったケース、リアルタイム PCR 機器のメンテナンス不備により機器の測定が正確ではなかったケース、など原因は様々であり、精度の高い検査が行えない可能性がある地方衛生研究所もいくつかあったが、本 EQA によりトラブルシューティングを行い、問題点を改善することにより、検査精度の向上を図った地方衛生研究所もあり、本 EQA の効果が確認された

平成 26 年度は、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、前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、前年度行った 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。

平成 27 年度は、H5 と H7 亜型の検出に関していえば、ほぼ全ての地方衛生研究所で検出できており、RNA 抽出にやや問題があった所もあるが、前年度の EQA 評価に比べると、検査精度が向上した事は明らかである。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、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季節性インフルエンザウイルスを含む亜型同定検査が正確に行えることが特に重要と考えられ、継続的なEQAを実施する事が精度管理においては有用である。

また、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評価の実施は重要であると考えられる。

平成27年度は、地方衛生研究所自らがトラブルシューティングを行えるように、トラブルシューティングを実施するためのフローチャート(添付資料11)および精度管理と問題時のトラブルシューティング(添付書類10)を作成している。これらが地方衛生研究所において、今後、検査の精度管理に役立つことを願う。

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

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

該当なし

(添付資料 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 1 回全国地衛研外部精度管理(EQA)実施要項

#### EQA の実施について：

平成 25 年 6 月 7 日に「新型インフルエンザ等対策政府行動計画」が政府より示され、新型インフルエンザ等が発生した際は、地方衛生研究所を設置する地方公共団体で PCR 検査等を実施する事が定められました。有事の際にも正しい検査結果を得るためには、日頃から検査の精度を管理・維持する事が重要と考えられます。

平成 23、24 年度には、本 EQA に先駆けて 11 か所のコアおよびサポート地方衛生研究所を対象とし、「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 EQA を実施しました(厚生労働科学研究費補助金「地方自治体との連携による新型インフルエンザおよび高病原性インフルエンザ変異株、薬剤耐性株等の早期検出、検査診断系の改良および流行把握に関する研究」主任研究者 小田切孝人)。この EQA で問題点が明らかになったケースでは、トラブルシューティングを行って問題点を改善する事により検査精度の向上を図る事ができました。

WHO でも各国・地域の National Influenza Center (NIC) に対して EQA を行っていますが(参考資料 ; <http://www.who.int/entity/wer/2013/wer8804.pdf>)、各 NIC により検出方法が異なっているため、型・亜型同定の同定精度および検出感度の把握を主眼とする EQA のみが実施されています(未知の検体 10 サンプルについて型・亜型の同定を行う)。しかしこの EQA では、型・亜型検出結果の正誤を確認するだけで、問題があった場合の詳しい原因究明までは行われないため、トラブルシューティングを行って検査精度の向上を図る事は難しいと考えられます。

一方、国立感染症研究所が示した H5 および H7 亜型検査診断マニュアルに記載のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件は、国立感染症研究所にて一定の検出感度・特異性については担保しています。全国に配布した共通の陽性コントロールに対して定量的検査を伴う EQA を実施する事により、診断系に問題があった際は、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、手技等のどこに問題があるのか、原因追究が比較的容易に行えると考えています。

本 EQA では、定量的検査を伴った H5 および H7 亜型検査診断検査を実施していただき、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整備の確認と各診断検査の検査精度の向上が目的となります。「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」内の「試薬調製手順記入欄」および「5\_アンケート(Excel ファイル)」は、EQA で問題が生じた際に、原因究明を行うための参考に利用します。回答については、一部保留していただいても差し支えありませんが、EQA の結果に問題が生じた際は、あらためて未記入カ所へのご回答をお願いする場合や、新たに質問させていただく場合があります。回答欄は大半が選択式となっておりますので、できるだけ全ての項目にご回答にいただきますようご協力をお願いいたします。また、それぞれのファイルへの「入力例」を作成しました。各ファイルへの入力の前に「入力例」をご一読くださいますようお願いいたします。

本 EQA は平成 25 年度 厚生労働科学研究費補助金「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。

(添付資料 1)

EQA の実施要項 :

1. 実施スケジュール

- ・測定期間： 実施要項到着日～平成 25 年 10 月 31 日
- ・結果報告およびアンケートの締切：平成 25 年 10 月 31 日
- ・集計報告： 平成 25 年 12 月頃より順次

2. 配布書類：

- ・1\_実施要項(本紙) (Word ファイル)
- ・2\_鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版) (PDF ファイル)
- ・3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)：「入力例」は同ファイル内の別シートに記載
- ・4\_アンケート入力例(PDF ファイル)
- ・5\_アンケート(Excel ファイル)

3. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

- ① TypeA/H7 (マーカー入) 陽性コントロール RNA：(以降 H7PC と記します)  
平成 25 年 7 月に感染研より配布済み
- ② TypeA/H5 (マーカー入) 陽性コントロール RNA：(以降 H5PC と記します)  
平成 24 年 9 月、感染研より高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)同定技術研究会にて配布済み
- ③ 各所で使用している陰性対象 (滅菌蒸留水等)

4. 測定方法

1) 各所で保管してある H7PC および H5PC を、配布済みの各ウイルス検出マニュアル内の「陽性コントロールの管理・使用について」に従って、それぞれ  $10^{-1}$ ～ $10^{-4}$  希釈までの 10 倍段階希釈液を作製して下さい。

2) 作製した 10 倍段階希釈液および陰性対象(各所でお使いのもの)について、H7PC に対しては TypeA と H7、H5PC に対しては Type A と H5 のリアルタイム RT-PCR 法にて、各サンプルの Ct (Cp) の測定を行って下さい。

\*本実施要項と同時に、6 月 21 日に配布した「2\_鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版)」を再配布いたします。H5 ウイルス検出法については、感染研ホームページに掲載されている「高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版)」を参照下さい([http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian\\_influenza\\_2003.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/avian_influenza_2003.pdf))。

5. 結果入力

1) 「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」の「結果記入欄\_入力例」シートおよび「試薬調製手順記入欄\_入力例」をご一読下さい。

2) 測定した Ct (Cp) 値は小数第 1 位まで算出し、「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」の「結果記入欄」シートへ、Ct (Cp) 値および検査時のレイアウト (各希釈系列・陰性対象の位置とプライマー・プローブの型・亜型を入力)を、「結果記入欄\_入力例」シートを参考

(添付資料 1)

にして入力して下さい。

- 3) 検査を行った際の試薬調製手順(反応試薬の調製、陽性コントロールの希釈等)の詳細を、「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」の「試薬調製手順記入欄」シートへ、「試薬調製手順記入欄\_入力例」を参考にして入力して下さい。
- 4) 入力後の「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」のファイル名を「結果入力 2013\_地衛研名」に変更して下さい

(備考) 機器を複数台所有している場合、全ての機器を対象にする必要は必ずしもありませんが、複数台で同時に検査を行う場合でかつ希釈した陽性コントロールが同じ場合は、「結果記入欄」シートの特記事項にその旨を明記したうえで、「結果記入欄」シートおよび「試薬調製手順記入欄」シートをコピーして、それぞれの結果および試薬調製手順を入力して下さい。また、2回以上の検査を行いかつ希釈した陽性コントロールの作製日時が異なる場合は、「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」をコピーして陽性コントロールの作製日時ごとに結果および試薬調製手順をそれぞれ別の「3\_結果記入ファイル(Excel ファイル)」に記入して下さい。この場合、ファイル名を変更する際に、通し番号を付けて下さい。(例：「結果入力 2013\_国立感染症研究所 1」「結果入力 2013\_国立感染症研究所 2」)

6. アンケートへの回答

各地衛研で行っている検査方法や使用しているキット等、陽性コントロールの希釈に使用した試薬および器具について「5\_アンケート(Excel ファイル)」がありますので添付の「4\_アンケート入力例(PDF ファイル)」をご一読の後、入力例を参考にして「アンケート入力欄」シートへご回答下さい。

アンケート入力後の「5\_アンケート(Excel ファイル)」のファイル名は「アンケート 2013\_地衛研名」に変更して下さい。(例：「アンケート 2013\_国立感染症研究所」)。

7. 上記 5、6 で作成したファイルを電子メールに添付して、下記へお送り下さい。

なお、電子メールの「件名」には「EQA2013 結果\_地衛研名」をご記入下さい。

E-mail : eqa\_influenza@nih.go.jp

ご質問等は下記へお問い合わせ下さい。

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

(添付資料 2)

## インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)

### 第 2 回全国地衛研外部精度管理(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。

(添付資料 2)

## インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)

### 第 2 回全国地衛研外部精度管理(EQA2014)実施要項

#### 1. EQA2014 の目的と解析対象について

感染研より配布するパネルに対する 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今回の外部精度管理の評価対象となります。

#### 2. EQA2014 実施スケジュール

・事前アンケートの送付:平成 26 年 7 月 1 日

(本メール)

・事前アンケートの回答締切:平成 26 年 7 月 11 日

([eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp) へご返答下さい)

・パネル検体発送予定:平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 7 月 30 日

(普通郵便にて発送します)

・パネル検体発送完了の連絡(受領書、結果記入ファイル、結果報告時アンケートの送付):発送完了時

(参加地衛研へ個別にメールします。パネル到着後に同封の受領書に必要事項をご記入の上、メール添付もしくは FAX にてご返送下さい)

・測定期間:パネル検体到着日～平成 26 年 9 月 12 日

・結果報告およびアンケート送付の締切:平成 26 年 9 月 12 日

([eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp) へご送付下さい)

・集計報告:平成 26 年 11 月頃より順次

(参加地衛研へ個別にメールします)

#### 3. EQA2014 への参加について

今回行う EQA2014 に参加される場合は、平成 26 年 7 月 1 日に送付する事前アンケート(入力時間は 10 分程度)に回答の上、ファイル名を「事前アンケート\_地衛研名」に変更して平成 26 年 7 月 11 日までに電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2014 参加」とご記入下さい。(不参加の場合は事前アンケートへの回答および送付の必要はありません。)

件名:(地衛研名)EQA2014 参加

宛先:[eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

#### 4. EQA2014 の内容

##### 4-1. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

感染研より配布した RNA 抽出が不要な 6 検体(平成 26 年 7 月 28 日～平成 26 年 7 月 30 日に発送予定)

**\*核酸抽出済みの乾燥品を配布しますので、200 $\mu$ L の滅菌蒸留水に溶解して使用して下さい**

(添付資料 2)

い。

#### 4-2. 外部精度管理の評価について

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に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で、各地衛研の方法に従って、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って下さい。

外部精度管理の評価は、リアルタイムRT-PCR法による結果(Ct, Cp値)をもとに検出感度・特異性についての解析を基に行います。各所でリアルタイムRT-PCR法以外の方法(コンベンショナルRT-PCR法、LAMP法、シーケンス法など)で行ったA型インフルエンザウイルスの亜型診断検査とB型インフルエンザウイルスの診断検査の結果についての詳細解析は行えませんが、正しい診断結果が得られているかどうかの確認は行います。参考結果とはなりますがリアルタイムRT-PCR法以外の方法で診断検査を行った場合も、結果をご報告いただきますようお願いいたします。

なお、EQA2014のパネル検体にはB型インフルエンザウイルスは含まれていませんので、今回行う各所の診断検査からB型インフルエンザウイルスの診断検査を除外していただいても構いません。

#### 4-3. 測定方法

- 1) パネル検体到着後、各チューブのスピンドウンを行ってから200 $\mu$ Lの滅菌蒸留水を加えます。30秒間のボルテックス、続いて10回の転倒混和を行って、サンプルを完全に溶解します。(パネル検体は滅菌蒸留水による溶解の有無にかかわらず、到着後は-80 $^{\circ}$ Cにて保管して下さい。)
- 2) 各地衛研の方法に従って亜型診断検査を行って下さい。先述しましたが、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に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で検査を行って下さい。
- 3) 検査の際は、以下の点に留意して下さい。
  - ・少なくとも1回の検査で、6検体を同時に検査する事
  - ・亜型同定検査を行う際には、必ず同時にType Aの検査を行い、かつそれらを必ず一枚のプレート上で検査する事
- 4) リアルタイムRT-PCR法にて、Ct(Cp)値の測定を行って下さい。

リアルタイムRT-PCR法以外の方法(コンベンショナルRT-PCR法等)で行った検査結果があれば、参考までにその結果もご送付下さい。
- 5) 陽性および陰性コントロールを含め、測定したCt(Cp)値(小数第1位まで算出)を、結果記入ファイル(Excelファイル)の「結果記入欄」シートに、検査時のレイアウト(陽性対象・陰性対象の位置とプライマー・プローブの型・亜型を入力)とともに、入力して下さい(入力法は「結果記入欄\_入力例」シートを参考にして下さい)。
- 6) 検査を行った際の試薬調製手順(反応試薬の調製、陽性コントロールの希釈等)の詳細を検査毎に、結果記入ファイル(Excelファイル)の「試薬調製手順記入欄」シートに入力して下さい(入力法は「試薬調製手順記入欄\_記入例」シートを参考にして下さい)。
- 7) 入力後の結果記入ファイル名を「結果入力\_地衛研名」に変更して下さい(ファイルが複数ある場合は通し番号を振って下さい。(例:「結果入力\_国立感染症研究所1」「結果入力\_国立感染症研究所2」))

(添付資料 2)

(備考) 機器を複数台所有している場合でも、全ての機器で検査を行う必要はありません。もし複数台で検査を行う場合、あるいは再検査や複数回に分けて検査を行うなど、検査を2回以上行った場合は、「結果記入欄」シートの特記事項にその旨を明記したうえで、結果記入ファイルもしくは「結果記入欄」シートをコピーして、結果入力を行って下さい。また「試薬調製手順記入欄」シートについても同様にコピーして、検査毎に手順を入力して下さい。

5. 結果報告時アンケートについて(入力時間は15分程度です)

各地衛研で行っている試験方法や使用キット等、陽性コントロール、試薬および器具、また今回の試験方法について、結果報告時アンケートファイル(Excelファイル)がありますので、「アンケート\_入力例」シートを参考にして「アンケート記入欄」シートへご回答下さい。

アンケート記入後のファイル名は「結果報告時アンケート\_地衛研名」に変更して下さい。(例:「結果報告時アンケート\_国立感染症研究所」)。

6. EQA2014の結果の送付方法

全ての入力が終わりましたら各ファイルを電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2014 結果」とご記入下さい。

件名:(地衛研名)EQA2014 結果

宛先: [eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

ご質問等は下記にお問い合わせ下さい。

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](mailto: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



(添付資料3)

## 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 3 回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施について

平成 26 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、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 1 検体および RNA 抽出が必要な 5 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。

本 EQA に参加する場合は、参加登録票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(参加登録の締切は平成 27 年 8 月 7 日 17:00)。

本 EQA は平成 27 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。

(添付資料3)

## 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3回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施要項

#### 1. EQA2015 実施スケジュール

- ・参加登録票の送付:平成 27 年 7 月 27 日
- ・参加登録の締切:平成 27 年 8 月 7 日 17:00
- ・パネル検体発送および結果記入ファイル送付予定:平成 27 年 8 月 24 日～28 日
- ・測定期間:パネル検体到着日～平成 27 年 10 月 16 日
- ・結果報告およびアンケートの締切:平成 27 年 10 月 16 日
- ・集計報告:平成 27 年 12 月頃より順次
- ・EQA 事後アンケートの実施

#### 2. EQA2015 への参加について

今回行う EQA2015 に参加される場合は、平成 27 年 7 月 27 日に送付する「参加登録票」(入力時間は 5 分程度)に入力の上、ファイル名を「参加登録票\_地衛研名」に変更して平成 27 年 8 月 7 日 17:00 までに電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2015 参加」とご記入下さい。(不参加の場合は「参加登録票」の送付の必要はありません。)

件名:(地衛研名)EQA2015 参加

宛先: [eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

#### 3. EQA2015 の内容

##### 3-1. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

本年は感染研より配布した RNA 抽出が不要な 1 検体と RNA 抽出が必要な 5 検体(平成 27 年 8 月 24 日～平成 27 年 8 月 28 日に発送予定)

\* 本年は核酸抽出済みの乾燥品 1 検体と不活化したウイルスの乾燥品 5 検体を配布します。核酸抽出済みの乾燥品は 500 $\mu$ L の滅菌蒸留水に溶解して、そのままリアルタイム RT-PCR に使用して下さい。不活化したウイルスの乾燥品 5 検体は 500 $\mu$ L の滅菌蒸留水に溶解して、RNA 抽出を行った後、リアルタイム RT-PCR に使用して下さい。

##### 3-2. 解析対象について

今回行う EQA2015 では、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外部精度管理の評価対象となります。

##### 3-3. 外部精度管理の評価について

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に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で、各地衛研の方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い(核酸抽出済み検体

(添付資料3)

の RNA 抽出は不要)、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って下さい。

外部精度管理の評価は、総合判定シートに記入された結果に基づいて行います。トラブルシューティングが必要と考えられるケースでは、リアルタイム RT-PCR 法による Ct (Cp) 値を基に解析を行います。各所でリアルタイム RT-PCR 法以外の方法(コンベンショナル RT-PCR 法、LAMP 法、シーケンス法など)で行った場合も、正しい診断結果が得られているかどうかの確認を行いますので、結果詳細をご報告いただきますようお願いいたします。

なお、EQA2015 のパネル検体には B 型インフルエンザウイルスは含まれていませんので、今回行う各所の診断検査から B 型インフルエンザウイルスの診断検査を除外していただいても構いません。

### 3-4. 測定方法

1) パネル検体到着後、各チューブのスピンドウンを行ってから 500 $\mu$ L の滅菌蒸留水を加えます。30 秒間のボルテックス、続いて 10 回の転倒混和を行って、サンプルを完全に溶解します。(パネル検体は滅菌蒸留水による溶解の有無にかかわらず、到着後は-80 $^{\circ}$ Cにて保管して下さい。)

2) 各地衛研の方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い、亜型診断検査を行って下さい。ただし核酸抽出済の 1 検体については RNA 抽出を行わないで下さい。先述しましたが、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に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で検査を行って下さい。

3) 検査の際は、以下の点に留意して下さい。

・必ずしも 6 検体を同時に検査する必要はありませんが、何回かに分けて検査を行う場合は、検査毎に必ず核酸抽出不要の検体も同時に検査して下さい。

4) リアルタイム RT-PCR 法にて、Ct (Cp) 値の測定を行って下さい。

もし、リアルタイム RT-PCR 法以外の方法(コンベンショナル RT-PCR 法等)で行った検査結果があれば、その結果もご送付下さい。

5) 測定した Ct (Cp) 値(小数第 1 位まで算出)を、結果記入ファイル(Excel ファイル)の「結果記入シート」に入力して下さい(入力法は「結果記入シート\_入力例」シートを参考にして下さい)。

6) また、各地衛研で行っている試験方法や使用キット等については、「アンケート入力シート」に入力して下さい。

7) 全ての検査終了後、各パネル検体の亜型判定結果を「総合判定シート」に入力してください。

8) 入力後の結果記入ファイル名を「結果入力\_地衛研名」に変更して下さい

(備考) 機器を複数台所有している場合でも、全ての機器で検査を行う必要はありません。もし複数台で検査を行う場合、あるいは再検査や複数回に分けて検査を行うなど、検査を 2 回以上行った場合は、「結果記入シート」の特記事項にその旨を明記したうえで、「結果記入シート」をコピーして増やして、結果入力を行って下さい。

### 4. EQA2015 の結果の送付方法

全ての入力が終わりましたら各ファイルを電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2015 結果」とご記入下さい。

件名:(地衛研名)EQA2015 結果

(添付資料3)

宛先:[eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

5. EQA 事後アンケートの実施について

本 EQA の実施後に、EQA の改善等を目的とした事後アンケート調査を行いますので、ご協力をお願いいたします。

ご質問等は下記にお問い合わせ下さい。

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](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

電話:042-561-0771 (代表)

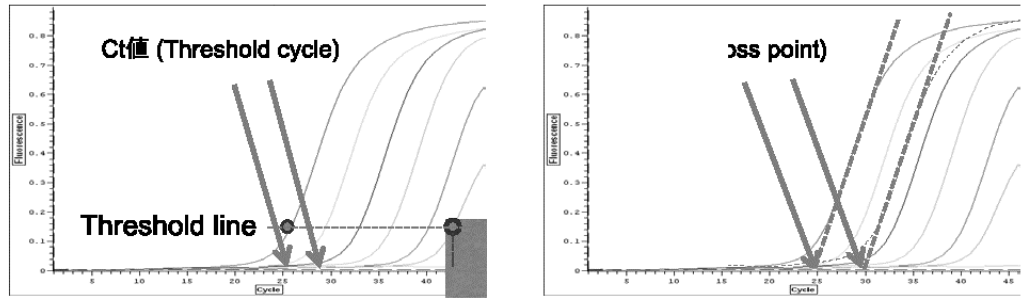
(042-848-7166 直通)

担当:影山/高山/中内

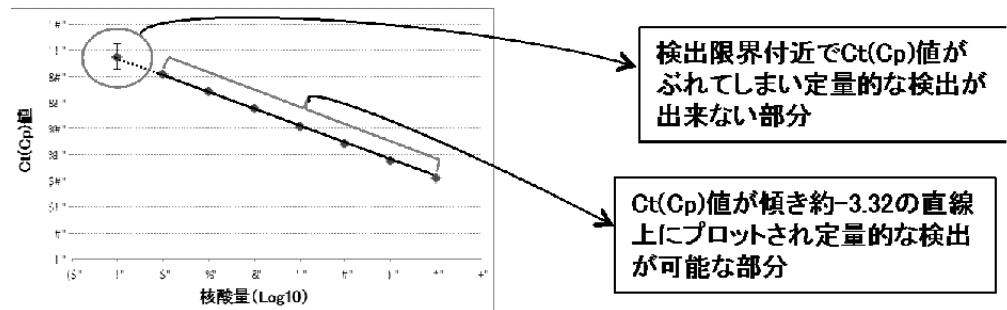
## 結果の解釈について

### 1. 定量的リアルタイム RT-PCR について

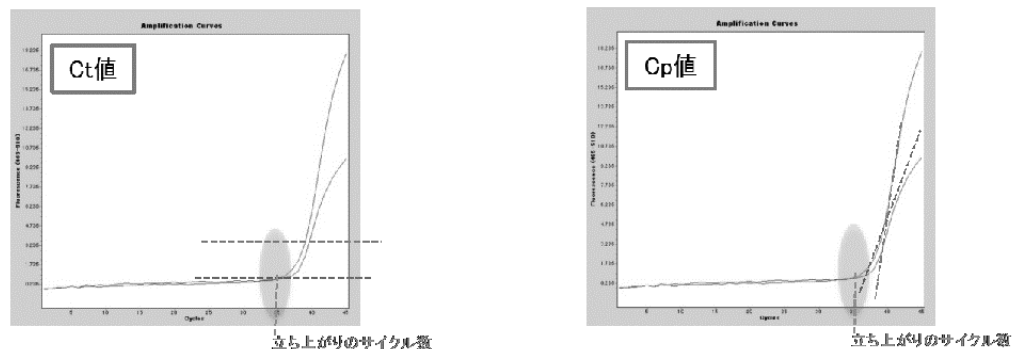
#### 1-1. 原理



Ct 値は Threshold line とシグナルとの交点の Cycle 数（上左図）、Cp 値は指数増幅期の回帰曲線と横軸（ベースライン）との交点の Cycle 数（上右図）を表します。本 EQA で行った TypeA, HA(H5, および H7)検出系は、試薬、プライマー、プローブに問題が無い場合、増幅シグナルはシグモイドカーブを描き、核酸量(Log10)と Ct(Cp)値の間には相関性が見られ、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上傾き約-3.32 の直線上にプロットされます（下図）。



#### 1-2. 各検出系間の Ct 値(Cp 値)の乖離について



全ての検出系は、検出系の種類が異なっても、ターゲット核酸のコピー数が同じ場合、シグナルの立ち上がりのサイクル数がほぼ同じになるよう構築しています。上左図のように、Threshold line を青線のところに引くと2つの検出系間の Ct 値は乖離しませんが、赤線のところに引くと少し乖離が見られます。また、上右図のように、Cp 値でも乖離が見られます。これは、検出系の種類によって、シグモイドカーブの形がそれぞれ

(添付資料 4)

異なるためです。データの解析時に必ずシグナルの立ち上がりのサイクル数とシグモイドカーブをご確認下さい。

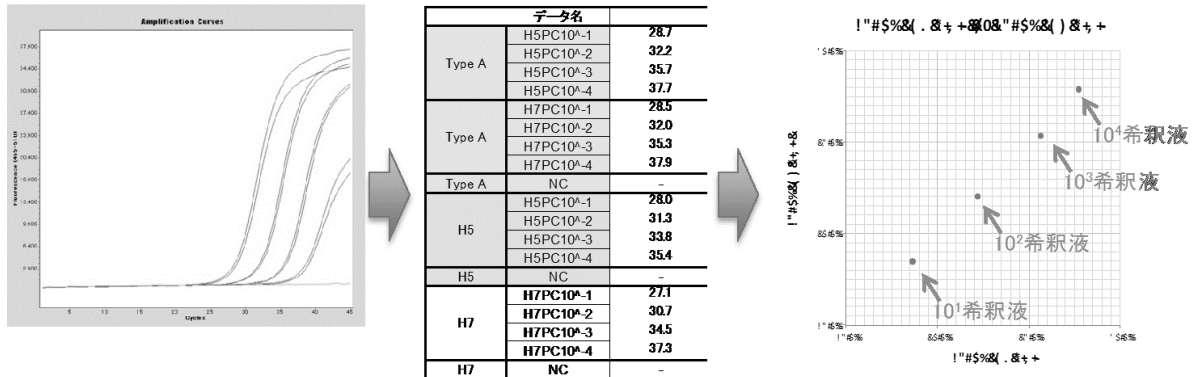
## 2. 結果の解析方法について

### 2-1. EQA で用いた陽性コントロールについて

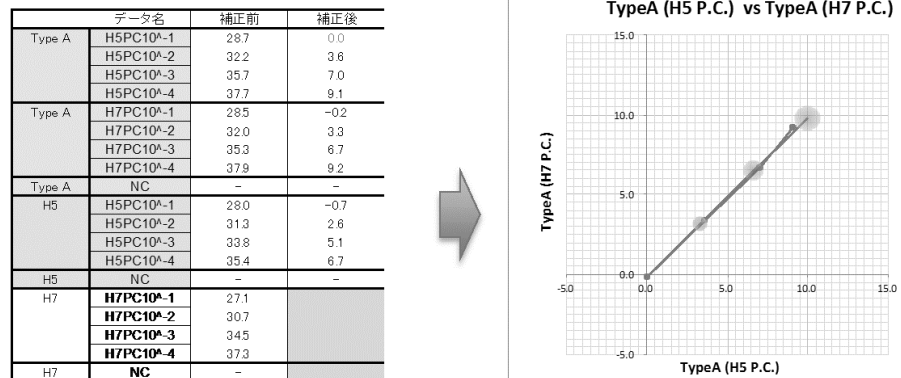
今回の EQA では、10 倍階段希釈した陽性コントロールをテンプレートとし、定量的リアルタイム RT-PCR 法を実施して、各検出系の Ct(Cp)値を比較することで精度の高い検査ができていますか解析を行いました。配布した各陽性コントロールに含まれる M 遺伝子 (TypeA 検出系のターゲット遺伝子) と HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じで、検出系に問題がない場合、各陽性コントロールの  $10^1 \sim 10^3$  希釈液までは必ず定量的に検出できる濃度となっています。すなわち、陽性コントロールを 10 倍階段希釈していくと、 $10^1 \sim 10^3$  希釈液までは、PCR 増幅効率が 100% の場合は、理論上約 3.32 ずつ Ct(Cp)値が増加しますが、 $10^4$  希釈液は検出限界付近の核酸量のため、検出できない、あるいは検出できたとしても、検査ごとに Ct(Cp)値が変動する可能性があります。

### 2-2. TypeA 検出系の 2 種類の陽性コントロール間での比較

TypeA 検出系を評価するために、2 種類の陽性コントロール間の TypeA 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較しました。H5 陽性コントロールと H7 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各希釈液の Ct(Cp)値は、理論上どちらもほぼ同じ値となります (下図)。



今回の解析では、H5 陽性コントロールの  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました (下図)。



(添付資料 4)

TypeA 検出系に問題がなければ、H5 陽性コントロールと H7 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、2 種類の陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Ct(Cp)値の間に乖離はなく、H5 陽性コントロールの  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を起点とした 45 度の対角線 (グレーの直線) 上に、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上約 3.32 の間隔でプロット (グレーの円の中心点) されます。また、理論上 PCR 増幅効率が 90%以上の場合は検査の精度に問題がないと考えられ、その Ct(Cp)値の範囲をグレーの円で示しました。 $10^4$  希釈液は検出限界付近の核酸量となり定量的な検出ができないため、示したグレーの円から外れる場合もあります。

### 2-3. TypeA 検出系の 2 種類の陽性コントロール間での比較から分かる問題点

各陽性コントロールに含まれる M 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、理論上赤の破線で示した原点を起点とした対角線上にプロットされます。

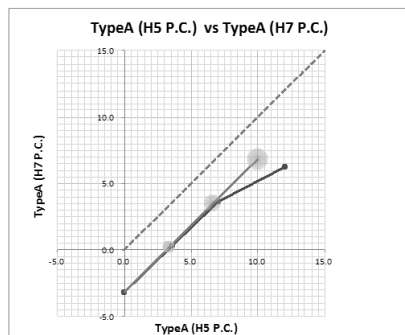


図 1  $10^1$  希釈液の結果が原点にプロットされない

左図の場合、すべての希釈液で、TypeA (H5 P.C.)の Ct(Cp)値が TypeA (H7 P.C.)の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より下にプロットされています。これは、H7 陽性コントロールと比べ H5 陽性コントロールに問題があるためと考えられ、H5 陽性コントロールが凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。

逆に、すべての希釈液で、TypeA (H7 P.C.)の Ct(Cp)値が TypeA (H5 P.C.)の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より上にプロットされた場合は、H7 陽性コントロールに問題があると考えられます。

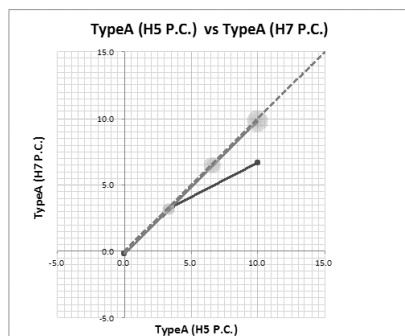


図 2  $10^2$  から  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの直線上にプロットされない (例で示した図は  $10^3$  希釈液のみずれた場合です)

左図の場合、 $10^2$  希釈液まではグレーの直線上に 3.32 の間隔でプロットされていますが、 $10^3$  希釈液以降、グレーの直線上にプロットされなくなっています。これは、両方の陽性コントロールが、凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。また、TypeA 検出系において、プライマー、プローブの劣化により検出感度の低下が見られた可能性も考えられます。

(添付資料 4)

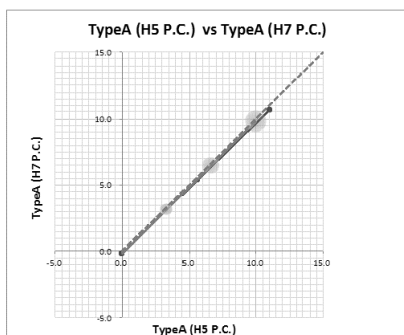
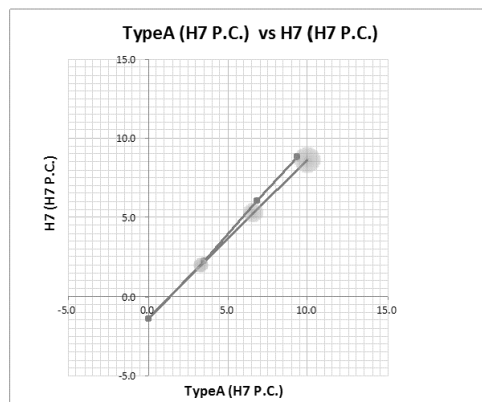
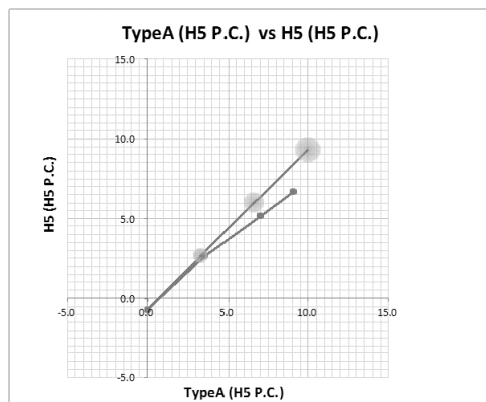


図3  $10^2$  から  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの円から大きく外れている左図の場合、各希釈液の Ct(Cp)値はグレーの直線上にプロットされていますが、3.32 より大きな間隔でプロットされています。これは、反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により TypeA 検出系において定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

#### 2-4. 各陽性コントロールにおける TypeA 検出系と各 HA 検出系の比較

TypeA と H5 検出系を評価するために、H5 陽性コントロールの TypeA 検出系と H5 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較しました。今回の解析では、TypeA 検出系の  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました（下図左）。H5 陽性コントロールに含まれる M 遺伝子と HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各希釈液の Ct(Cp)値は、理論上どちらもほぼ同じ値となります。

TypeA と H7 検出系の評価についても、上記と同様に H7 陽性コントロールの TypeA 検出系と H7 検出系の Ct(Cp)値を相対的に比較するため、TypeA 検出系の  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を「0」に換算し、各 Ct(Cp)値をプロットしたグラフを作成しました（下図右）。



TypeA および HA 検出系に問題がなければ、各陽性コントロールに含まれる M および HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、各陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Ct(Cp)値の間に乖離はなく、H5 もしくは H7 陽性コントロールの  $10^1$  希釈液の Ct(Cp)値を起点とした 45 度の対角線（グレーの直線）上に、PCR 増幅効率が 100%の場合は理論上約 3.32 の間隔でプロット（グレーの円の中心点）されます。また、理論上 PCR 増幅効率が 90%以上の場合は検査の精度に問題がないと考えられ、その Ct(Cp)値の範囲をグレーの円で示しました。 $10^4$  希釈液は検出限界付近の核酸量となり定量的な検出ができないため、示したグレーの円から外れる場合があります。



(添付資料 4)

## 2-5. 各陽性コントロールにおける TypeA 検出系と各 HA 検出系の比較から分かる問題点

各陽性コントロールに含まれる M および HA 遺伝子のコピー数はほぼ同じなので、理論上赤の破線で示した原点を起点とした対角線上にプロットされます。

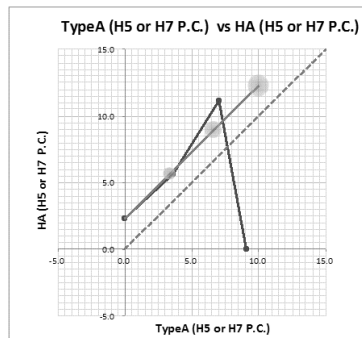


図 4  $10^1$  希釈液の結果が原点にプロットされない

左図の場合、すべての希釈液で、HA 検出系の Ct(Cp)値が TypeA 検出系の Ct(Cp)値よりも大きく、赤の破線より上にプロットされています。これは、HA 検出系に問題があるためと考えられ、HA 検出系において、プライマー、プローブが凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、ストック作製時に濃度調整が正しくなかったなどの可能性があります。

逆に、TypeA 検出系の Ct(Cp)値が HA 検出系の Ct(Cp)値よりも大きくなり、赤の破線より下にプロットされた場合は、TypeA 検出系に同様の原因あると考えられます。

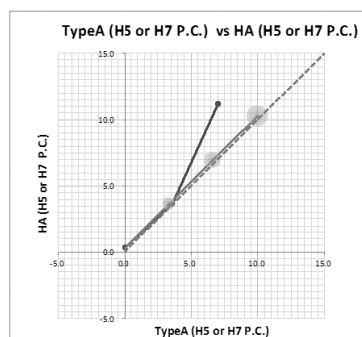


図 5  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの直線上にプロットされない

左図の場合、 $10^2$  希釈液まではグレーの直線上に 3.32 の間隔でプロットされていますが、 $10^3$  希釈液以降、グレーの直線上にプロットされなくなっています。これは、陽性コントロールが、凍結融解の繰り返しにより劣化した、保管中に劣化した、マスターストック作製時に指定の濃度になっていなかったなどの可能性があります。また、一方の検出系において、プライマー、プローブの劣化により検出感度の低下が見られた可能性も考えられます。

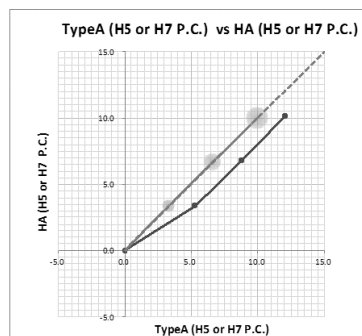


図 6  $10^1$  から  $10^3$  希釈液の結果が、グレーの直線と平行にプロットされない

左図の場合、TypeA 検出系において、Ct(Cp)値の間隔が 3.32 より大きくなっています。反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により、TypeA 検出系において正確な測定ができなくなってしまった可能性があります。逆に、HA 検出系において、Ct(Cp)値の間隔が 3.32 より大きくなっている場合は、HA 検出系において同様の理由から定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

(添付資料 4)

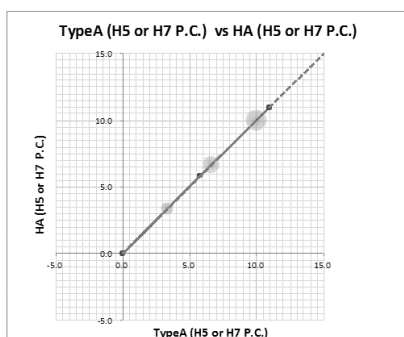
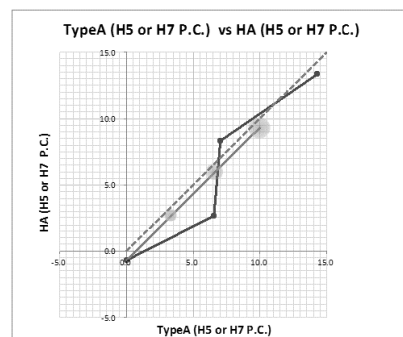
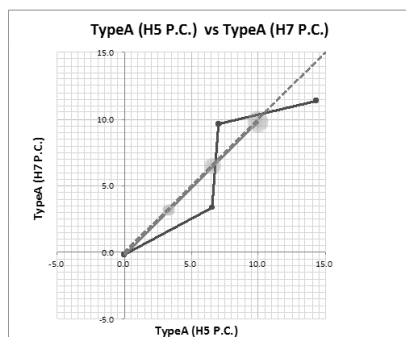


図7 10<sup>2</sup>から10<sup>3</sup>希釈液の結果が、グレーの円から大きく外れている左図の場合、両検出系において各希釈液の Ct(Cp)値はグレーの直線上にプロットされていますが、3.32 より大きな間隔でプロットされています。これは、両方の検出系において、反応試薬中のプライマー、プローブの濃度調整が正しくなかった、あるいはプライマー、プローブの劣化により定量的な測定ができなくなってしまった可能性があります。

### 2-6. 陽性コントロールの希釈系列が正確に作製できていない

図8(下図左)、9(下図右)の場合、各希釈液の Ct(Cp)値の差が等間隔ではなく、対角線から大きくはずれてプロットされています。正確に希釈系列が作製できていない可能性があり、この場合は、今回の EQA では正確な評価が難しくなります。また、一方の陽性コントロールの10倍階段希釈が正確でない場合は、前述の図5のようにプロットされ、両方の陽性コントロールの10倍階段希釈が正確でない場合は、前述の図3のようにプロットされることもあります。



今回の EQA の評価は、今回送付した「解析結果 2013\_地衛研名(Excel ファイル)」の「解析結果」シート中の解析図とアンケート結果から総合的に行いました。「解説」シート中の「解析結果へのコメント」および「その他コメント欄」をご参照下さい。

この「結果の解釈について(PDF ファイル)」と「アンケート、結果記入ファイルからの集計(PDF ファイル)」も参考に、問題があった場合にはトラブルシューティングを行って頂きますようお願い致します。

(添付資料 5)

### アンケートおよび結果記入ファイルからの集計

今回の EQA に参加された 74 地衛研からのアンケートおよび結果記入ファイルの項目を集計し、いくつかの結果を下記にまとめました。

#### 1. 陽性コントロールの保管について

##### 1-1. TypeA/H7(マーカ入)の保管について

図1 TypeA/H7(マーカ入)の保管温度

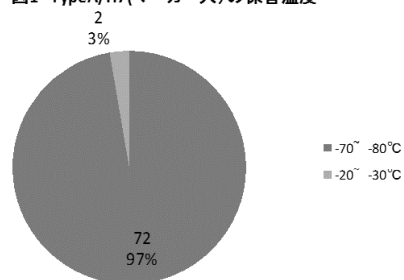
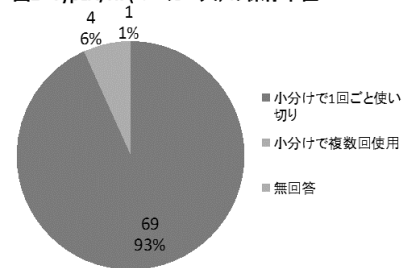


図2 TypeA/H7(マーカ入)の保存単位



##### 1-2. TypeA/H5(マーカ入)の保管について

図3 TypeA/H5(マーカ入)の保管温度

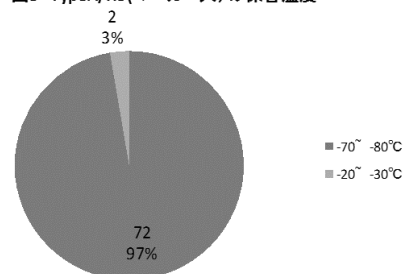
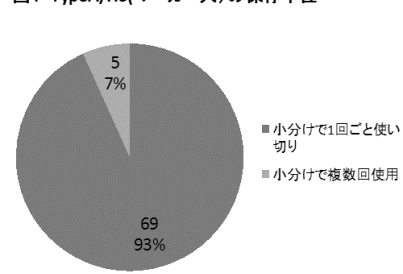


図4 TypeA/H5(マーカ入)の保存単位



#### <コメント>

-20~-30°Cで保管をされている場合は、冷凍庫に自動霜取り機能のないもの（メディカルフリーザー等）を使用されているか、ご確認ください。

また、小分けで複数回使用されている場合、凍結融解により劣化につながる可能性があります。

(添付資料 5)

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5 Type A (M遺伝子)検出系 記載マニュアル

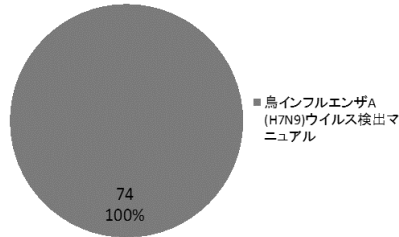


図6 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブレミックスの有無

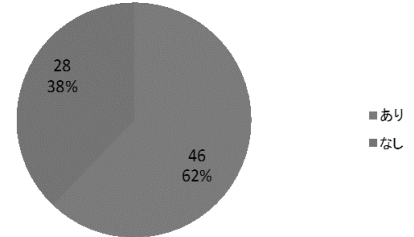


図7 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブ保存温度

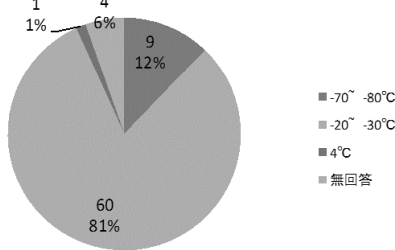
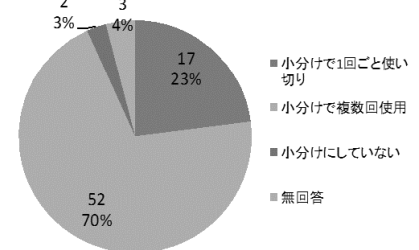


図8 Type A (M遺伝子)検出系 プライマー、プローブ保存単位



2-2. H7 検出系について

図9 H7検出系 記載マニュアル

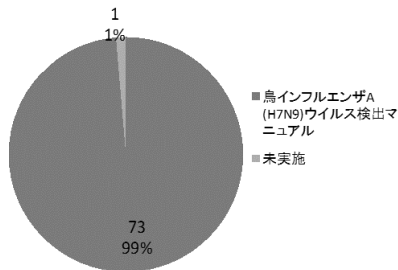


図10 H7検出系 プライマー、プローブレミックスの有無

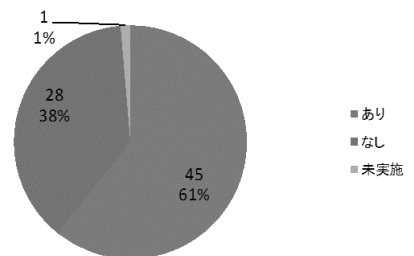


図11 H7検出系 プライマー、プローブ保存温度

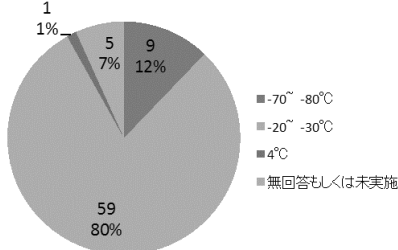
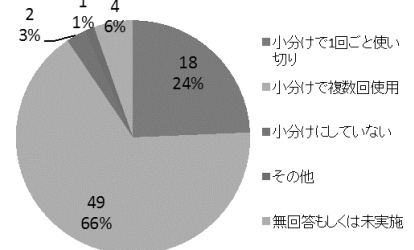


図12 H7検出系 プライマー、プローブ保存単位



(添付資料 5)

2-3. H5 検出系について

図13 H5検出系 記載マニュアル

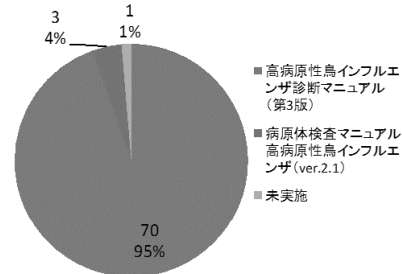


図14 H5検出系 プライマー、プローブプレミックスの有無

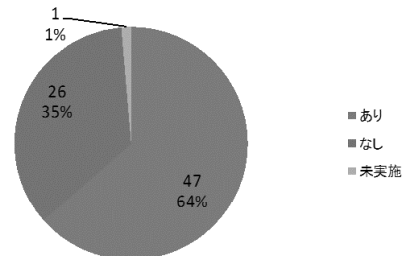


図15 H5検出系 プライマー、プローブ保存温度

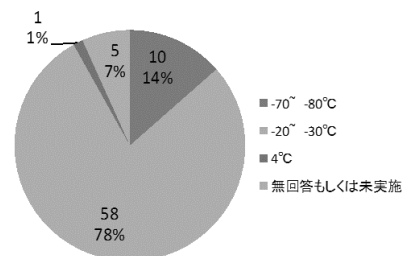
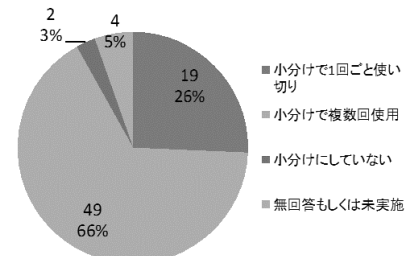


図16 H5検出系 プライマー、プローブ保存単位



<コメント>

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。

また、H5 検出系において、病原体検査マニュアル高病原性鳥インフルエンザ(ver.2.1)記載の検出系を使用されている地衛研が数カ所ありました。この検出系は、2010年10月以降に日本国内の野鳥や家禽で流行した clade2.3.2.1 に対して、H5 検出系が TypeA 検出系の Ct 値と比べ、大きく乖離するため、高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)記載の検出系をご使用ください。

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図17 使用キット名

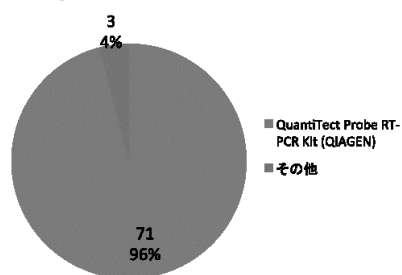
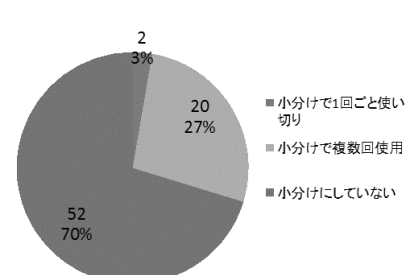


図18 試薬の保存単位

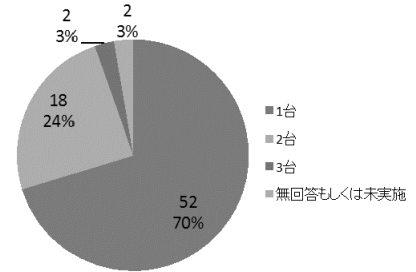


反応試薬については、QuantiTect Probe RT-PCR Kit 以外を使用している地衛研が数カ所見られました。配布したマニュアルに記載されている反応条件、反応組成は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit に最適化されたものです。反応条件、反応組成を最適化していないと、検出感度の低下につながる

(添付資料 5)

可能性もあるのでご注意ください。  
 また、反応時間がより短い試薬をマニュアル内で使用してほしいというご意見をいくつかの地衛研よりいただきました。今後、検討させていただきます。  
 試薬の保存については、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、コンタミネーションが起きないようにご注意ください。また、凍結融解による劣化により検出感度の低下につながる可能性もありますのでご注意ください。

図20 通常のインフルエンザ検査用機器の台数



4. リアルタイム PCR 機について

図19 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ77機種)

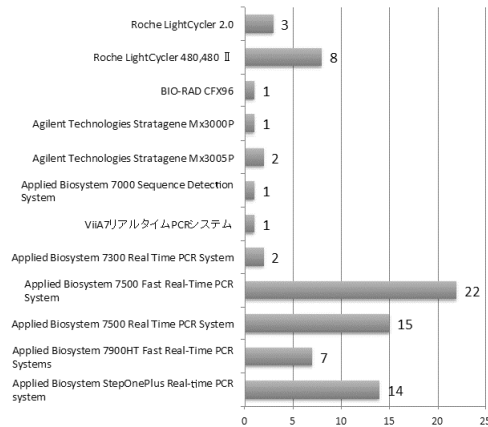


図21 通常検査のバックアップ用機器の台数

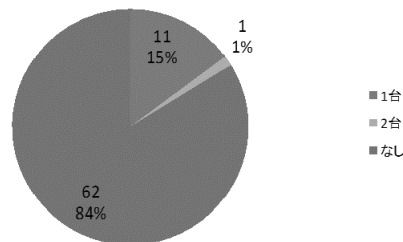
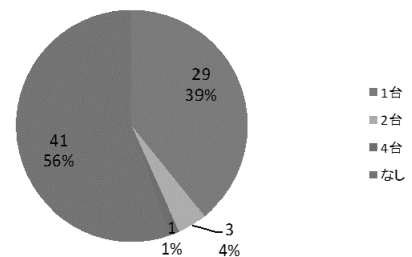


図22 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<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ことをおすすめいたします。

(添付資料 5)

5. 試薬調製方法について (結果記入ファイルから)

図23 試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時の温度

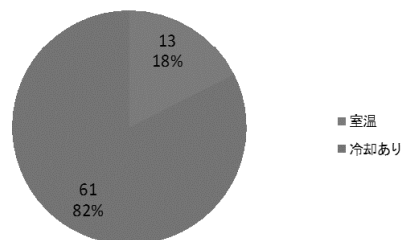


図24 試薬調製と陽性コントロール作製の順 (一人で検査を行った54地衛研)

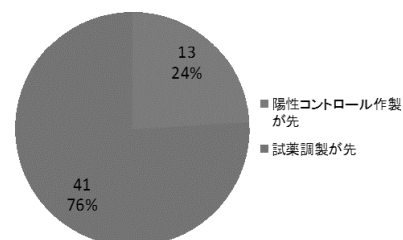
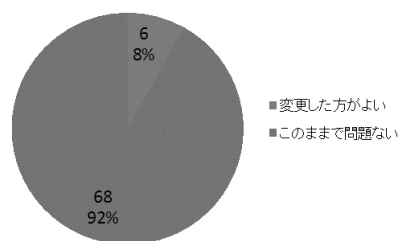


図25 試薬調製過程でのゾーニング



<コメント>

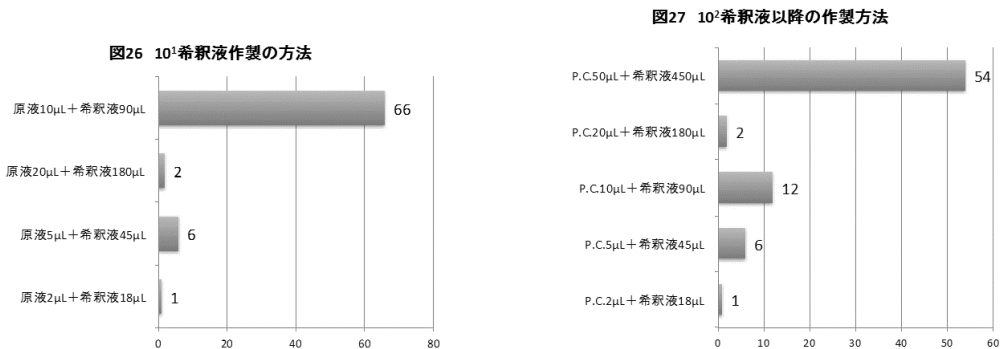
試薬調製、陽性コントロール作製、コントロール添加時に室温で行っていた地衛研が数カ所ありましたが、氷上での作業をおすすめいたします。

また、一人で EQA を行っていた 54 地衛研のうち、13 地衛研については、陽性コントロール作製後に試薬調製を行っていました。通常の検査でも、同様の順で作業を行っている場合には、反応試薬調製後、陽性コントロール調製を行った方が、陽性コントロールの反応試薬へのコンタミネーションの可能性が低くなります。

試薬調製過程でのゾーニングについては、コンタミネーションの危険性を低減させるうえで、レイアウトの変更をした方がいいと思われる地衛研が数カ所見られました。もし、レイアウトの変更ができない場合には、1 回ごとの検査後にクリーンアップを徹底するなどご留意ください。

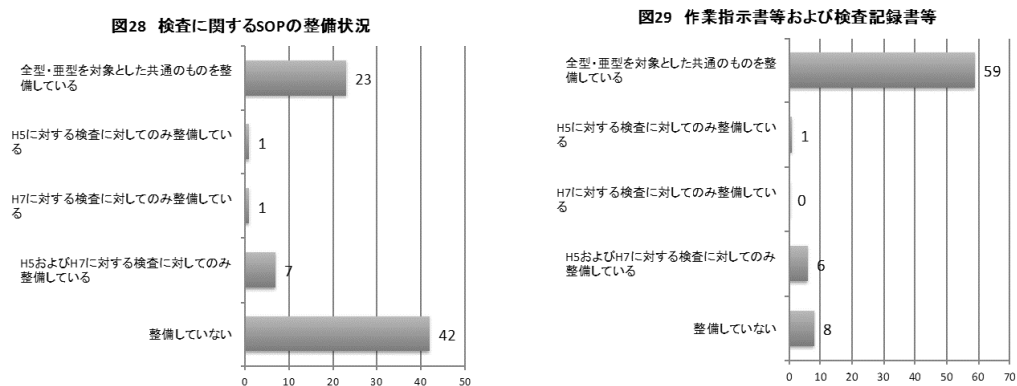
(添付資料 5)

6. 陽性コントロールの希釈方法について (地衛研数で集計)



陽性コントロールの希釈を特に 10<sup>2</sup> 希釈液以降で、50  $\mu$  L + 希釈液 450  $\mu$  L よりも少ない容量で行っている場合、ピペッター由来の誤差が影響しやすく、正確に希釈系列の作製ができなくなる可能性が高くなります。

7. 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)



<コメント>

作業手順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が、SOPを整備している地衛研は比較的少ない。



(添付資料 6)

## 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ます、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

(添付資料 6)

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。何らかの問題があつ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、検査毎や作業者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、作業者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

(添付資料 7)

## 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)。

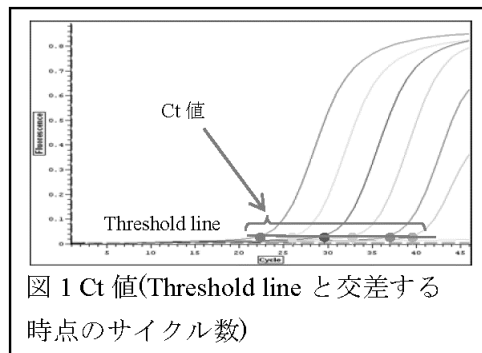


図 1 Ct 値(Threshold line と交差する時点のサイクル数)

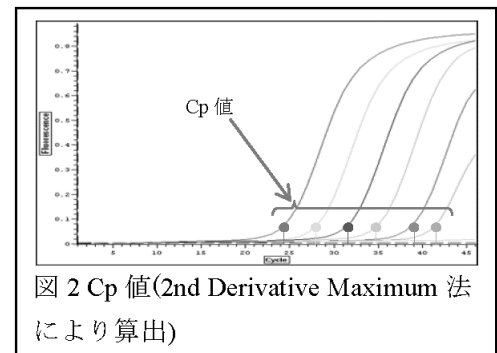


図 2 Cp 値(2nd Derivative Maximum 法により算出)

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)。

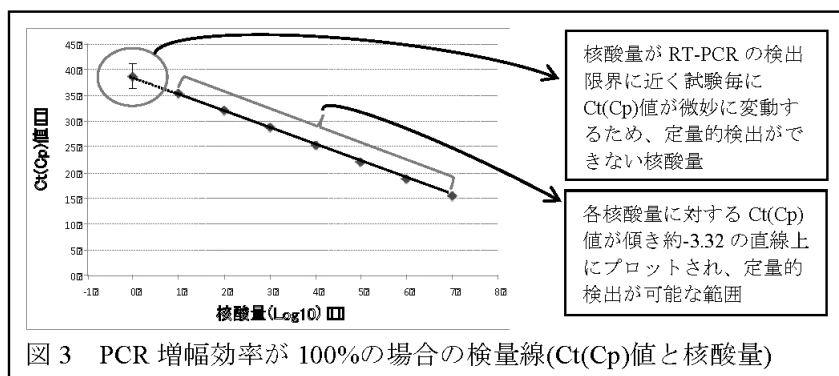


図 3 PCR 増幅効率が 100%の場合の検量線(Ct(Cp)値と核酸量)

(添付資料 7)

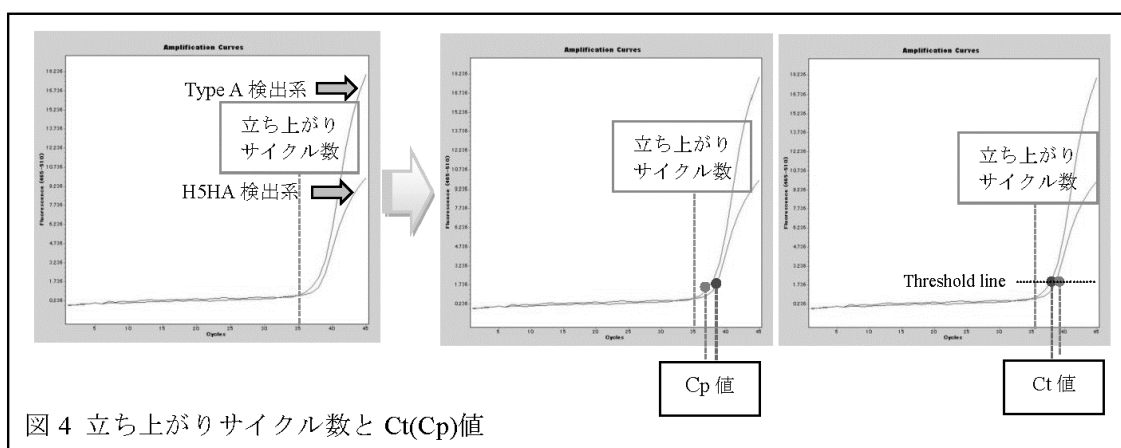
## 2. 精度管理について

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)

(添付資料 7)

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事をお勧めします。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も小さく、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

(添付資料 7)

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。

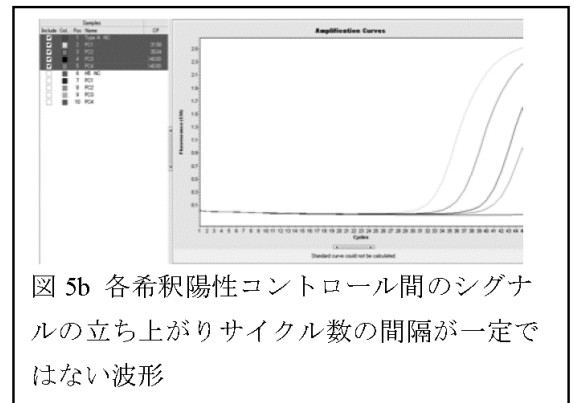
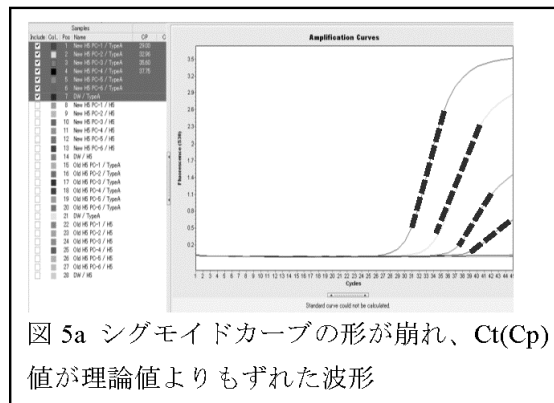
### 5. 検出系に何らかの問題がある場合

H5 および H7 陽性コントロール(識別マーカー入り)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、なお、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、Cp 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 Cp 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 Ct(Cp)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(Ct(Cp)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の分取・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。



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。

(添付資料 7)

## 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、原因特定の仕事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)。

(添付資料 7)

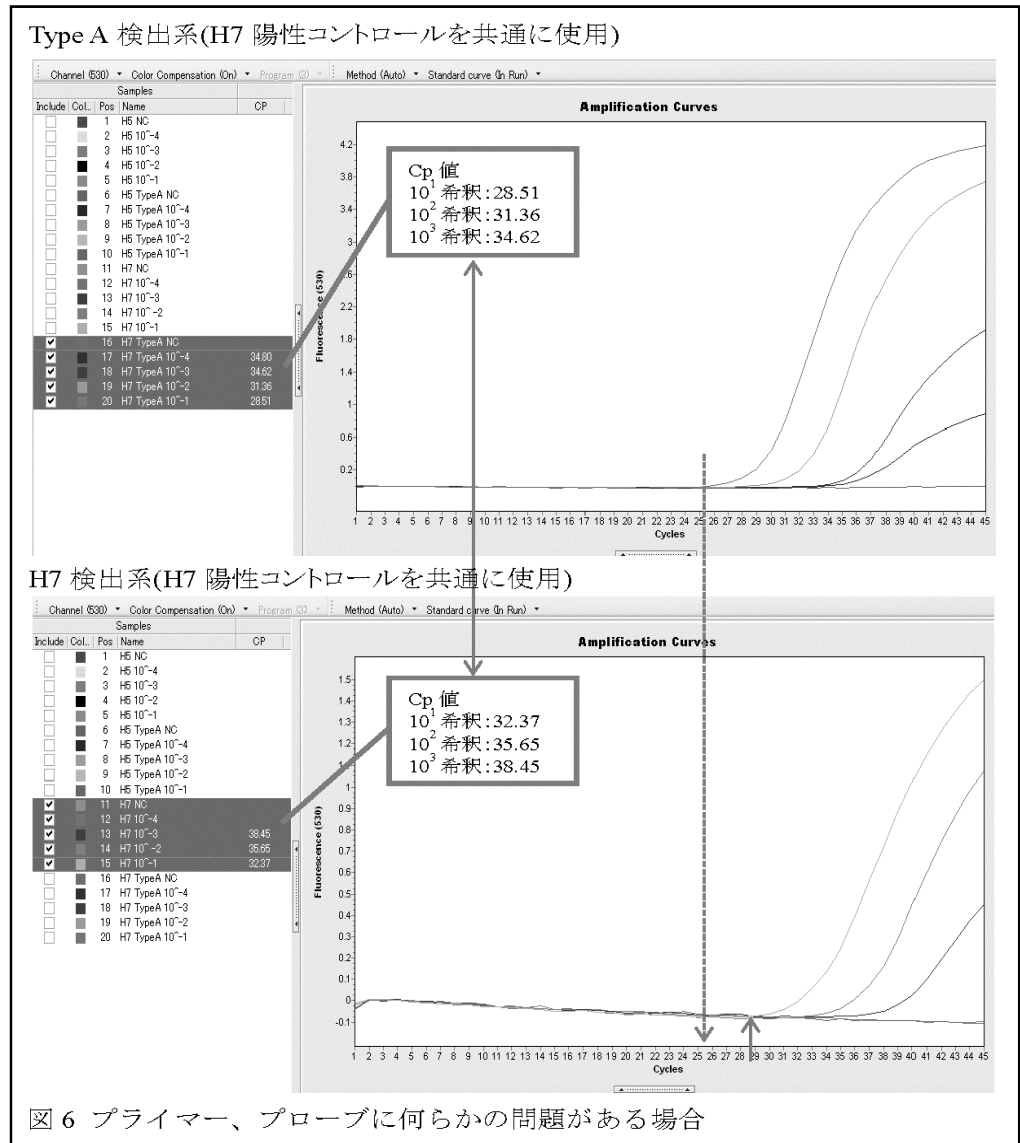


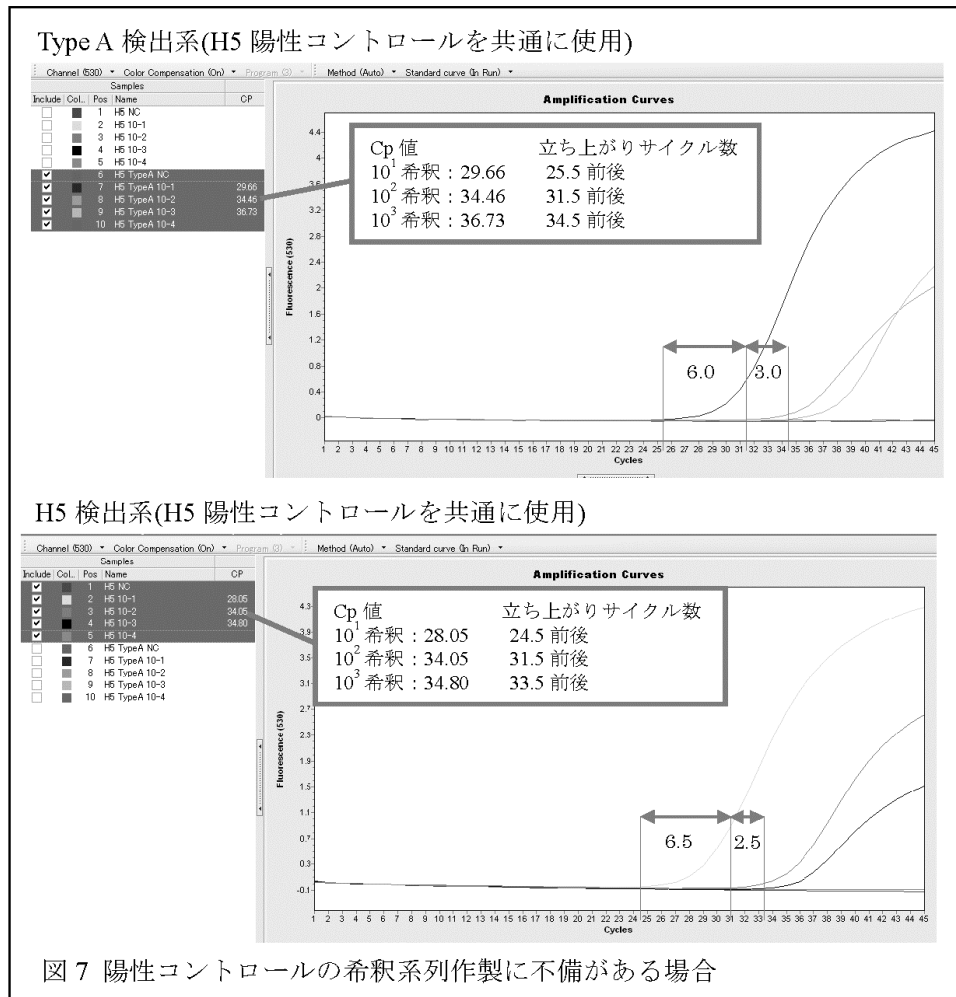
図 6 プライマー、プローブに何らかの問題がある場合



(添付資料 7)

(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が、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関わらず、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

(添付資料 7)

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)

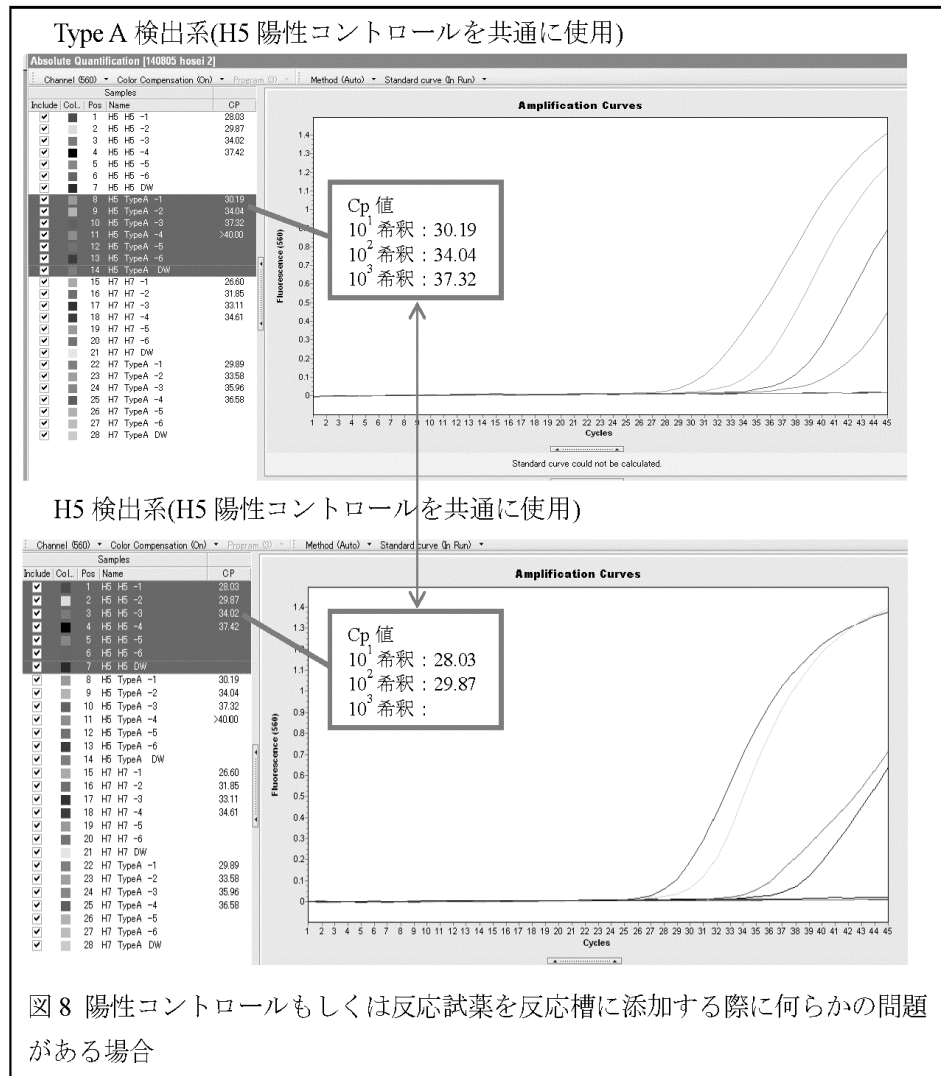
現象：同じ H5 陽性コントロールの希釈系列を用いて検査を行ったにも関わらず、希釈した陽性コントロールの間の Type A 検出系の Cp 値の間隔は想定される範囲内であり、ほぼ等間隔であるにもかかわらず、H5 検出系の Cp 値は等間隔になっておらず、波形も少し乱れている。また、 $10^1$  希釈液に対する Type A と H5 検出系の立ち上がりのサイクル数および Cp 値の間に若干乖離 (Type A が H5 検出系より遅れる) が見られる。

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 値の間に若干の乖離があり、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 値やシン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

(添付資料 7)

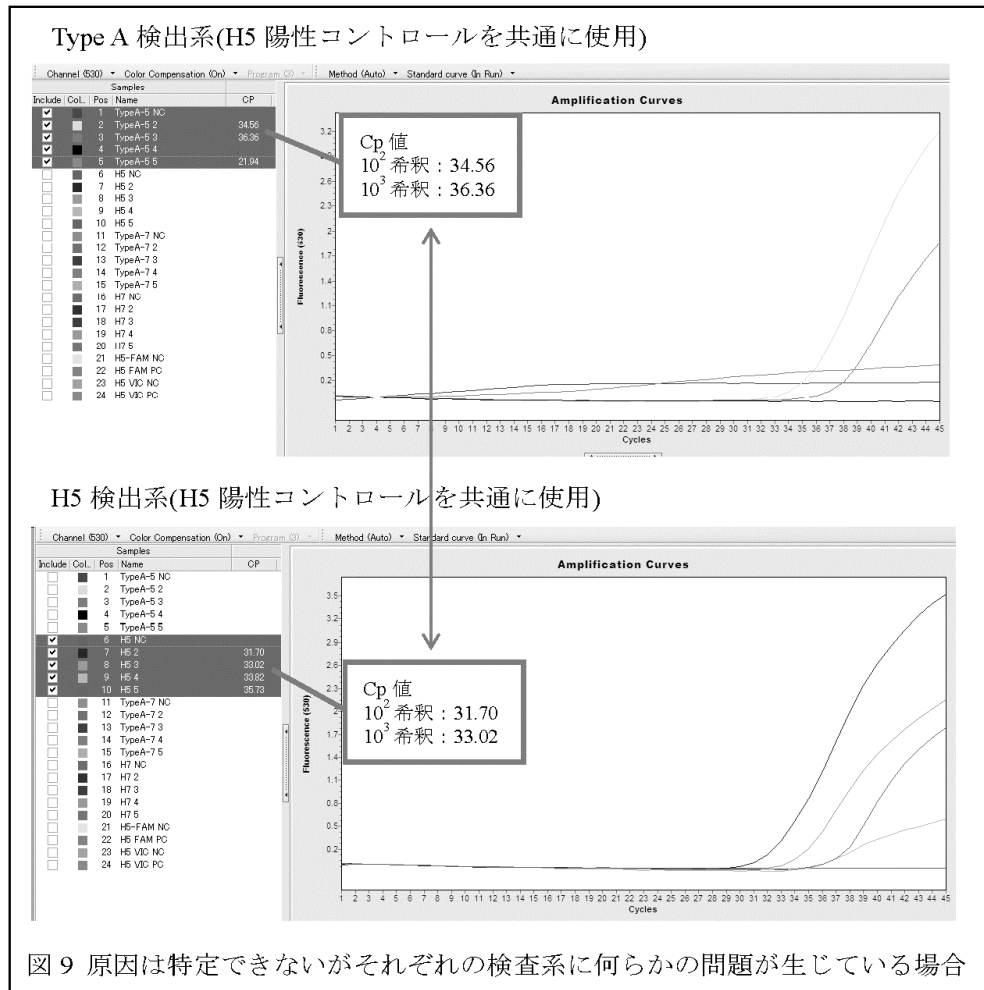
ブの取り扱いに習熟する必要があります。また、Type A 検出系のプライマー、プローブに何らかの問題がある場合は、第 6.(1)項で解説したような対応が必要になります。



(添付資料 7)

(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。

(添付資料 7)

(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。

(添付資料 8)

## 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。

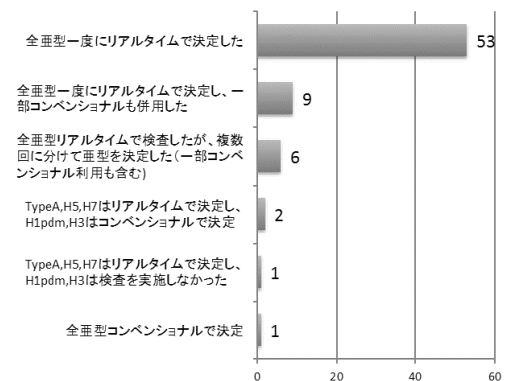
また、複数の作業員で EQA を実施した地衛研の中には、検査項目や作業内容等が作業員によって異なるケースも散見されました。作業員全員が同じ結果を得られるよう、また再現性良く正確で精度の高い検査を行うためにも、今一度、標準業務(作業)手順書や作業指示書等および検査記録書等を確認し、作業員間で統一した手順で検査を行う事をお勧めします。

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

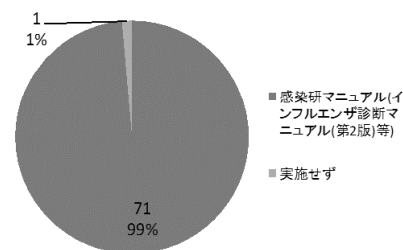
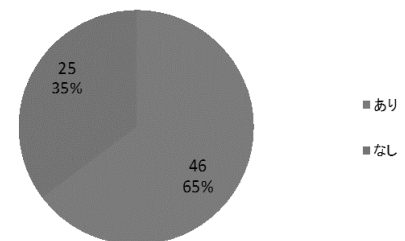


図3 Type A (M 遺伝子)検出系 プライマー、プローブレミックスの有無



(添付資料 8)

図4 Type A (M遺伝子)検出系  
プライマー、プローブ保存温度

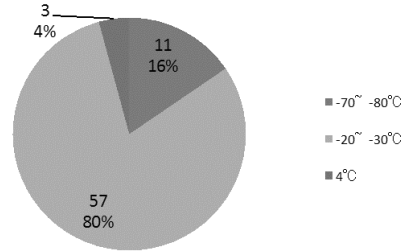
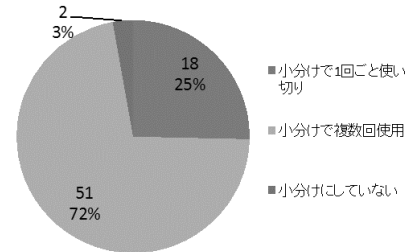


図5 Type A (M遺伝子)検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-2. H5 検出系について

図6 H5検出系 記載マニュアル

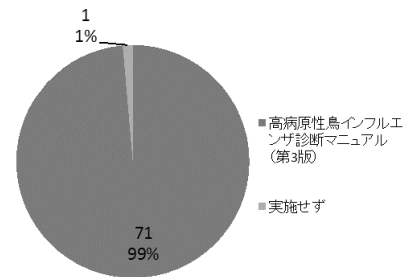


図7 H5検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無

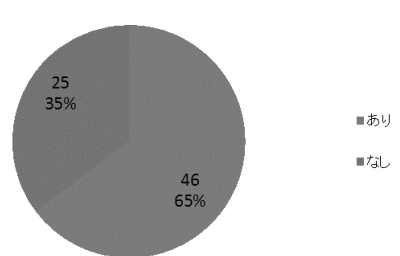


図8 H5検出系  
プライマー、プローブ保存温度

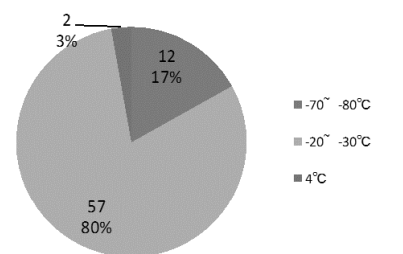
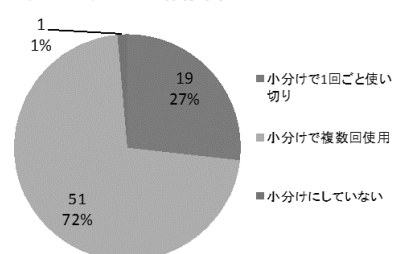


図9 H5検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-3. H7 検出系について

図10 H7検出系 記載マニュアル

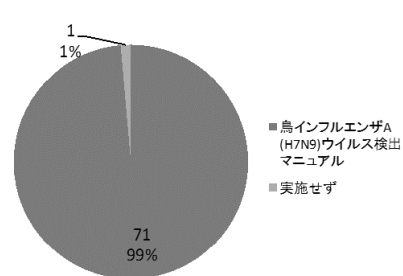
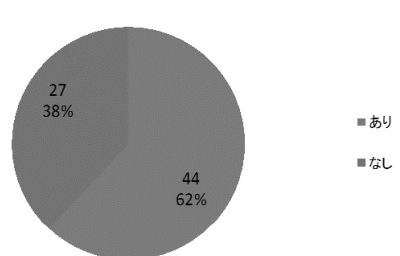


図11 H7検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無



(添付資料 8)

図12 H7検出系  
プライマー、プローブ保存温度

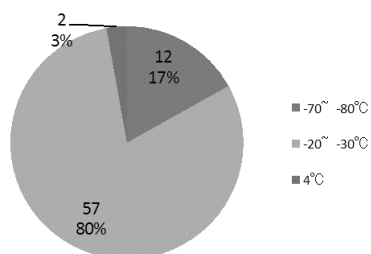
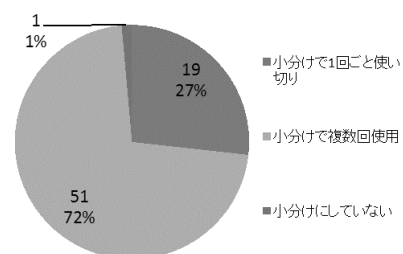


図13 H7検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-4. H1pdm 検出系について

図14 H1pdm検出系 記載マニュアル

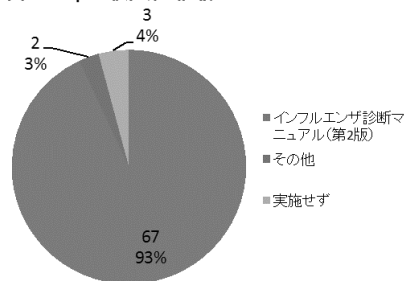


図15 H1pdm検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無

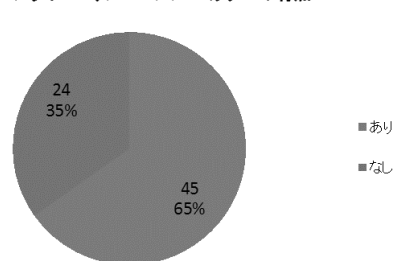


図16 H1pdm検出系  
プライマー、プローブ保存温度

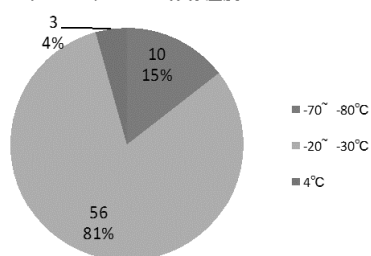
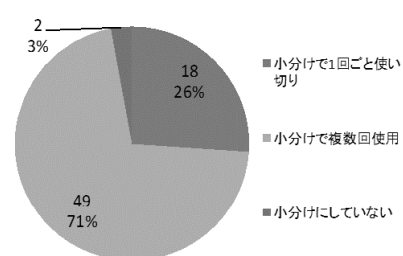


図17 H1pdm検出系  
プライマー、プローブ保存単位



2-5. H3 検出系について

図18 H3検出系 記載マニュアル

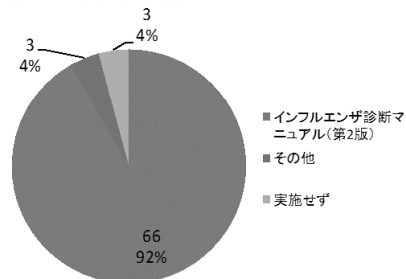
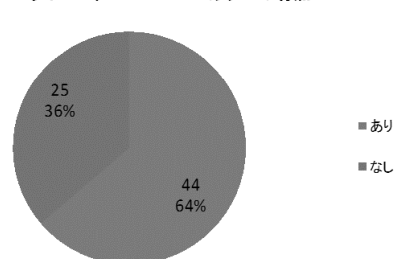


図19 H3検出系  
プライマー、プローブプレミックスの有無





(添付資料 8)

図20 H3検出系  
プライマー、プローブ保存温度

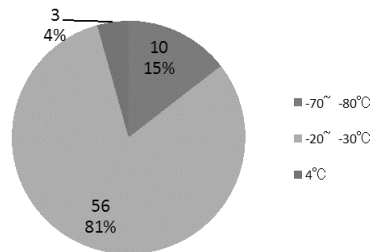
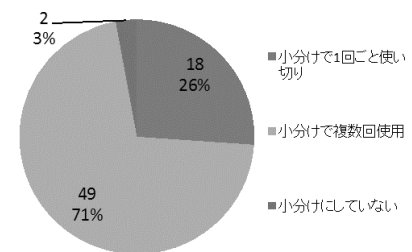


図21 H3検出系  
プライマー、プローブ保存単位



<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回ごとに使い切りにする事をお勧めします。

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

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

3. リアルタイム RT-PCR 試薬について

図22 使用キット名

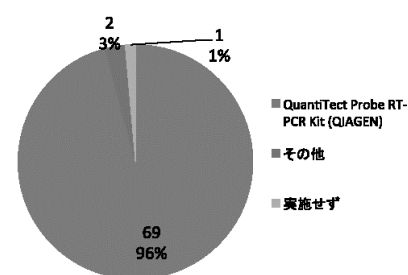
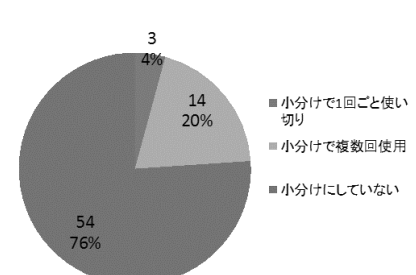


図23 試薬の保存単位



反応試薬については、QuantiTect Probe RT-PCR Kit 以外を使用している地衛研が数カ所見られました。配布マニュアルに記載されている反応条件、反応組成は、QuantiTect Probe RT-PCR Kit に最適化しています。他の試薬を同じ条件で使用した場合、検出感度や特異性が低下する可能性がありますので、反応条件、反応組成の最適化を行っていただく事をお勧めします。

試薬の保存と使用についてですが、小分けで複数回使用されている場合や小分けにしていない場合は、凍結融解の影響で試薬の劣化による検出感度の低下やコンタミネーションが起きる可能性が高くなりますのでご注意ください。

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

(添付資料 8)

図24 TypeA/H5(マーカー入)の保管温度

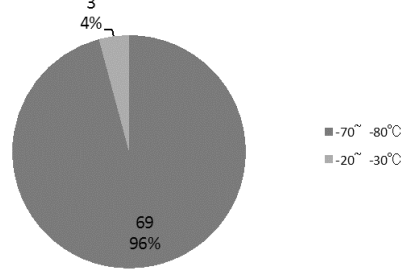
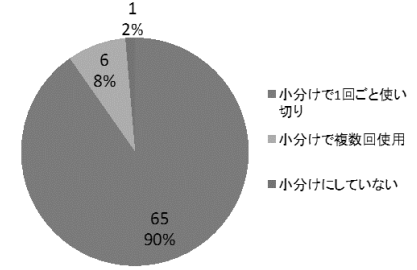


図25 TypeA/H5(マーカー入)の保存単位



4-2. TypeA/H7(マーカー入)の保管について

図26 TypeA/H7(マーカー入)の保管温度

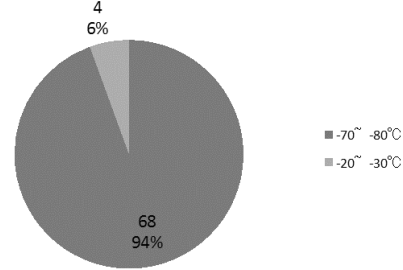
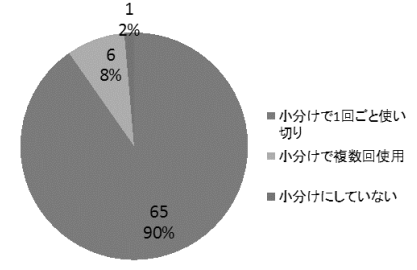


図27 TypeA/H7(マーカー入)の保存単位



4-3. TypeA/H1pdm の保管について

図28 TypeA/H1pdmの保管温度

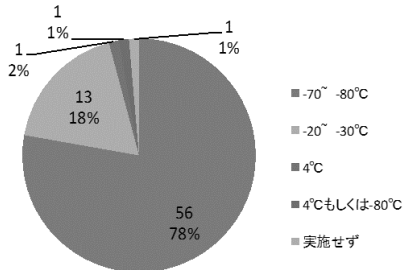
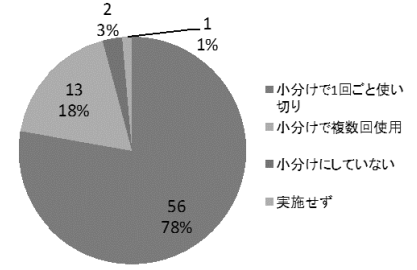


図29 TypeA/H1pdmの保存単位



4-4. TypeA/H3 の保管について

図30 TypeA/H3の保管温度

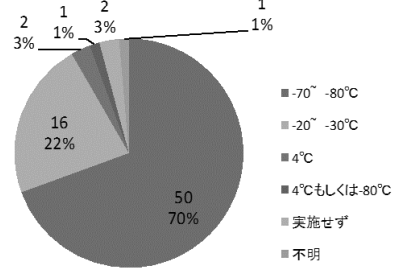
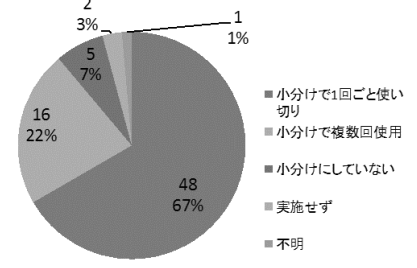


図31 TypeA/H3の保存単位



<コメント>

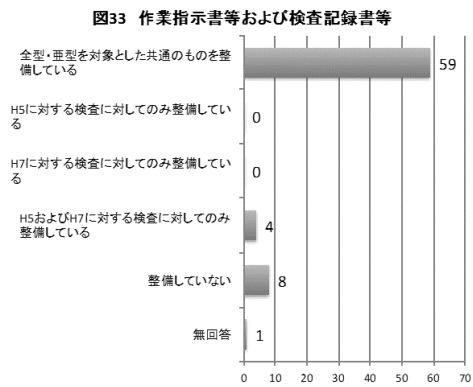
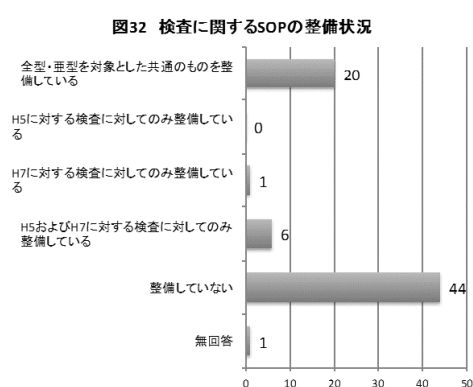
TypeA/H5、TypeA/H7(マーカー入)陽性コントロールは、必ず-70°C以下での保管をお願いいたします

(添付資料 8)

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)



<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)

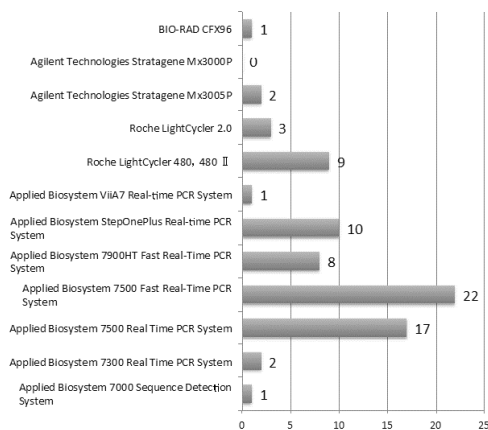
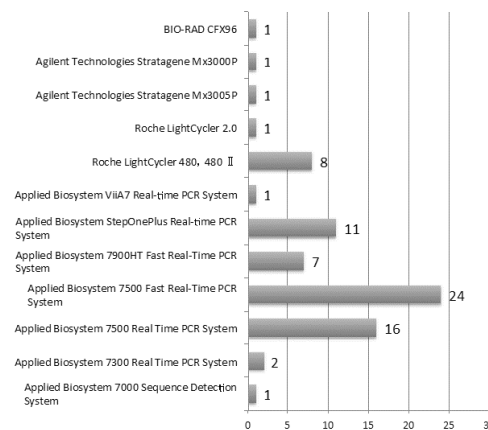


図35 今回のEQAで使用したリアルタイムPCR機の機種 (のべ74機種)



(添付資料 8)

図36 通常のインフルエンザ検査用機器の台数

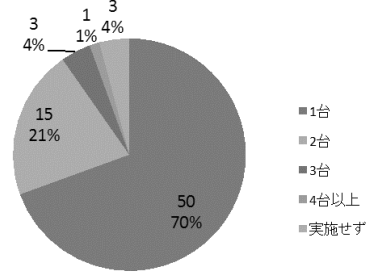


図37 通常検査のバックアップ用機器の台数

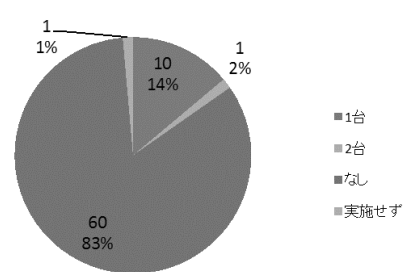
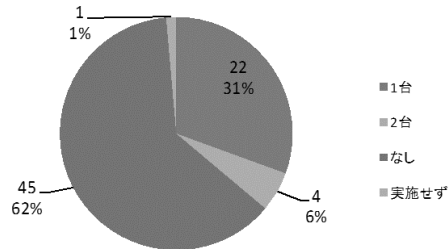


図38 パンデミック時用(通常は他の検査用)機器の台数



<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。

(添付資料9)

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 3 回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)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。

来年度からは改正感染症法の施行に伴う省令改正により、検査の精度管理の定期的実施および精度管理に関する外部調査の定期的受検など、精度管理への取り組みが大きく変わることになります。リアルタイム RT-PCR 法を用いた A 型インフルエンザウイルスの型・亜型診断検査につきましては、これまで EQA を実施した際に配布した資料や、今回配布しますリアルタイム PCR トラブルシューティングのためのフローチャートなども参考にいただき、貴所における PCR 検査全般の内部精度管理に役立てていただければ幸いです。

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などの検査環境はそれぞれ異なるため、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、検査に対する信頼性を高めるためには、内部精度管理だけでなく、外部精度管理による検査の精度評価も重要になります。

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型・亜型診断検査は、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、どれか一つに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 1 検体と RNA 抽出が必要な 5 検体を配布し、お送りいただいた検査結果(RNA 抽出が不要な 1 検体を指標にした Ct 値および総合判定)を元にして、検体からの RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR 法を用いた A 型インフルエンザウイルスの型・亜型診断検査の精度を評価しました。精度の高い検査が行えたのか、行えなかったとすればどこに問題があるのか、本 EQA ではその原因を特定できた場合は報告し(特定できない場合は原因を推定)、トラブルシューティングの実施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. 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて(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

(添付資料9)

ついて解説しましたので、まずはご一読下さい。また、トラブルシューティングをどのような流れで行うとよいか、インフルエンザウイルス研究センターでの考え方や実際の実施方法を別添の「3. トラブルシューティング時のフローチャート(PDF ファイル)」に参考までにまとめました。

また、各所より送付いただきました検査結果および総合判定結果を解析し、「4. 解析結果 2015\_地衛研名(Excel ファイル)」に総合判定結果へのコメント、<パネル検体の結果へのコメント>および<トラブルシューティングについて>を記載しましたので、貴所における検査精度管理の参考にしていただければ幸いです。なお、今回配布したパネル検体は全て、RNA 抽出および各リアルタイム RT-PCR 検査系に問題がなければ必ず検出できる RNA 濃度となっています。今回、これらが 1 つでも検出できなかった場合は、コメントおよび添付資料を参考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。

最後に、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「5. EQA2015 の結果およびアンケートの集計(PDF ファイル)」にまとめました。中には感染研マニュアル記載以外の試薬を使用して検査を実施している所もありますが、先述したように、感染研マニュアル記載の反応試薬、反応条件は高感度かつ特異的に検出できるように全検出系で最適化されています。感染研マニュアル記載以外の反応試薬、反応条件で検査を行った場合に検出感度や特異性が低下する事がありましたので、他の反応試薬を使用する際は、事前に検出感度や特異性について検証し、反応条件等を最適化して検査を実施していただく事をお勧めします。また、RNA 抽出キットについても同様に、他の RNA 抽出キットを使用される場合は、必ずそのキットの検証(抽出効率の評価)を行った上で検査を実施していただく事をお勧めします(キットによってはウイルス RNA が高濃度の場合には 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場合があることを確認しています)。

本 EQA はこれまで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」の一環で実施してきましたが、本年度は研究期間の最終年にあたり、本研究班での EQA 実施は今回が最後となります。来年度以降の EQA 実施については未定です。もし EQA を実施したとしても、今回のように各所毎に詳細なコメントは行わない予定です。今後はこれまでに配布した資料を参考にしていただき、貴所の検査精度管理にお役立て頂けますと幸いです。

本 EQA に関してご不明な点やご意見などがございましたら、下記にお問い合わせ

(添付資料9)

わせ下さいますようお願いいたします。また、トラブルシューティングを行う際に必要な比較検討用プローブ、プライマーですが、少量であればインフルエンザウイルス研究センターで使用しているものと同じものを配布する事が可能です。ご希望の際は下記にお問い合わせ下さいますようお願いいたします。

2016年2月29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

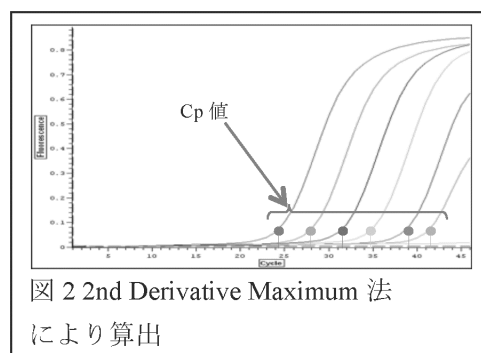
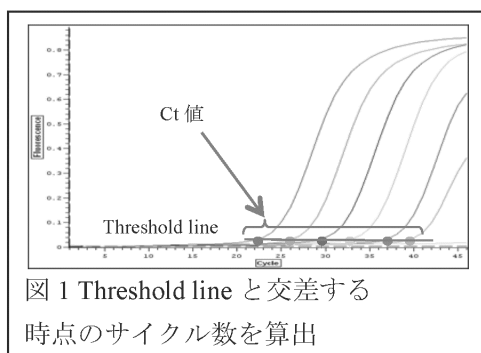
(添付資料 10)

## 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて

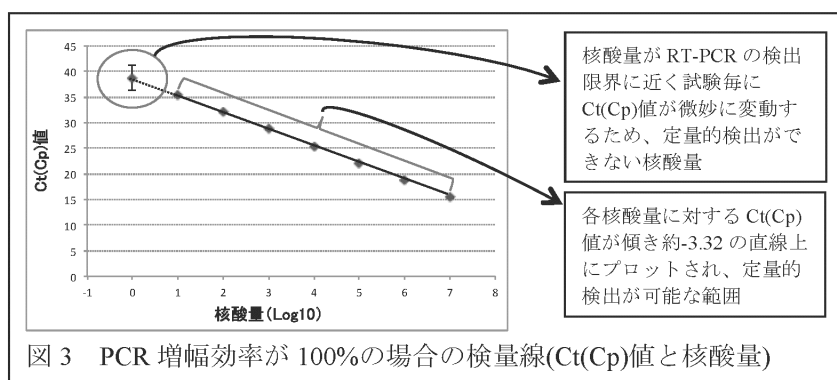
### 精度管理について

#### 1. 定量的 RT-PCR における 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)。また一部の機器においては他の解析方法を用いていることもあります。その 1 つに、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)値等として算出(2nd Derivative Maximum 法)する解析方法があり、本方法の場合、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)。



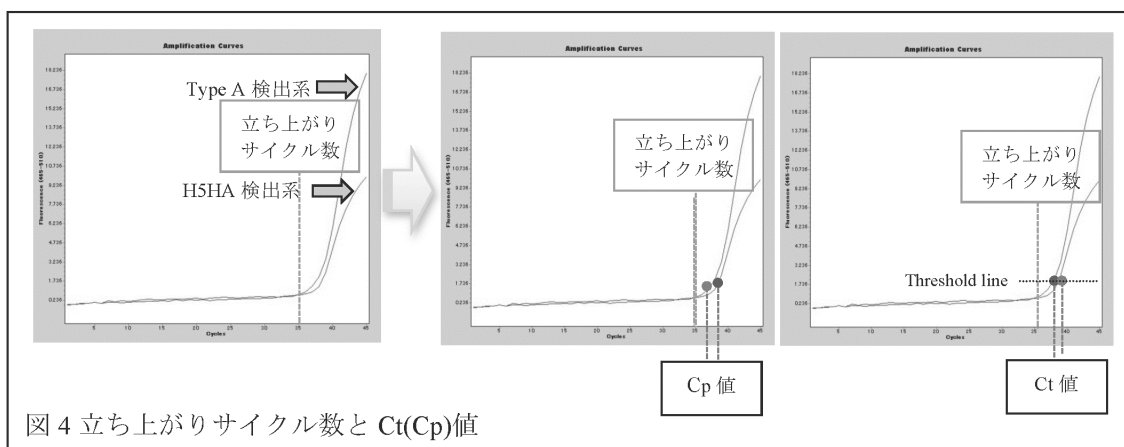


(添付資料 10)

2.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(TypeA(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。



3.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(識別マーカー入り)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、なお、Roche LightCycler480 システムの場合では、第 2 項に記載した理由により、Cp 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 Cp 値は大きくなります)。

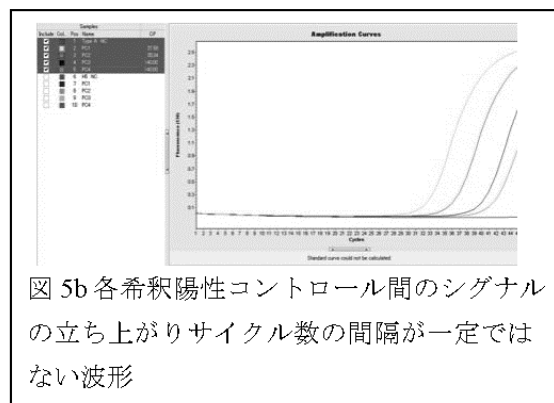
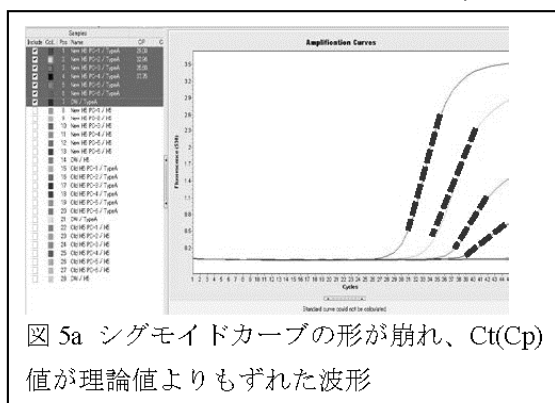
ただし、10 倍階段希釈を行った陽性コントロールに対する Ct(Cp)値の間隔は、検出系間で差はほとんど無く、検出系ごとで等間隔となり、効率よく PCR 増幅反応が進んだ場合は、概ね 3.2~3.5 の範囲内(100%の効率の場合は 3.32)となります(図 3 参照)。

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

(添付資料 10)

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(Ct(Cp)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、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。



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。

#### 4. 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。

#### 問題があった場合の予想される原因とトラブルシューティングの方法

A. 波形が全体的に汚い。再現性が低い(検査毎に、また作業者により異なる結果が出る、波形が乱れ Ct(Cp)値がばらつく場合)

**原因 1: 機器、解析方法問題がある**

#### **トラブルシューティングの方法**

リアルタイム RT-PCR に使用する機器は定期的なメンテナンスやキャリブレーションが必要

(添付資料 10)

です。まずは機器のメンテナンス状況を確認し、必要であれば機器のメンテナンスやキャリブレーションの実施を検討して下さい。また解析方法に問題が無いか、特にベースラインが低すぎないか確認し、必要であれば解析方法を検査毎に統一し検査を行うことをお勧めします。

## **原因 2：試薬調整方法（検査手技や微量ピペッターなどの不備）に問題がある**

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。

施設によっては複数のリアルタイム PCR 機器を使用し、同じサンプルであったとしても各機器で異なる Ct(Cp)値が得られる場合があります。しかし同一機器では同じ Threshold Line を設定し解析すれば、同じサンプルであれば毎回ほぼ同じ Ct(Cp)値が得られます。また異なる機器間でも、同じサンプルであれば大きく異なる結果になることはありません。

### **トラブルシューティングの方法**

- 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。
- 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。

(添付資料 10)

- ✓ 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も小さく、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、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。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。

B. 全ての検出系が遅れる。(全体的に感度が悪い)

**原因：反応試薬、RNA 抽出試薬等に問題がある**

Ct(Cp)値が過去の結果よりかなり大きい、全ての陽性コントロールの結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない、などの場合は反応試薬の劣化が疑われます。また、全ての陽性コントロールの結果では  $10^3$  希釈液まで陽性となるにも関わらず、RNA 抽出した検体の Ct(Cp)値が大きい又は検出できない傾向がある、などの場合は RNA 抽出試薬等に問題があると考えられます。その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 凍結保存が必要な試薬類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(特に冷凍保存が必要な試薬類は、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) 品質保証期限を過ぎた試薬を使用している

**トラブルシューティングの方法**

まずは試薬類が品質保証期限内であることを確認して下さい。保証期限内であっても劣化や問題があると疑われる場合は、新しい試薬を購入して古い試薬と比較検討し、原因究明を行うことをお勧めします。

- 反応試薬に問題があると考えられる場合、1 種類の検出系に対して、新しく購入した試薬の分注品と使用中の分注品の両方を並べて比較検討を行い、それで改善された場合は反応試薬の劣化を疑い、古い試薬の分注品を破棄し新たな反応試薬を使用します。

(添付資料 10)

- 反応試薬を新しくしても改善が見られない場合、プライマー、プローブの劣化による検出系の問題や、陽性コントロールの劣化が疑われるので、C 項、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。
- RNA 抽出試薬に問題があると考えられる場合、1 種類の検出系に対して、新旧の試薬で抽出をしたサンプルを並べて比較検討を行い、それで改善された場合は RNA 抽出試薬の劣化を疑い、古い RNA 抽出試薬を破棄し新たな RNA 抽出試薬を使用します。

新たに保管する反応試薬類が劣化しないように対策を講じて下さい(例：凍結融解の繰り返しを避けるため試薬類を小分け分注する、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)。反応試薬や RNA 抽出試薬に問題が生じた場合、鑄型となるウイルス遺伝子量の少ない検体などでは全く検出出来なくなる場合もあるので、全体的に Ct(Cp)値が過去の結果よりかなり大きくなった時には、直ちにトラブルシューティングを行うことをお勧めします。

C. 特定の陽性コントロールの結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない、もしくは、Ct 値が過去の結果よりかなり大きい。

原因：特定の陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある

このようなケースでは、 $10^3$  希釈液まで陽性とならない陽性コントロールの劣化が疑われ、その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 陽性コントロールのワーキングストック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(陽性コントロールは RNA のため、マスターストック、ワーキングストック共に  $-70$  度以下で保存することをお勧めします。また濃い濃度で保存し、あらかじめ作製した希釈系列を保存することはお勧めしません。  $-20$  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、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) 陽性コントロールのワーキングストックを作製する際の希釈作製が不正確

また、特定の陽性コントロールの特定の検出系の結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない場合は、その検出系のプライマー、プローブの劣化も疑われるため、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。

**トラブルシューティングの方法**

- 劣化が疑われる陽性コントロールをマスターストックから希釈し直します。新旧両方の陽性コントロールを並べて比較検討を行い、それで改善された場合はワーキングストックの劣化を疑い、古いものは破棄し、新たに作製したワーキングストックへ更新します。
- ワーキングストックを更新しても改善が見られない場合は、マスターストックの劣化が疑われるので、陽性コントロールの更新を検討して下さい。H5 および H7 陽性コントロールの再分与については、感染研までご連絡下さい。

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

(添付資料 10)

ものを使用して下さい。また、新たに保管する陽性コントロールのワーキングストック、マスターストック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、など)。

D. 特定の検出系が全体的に乖離する。(遅れる)

**原因 1：特定の検出系のプライマー、プローブに問題がある**

このようなケースではシグナルの立ち上がりサイクル数が遅れた検出系(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)に何らかの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希釈作製が不正確

**トラブルシューティングの方法**

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。基本方針として TypeA 検出系を基準検出系として各亜型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA 検出系に問題がある場合は、最初に TypeA 検出系のトラブルシューティングを行って下さい。問題のない TypeA 検出系を基準に各亜型の検出系のトラブルシューティングを実施して下さい。

- まずはプライマーのみ新しいものを用意し、新旧のプライマーを使用した検出系を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。
- プライマーを変更しても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新しいものを用意し、新旧のプローブを使用した検出系を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)。劣化が進むと鋳型となるウイルス遺伝子量の少ない検体などでは全く検出出来なくなる場合もあるので、Ct(Ct)値に乖離が見られるようになった時には直ちにトラブルシューティングを

(添付資料 10)

行うことをお勧めします。

#### 原因 2：ウイルスが変異した

まれにウイルスが変異し、TypeA 検出系と HA 検出系の Ct(Cp)値が乖離する場合があります。これは乖離した検出系のターゲット核酸に変異が入っているためであると考えられます。ウイルスの変異が疑われる場合には、検出系の更新を検討する必要がありますので、感染研にご一報いただくと幸いです。

E. 特定の検出系で、 $10^1 \sim 10^3$  希釈陽性コントロールの結果が等間隔に立ち上がっていない。

原因：試薬類の調整方法、陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある。

A 項を参照し陽性コントロールの希釈方法や試薬調製方法に問題が無いか、C 項を参照し陽性コントロールに問題がないか、D 項を参照し検出系のプライマー、プローブに問題がないか、等を確認し適切なトラブルシューティングを行って下さい。

F. TypeA 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られる

原因 1：陽性コントロールがコンタミしている

このようなケースでは検査の操作の何れかの段階で陽性コントロールが反応試薬もしくは検体にコンタミしてしまった可能性が考えられます。たとえば検体処理用安全キャビネット内で陽性コントロール作製を行い、検体添加用安全キャビネット内で陽性コントロールの添加を行うなど、陽性コントロールを扱う操作を、検体を扱うエリアと同じエリアで行うと、陽性コントロールの検体へのコンタミネーションの危険性は増大します。

#### トラブルシューティングの方法

- 各エリアを次亜塩素酸で拭きあげて下さい。またその時に汚染が拡大しないよう留意し、エリア毎に使い捨て紙タオルを用いるなど個別に清掃して下さい。
- 汚染したと考えられる微量ピペッターを交換もしくは清掃（製品に添付の取扱説明書をご参照のうえ、可能な範囲内で内部の部品を含め次亜塩素酸で清掃後、蒸留水で十分すすぎ、清浄な環境下で乾燥させる）して下さい。オートクレーブは使用しないで下さい（オートクレーブを使用しても核酸を取り除く事はできません。核酸が蒸気とともに拡散し、他のものも汚染する可能性があります）。
- 上記の対策を講じてもコンタミネーションが続く場合、RNA 抽出試薬を新しいものにする、反応試薬を新しいものにする、プライマー、プローブをマスターストックから作り直す、の順で試薬類を新しいものにかえ、古い試薬類は廃棄して下さい。
- 全ての作業をキャビネット内で行う必要性は無いため、エリアが限られる場合は陽性コントロールの調製・添加は、実験台の上で行うなどし、また、エリアを分けられない場合は、次回以降の検査へ影響しないよう、1 回ごとの検査後にクリーンアップするなどして下さい。一人で検査を行う場合は、反応試薬調製後、プレートへ分注した後、検体から RNA 精製を行

(添付資料 10)

い、反応液への検体添加を行い、最後に陽性コントロール調製および添加を行った方が、陽性コントロールによるコンタミネーションの危険性は低減します。一度コンタミネーションが起きてしまうと、エリアの清浄化や微量ピペッターの交換や清掃、試薬類の総入れかえなど、多大な労力と経済的な負担がかかるため、日頃から十分注意して検査を行って下さい。

**原因 2：検体によるクロスコンタミネーションが起きている。**

原因 1 の陽性コントロールのコンタミネーション以外にも、RNA 抽出時あるいは抽出した RNA を反応試薬に添加する際に、検体間でクロスコンタミネーションが起きてしまった可能性も考えられます。

他の検体では複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られない場合などは、検体間のクロスコンタミネーションの可能性が低いと考えられます。その場合は、対象検体のみを再度 RNA 抽出から行い、再検査(他の検体と同時に検査しない)を行って、同じ結果が得られるかどうか確認する事をお勧めします。

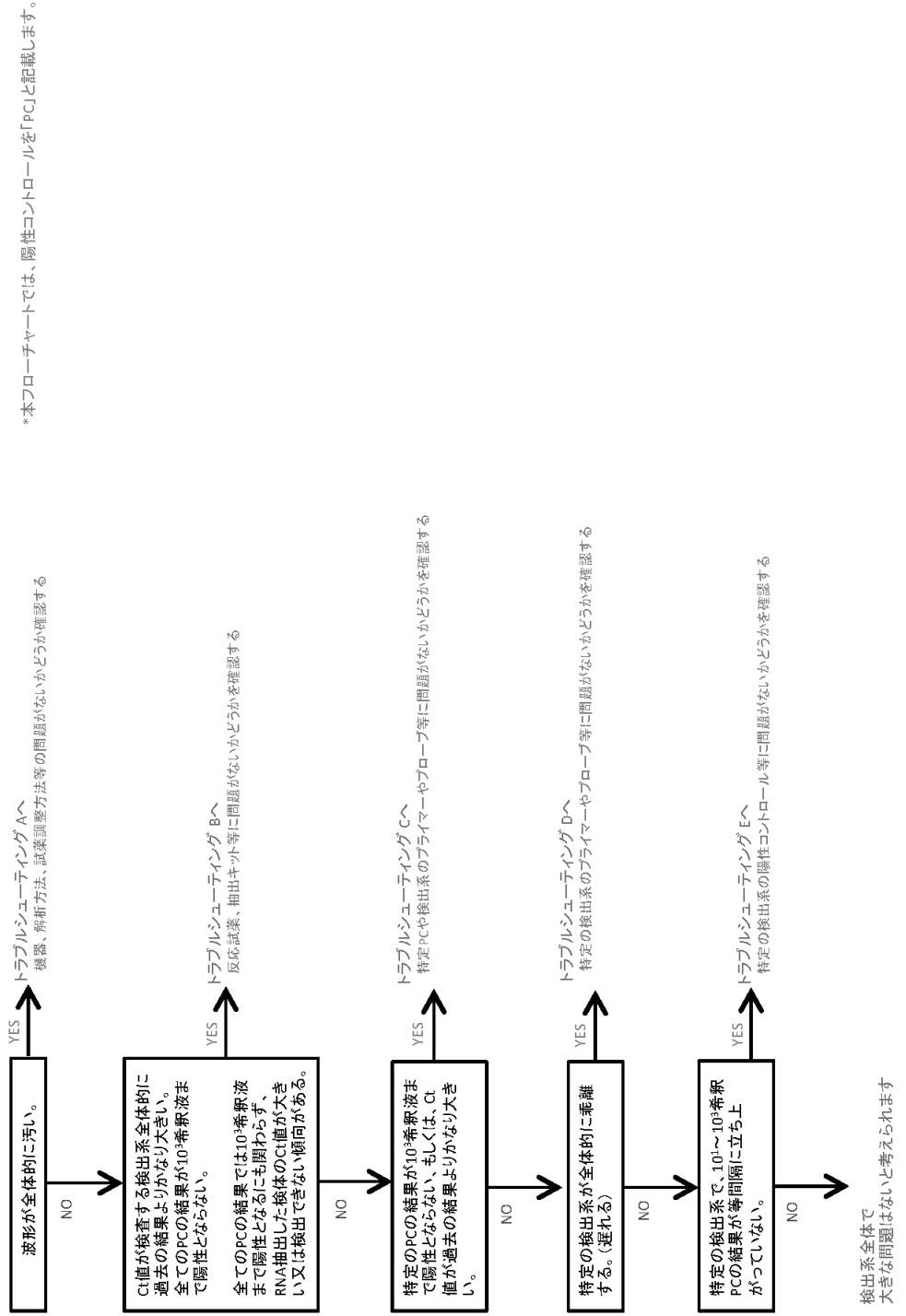
**原因 3：重複感染例の患者からの検体である**

複数の型・亜型のインフルエンザウイルスが同時に感染している重複感染例の患者からの検体である場合、TypeA 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られることがあります。先述したコンタミネーションによる誤った結果ではないことを見極めた上で、重複感染の可能性について考慮するようにして下さい。

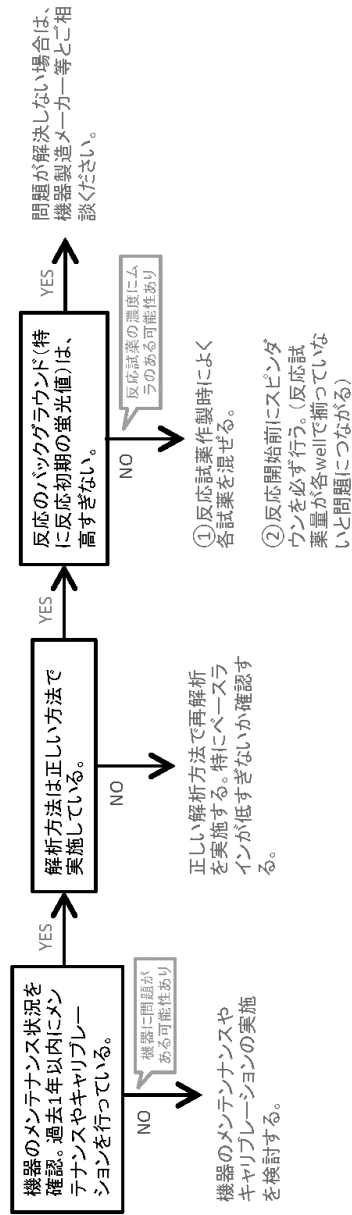


(添付資料11)

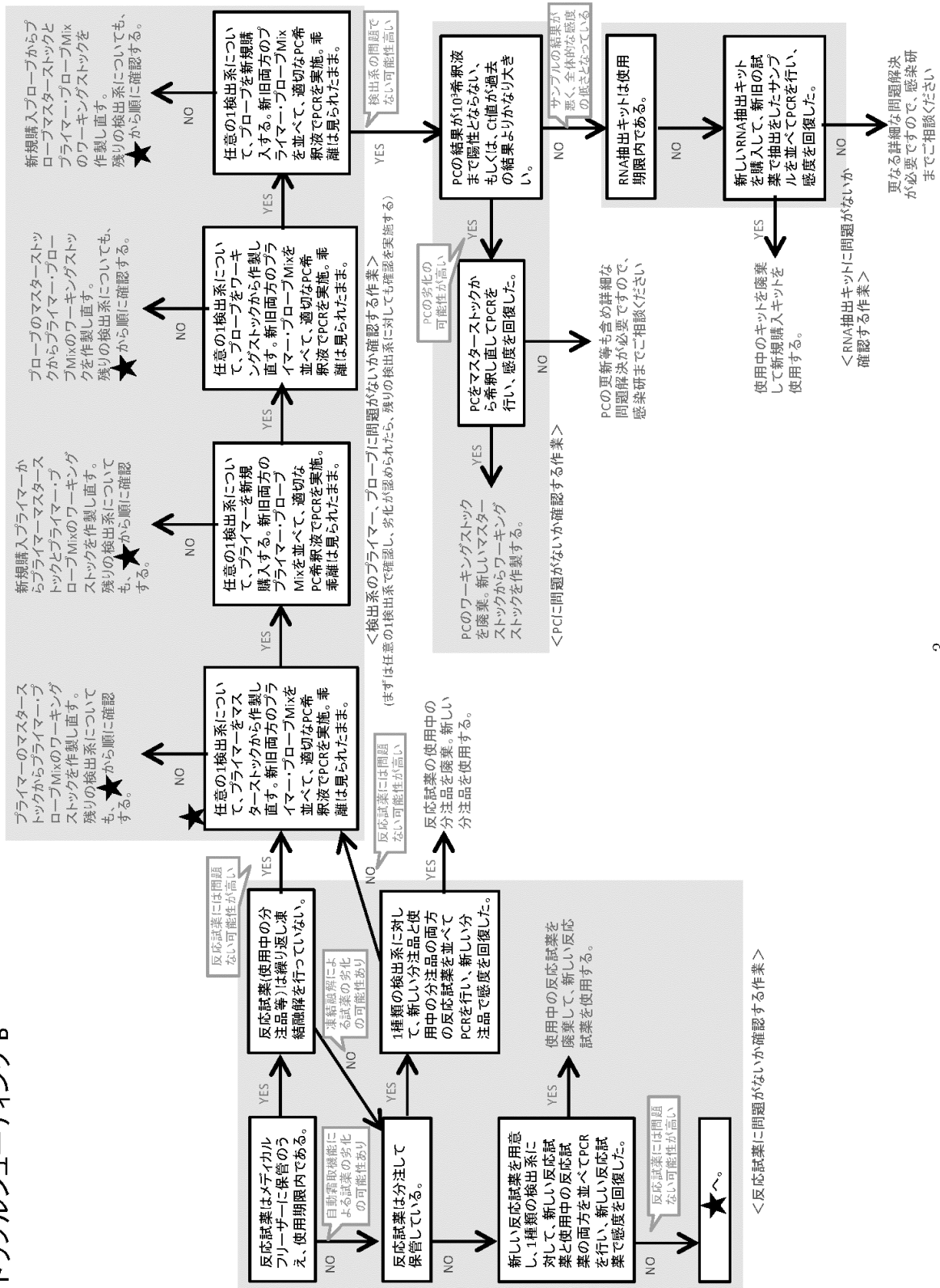
- \* 問題は、何度も同じように発生していますか？まずは、過去の検査結果等を見直し、問題点が再見されていることをご確認ください。再見されている場合は、本フローチャートにしたがって、適切なトラブルシューティングを行ってください。
- \* 問題が再見されない場合（再現性が低い場合や検査毎・作業者毎に異なる結果が出る場合は、試薬調製方法やコンタミネーションが発生している可能性も考えられます。別添の「2. 精度管理と問題時のトラブルシューティング」についてを参照のうえ、適切なトラブルシューティングを行ってください。



(添付資料11)  
 トラブルシューティング A



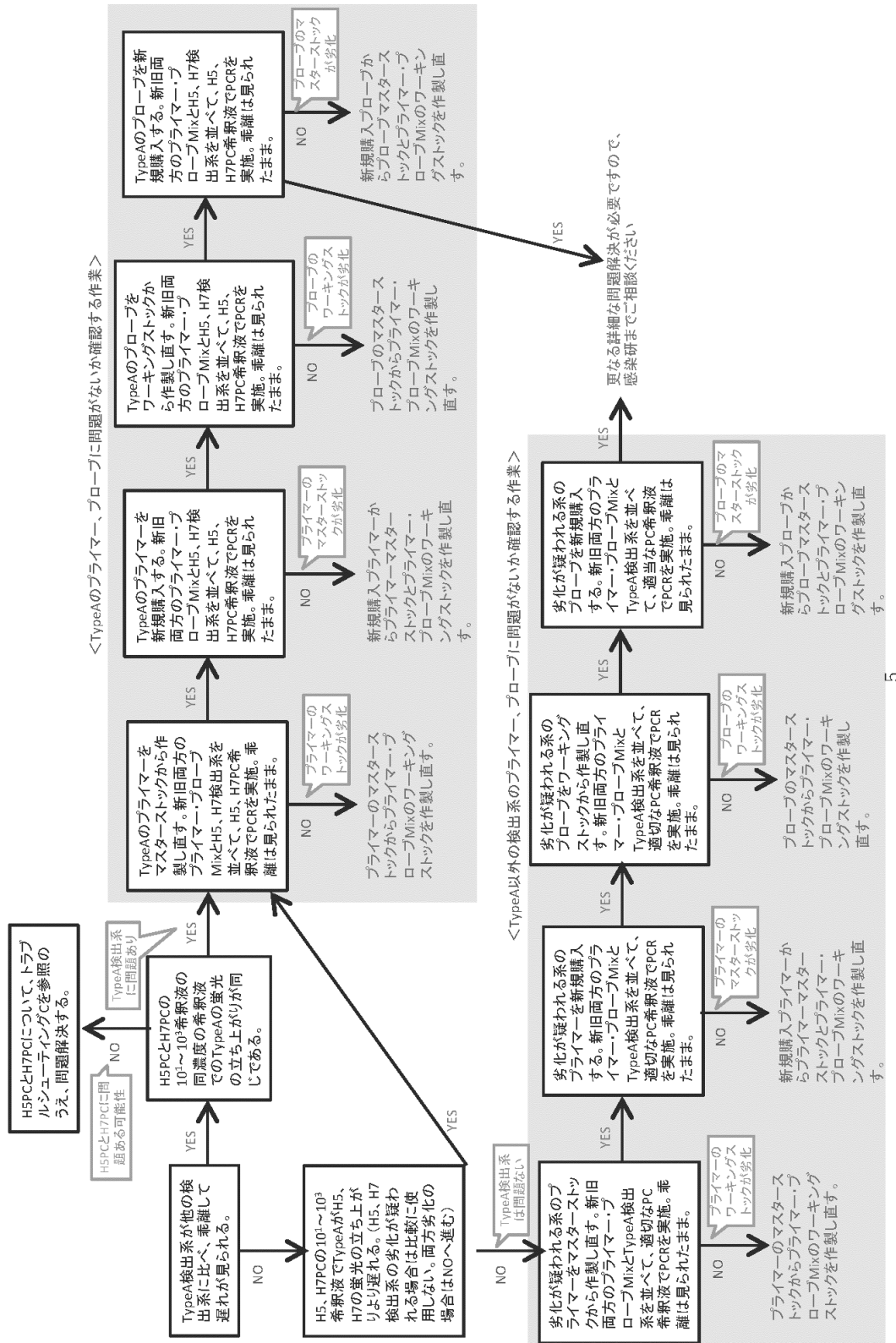
(添付資料11)  
トランプルシチューティングB





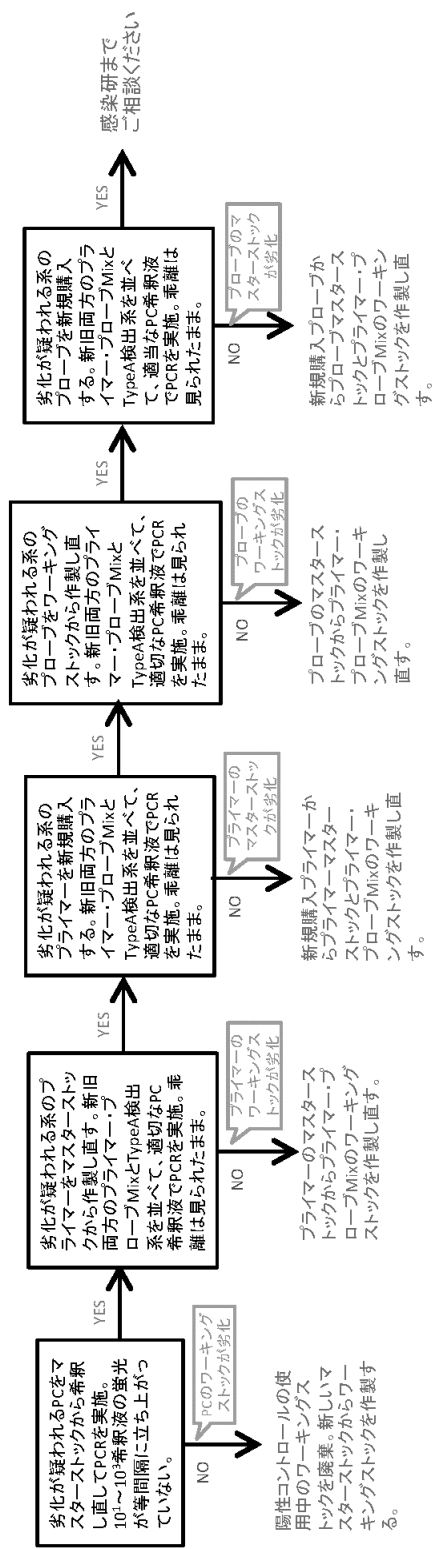
(添付資料11)  
**トラブルシューティングD**

\* TypeAを基準検出系として各垂型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA検出系に問題がある場合は、最初にTypeA検出系のトラブルシューティングを行ってください。  
 TypeA以外の系に問題が見られる場合は、問題のないTypeA検出系を基準にトラブルシューティングを実施してください。



(添付資料11)  
**トラブルシューティング E**

\*トラブルシューティング前に、PCの希釈の手順がきちんと行われていることを確認する。各希釈液は、15秒ボルテックス+10回転倒混和を行い、よく攪拌する。また、希釈液作製時は10倍濃い溶液を50μL以上持ち込んで希釈(50μL+450μLなど)を行うと、より誤差の少ない分取・分注を行うことができる。



## EQA2015 の結果およびアンケートの集計

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 73 地衛研からの結果記入ファイルに記載いただいたアンケート内容を集計し、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、RNA 抽出が必要な検体 A(H1pdm)、B(H7)と RNA 抽出が不要な検体 F(H5)および F(陰性検体)については、全ての地衛研で正確に診断が行われていました。一方、RNA 抽出が必要な検体 C(H3)および D(H5)については、一部の地衛研で正確に診断できていませんでした。特に検体中の RNA 濃度が低い検体 C(H3)については、効率の良い RNA 抽出が行えずに検出できなかった、あるいは H3 検出系の検出感度が低下して検出できなかった、などが考えられます。

なお、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。

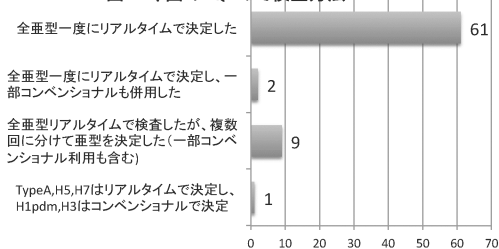
表1 今回のEQAの正答率

パネル検体	亜型	濃度* (copies/ $\mu$ L)	RNA抽出	正答数**
A	H1N1pdm09	80	必要	73/73 (100%)
B	H7N7	80		73/73 (100%)
C	H3N2	8		69/73 (95%)
D	H5N2	200		72/73 (99%)
E	Negative			73/73 (100%)
F	H5N1	80	不要	73/73 (100%)

\*各検体の濃度は、500 $\mu$ Lの水で溶解後のおよその濃度です。

\*\*正答数については、各パネル検体に対して、各所で記入された「総合判定結果」シートの結果を集計した

図1 今回のEQAでの検査方法



## 2. 各検出系の反応組成、反応条件について

## 2-1. TypeA(M 遺伝子)検出系について

表2 TypeA検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
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)等)	71
感染研マニュアルから一部変更	2

(添付資料12)

## 2-2. H1pdm 検出系について

表3 H1pdm検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	70
感染研マニュアルから一部変更	2
実施せず	1

## 2-3. H3 検出系について

表4 H3検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	69
感染研マニュアルから一部変更	3
実施せず	1

## 2-4. H5 検出系について

表5 H5検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	71
感染研マニュアルから一部変更	2

## 2-5. H7 検出系について

表6 H7検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出マニュアル	71
感染研マニュアルから一部変更	2

## 2-6. その他の記載内容について

表7 その他検出系 記載マニュアル

検出系	記載マニュアル	地衛研数
H1N1連型	インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	10
N1	高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	2
TypeB	インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	1

### <コメント>

いくつかの地衛研で感染研マニュアル記載以外の試薬を使用して検査を実施している所がありました。感染研マニュアル記載の反応試薬、反応条件は高感度かつ特異的に検出できるように全検出系で最適化されています。感染研マニュアルに記載以外の反応試薬、反応条件で検査を行うと検出感度や特異性が低下する場合がありますので、反応試薬や反応条件を変更する際は、事前に検出感度や特異性について検証を行い、反応条件等を最適化した上で検査を実施するようにして下さい。

2

2



(添付資料12)

### 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。

3

3

(添付資料13)

<報告して下さった総合判定結果>

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. POR法での結果、A/H1 pdm	conv. POR法での結果、A/H7	conv. POR法での結果、A/H3	conv. POR法での結果、A/H5	conv. POR法での結果、陰性	conv. POR法での結果、A/H5

<総合判定結果へのコメント>

全てのハネル検体について、正しく判定できていました。

<報告して下さったハネル検体の結果>

ハネルの型型	RNA抽出必要なハネル				抽出不要ハネル	
	検体A H1N1pdm09	検体B H7N7	検体C H3N2	検体D H5N2	検体E H5N1	検体F H5N1
データ1	80	80	8	200	80	80
Type A 型型	31.1	32.1	35.5	30.5	32.5	32.5
Type A 型型	32.2	32.7	38.0	31.9	32.7	32.7
Type A 型型	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Type A 型型	0.0	32.4	35.0	30.9	31.8	31.8

\* 各検体の濃度は、500 μLの水で希釈後のおおよその濃度

<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。

<ハ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高く出ているため、再検査を実施していますが、増幅曲線がきれいに確認できていた場合は、陰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、反希釈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ドカード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陰性となっていれば、検査の検出感度は相対できると考えられます。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老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。



## 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 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

岸田 典子 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  
主任研究官

### 研究要旨

患者検体からウイルス分離/検出を行う地方衛生研究所（地衛研）職員の経験不足や技術力低下が指摘されるなど、日本のインフルエンザウイルス株サーベイランス機能の低下が懸念されている。本研究では、日本の株サーベイランス体制の強化と改善を資することを目的に、地衛研におけるウイルス分離培養検査体制についての現状調査を実施した。さらに、検査体制に問題のある地衛研に対して検査技術の支援を行った。平成 25 年度は全国の地衛研を対象にウイルス分離検査体制に関するアンケート調査を実施し、検査体制に問題のある地衛研を特定した。平成 26 年度は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。また、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 年度は分離検査体制についての 2 回目のアンケート調査を実施し、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。また、研修の要望があった地衛研を対象に実地研修を行った。

### A . 研究目的

患者から分離されたウイルスは、ウイルスの性状解明には欠かすことのできないものである。さらに、国内に侵入した新型ウイルスのヒトに対するリスク評価を行う際にも分離ウイルスは無くしてはならないものである。

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。しかしその一方で、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、地衛研における株サーベイランス業務の的確な遂行が困難になりつつある。

本研究では、日本のインフルエンザウイルス株サーベイランス体制の強化と改善を目的に、地衛研におけるウイルス分離培養検査体制についての現状調査を実施した。

さらに、検査体制に問題のある地衛研に対しては、検査技術の支援を行った。

## B . 研究方法

1)日本のインフルエンザウイルス株サーベイランス体制の現状と問題点を把握するために、全国の地衛研を対象にインフルエンザウイルスの分離検査技術に関するアンケート調査を実施した。

2)アンケート調査に基づいて検査体制に不備があると考えられる地衛研を対象に電話によるヒアリング調査を実施した。

3)検査体制に問題のある地衛研を対象に実地研修を行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C . 研究結果および考察

1)ウイルス分離検査体制に関するアンケート調査

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に、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、72 カ所の地衛研から回答が得られた。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をたずねたところ、3 シーズン連続して分離効率の低い研究機関が 1 割程度あったが、ほぼ半数の研究機関は、高い効率で分離していた。多くの研究機関はウイルス分離に用いる培養細胞を概ね適正に維持管理していることもわかった。

一方、人事異動によって担当職員が頻繁に入れ替わることから、地衛研でのウイルス検査技術に関する知識や技術の継承が非常に困難であるとの意見が多数寄せられた。

2)ウイルス分離検査体制に対する聞き取り調査

過去 3 シーズン (2010/11、2011/12、2012/13)において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。その結果、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。一方、調査対象となった地衛研の多くは培養細胞を適切に管理維持できていないことがわかった。

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全く設けることができない地衛研が存在することが、この調査からも判明した。

3)ウイルス分離検査体制に対する 2 回目のアンケート調査

全国の地衛研を対象にウイルス分離検査体制についての 2 回目のアンケート調査を実施し、77 カ所の地衛研から回答が得られた。2014/15 シーズンにおける分離効率について質問したところ、回答した研究機関の約半数は 75%以上の高い効率で分離していることがわかった。しかし、25%未満の低い効率でウイルスを分離していた機関が 1 割程度あり、このうちの約半数は前回の調査から分離効率が改善していなかった。

4)ウイルス分離検査の実地研修

研修の要望があった 2 ヶ所の地衛研を対象に実地研修を行った。2 機関とも前任者からの引き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から、両機関における担当者は、ウイルス分離技術に関する基本的な内容について十分に理解していなかった。研修では、それぞれの機関における現行法の問題点を確認し、改善

策を助言した。

#### D . 考察

ウイルス分離検査担当者が交代する際、引き継ぎが一切行われていない、あるいは不十分な形でしかなされていない地衛研があることがアンケート調査及び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。新型ウイルスは、いつ何時どこから国内に侵入するのか予想することはできない。その侵入を早期に捉え、リスクを適正に評価するためには、全国地衛研が一律の精度でウイルスを分離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、日本における株サーベイランス体制の維持を図っていく必要がある。

加えて、検査結果の信頼性を保証するための精度管理体制を各地衛研に構築することも必要である。これを実行することで、全ての地衛研がウイルス分離検査を一定水準以上の精度で行える基盤が国内に整備され、日本の株サーベイランス体制の機能強化が図れると考えられる。

#### E . 結論

地衛研のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状を調査し、検査体制に問題のある地衛研を特定した。問題のある地衛研に対して、研修などの技術支援を実施した。

#### F . 研究発表

#### 1 . 論文発表

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, R.P., Shichinohe, S., Okamoto, 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, A.J., Zhong, G., Fan, S., Ping, J., Maher, E.A., Hanson, A., Uchida, Y., Saito, T., Ozawa, M., Neumann, G., Kida, H., Odagiri, T., Paulson, J.C., Hasegawa, H., Tashiro, M., Kawaoka, Y.: Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature* 501:551-555, 2013.

Yang, T., Kataoka, M., Ami, Y., Suzaki, Y., Kishida, N., Shirakura, M., Imai M., Asanuma, H., Takeda, N., Wakita, T., Li, T.: Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J. Gen. Virol.* 94:2647- 2656, 2013.

Kishida, N., Imai, M., Xu, H., Taya, K., Fujisaki, S., Takashita, E., Tashiro, M. Odagiri, T.: Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66:549-551, 2013

Wilker, P. R., Dinis, J. M., Starrett, G., Imai, M., Hatta, M., Nelson, C. W.,

O' Connor, D.H., Hughes, A.L., Neumann, G., Kawaoka, Y., Friedrich, T.C.: Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses. *Nat. Commun.* 4:2636, 2013

Imai, M., Herfst, S., Sorrell, E.M., Schrauwen, E.J., Linster, M., De Graaf, M., Fouchier, R.A., Kawaoka, Y.: Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals. *Virus Res.* 178:15-20, 2013

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

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

Herfst S, Imai M, Kawaoka Y & Fouchier RA. Avian influenza virus transmission to mammals. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 385:137-155, 2014

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

今井正樹 中国で発生した鳥インフルエンザ A(H7N9)について 第47回日本ウイルス学会北海道支部会夏季シンポジウム、北海道奈井江町、7月(2013)

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

なし





## 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

計算科学の諸技術を株サーベイランス体制強化に活用した。研究代表者と共同で、インフルエンザの疫学・ウイルス学・計算科学の研究を統合的に実施する連携体制と環境を整えた。この基盤を用いて、高度危険性が疑われた薬剤耐性株（H1N1pdm09札幌株）の感染の終息を予測した。また中国で発生したヒト感染能をもつトリA（H7N9）株の流行リスクを高めるHAリスク変異を予測した。予測を代表者に提供してハイリスク変異株の監視体制を強化した。監視結果は、予測の妥当性を支持した。北大・人獣共通感染症リサーチセンターと共同で、予測精度向上に有用な大規模計算の実施基盤を整えた。以上の活動により、計算科学をリスク管理に活用する連携・技術基盤の強化が着実に進んだ。

### A．研究目的

インフルエンザウイルスのハイリスク株早期検出は、国際的な重要課題である。しかし、現行の監視体制は種々の課題を抱える。第一に、未報告の変異が検出された時、そのリスクを論理的に評価できない。第二に、将来の流行株を論理的に予測できない。第三に、海外で発生した新型ウイルスの迅速入手と性質決定は、カルタヘナ議定書の履行に伴い困難な状況にある。第四に、ハイリスク変異同定を目的とする組換えDNA実験は、保安上の観点から実施が難しい事態がしばしば生じている。

新たに発生したウイルスのリスク、あるいは今後生じうるリスク変異を論理的に推定するには、新たな手法の開発が必須であ

る。そこで本研究では、計算科学のもつ予測能力に着目し、構造シミュレーションの諸技術をリスク管理体制の強化に活用する新たな連携体制と手法の構築を研究した。

### B．研究方法

(1) リスク予測と検証：本研究では、ウイルスの感染力と宿主指向性を担うHA、NAタンパク質を解析対象とし、ヒト-ヒト伝播能のリスク予測、及び今後生じうるリスク変異の予測を実施した。予測には、分子モデリングと*in silico*変異導入解析を用いた。研究代表者と共同で、サーベイランス等により予測の妥当性を検証した。

(2) 連携体制と技術基盤の強化：本研究では、研究代表者と共同で変異検出 流行リ

スク予測 監視による検証、の過程を積み重ねることによりリスク管理体制を強化した。また、北大・人獣共通感染症リサーチセンター伊藤教授と共同で、分子動力学法等の大規模計算の実施基盤を強化した。

### C . 研究結果

平成 25-26 年度は、疫学・ウイルス学・計算科学の連携体制を整えながら、予測と検証を積み重ねた。平成 27 年度は、大規模計算の実施基盤を整えながら、今後の予測精度向上に備えた。

( 1 ) 疫学・ウイルス学・計算科学の統合解析環境の整備 : リスク予測の前提として、不断に発生する変異株の変異情報、並びに日々理解の深まるウイルスタンパク質の機能情報の入手が不可欠である。そこで、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を実施することで、インフルエンザの疫学・ウイルス学の最新情報を円滑に入手する協力体制を構築した。

( 2 ) 予測と検証の積み重ね : この連携基盤を用いて、予測と検証を積み重ねた。

平成25年11~12月、札幌でA(H1N1)pdm09オセルタミビル/ベラミビル耐性株が発生した。この耐性株は、NAタンパク質に未報告の変異(N386K)を持ち、構造安定化によりヒト-ヒト伝播能が昂進している危険性が疑われた。そこでこの株の感染拡大リスクを予測した。構造安定性の*in silico*解析によりN386Kに構造安定化の効果がないことが判明し、この株の感染は二次変異を獲得しない限り終息すると予測した。この予測はサーベイランスにより確認された(Takashita E et al., *Antimicrob Agents Chemother*, 59:2607-201, 2015)。平成25年5月に中国でトリIFV A (H7N9)のヒト感染事例が発生した。この株はヒト-ヒト伝

播能が低く、流行には至らなかった。しかし、二次変異を蓄積することで、ヒト-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。ヒト-ヒト伝播効率を高めうる変異として、HAタンパク質の受容体指向性変化(ヒト型シアル酸への指向性の向上とトリ型シアル酸への指向性の低下)及びHA構造の安定化が報告されている。*In silico*構造解析により、これらの物性変化をもたらす変異を包括的に同定し、変異情報を代表者に提供して監視を強化した。その後、中国で新たな変異を獲得したA (H7N9)の感染事例が複数報告された。しかしいずれも予測した変異を持たず、それらの変異による受容体指向性変化と構造安定化も*in silico*解析では認められないことから、感染拡大のリスクは低いと予測した。その後の継続的な監視により、これらの予測の妥当性が確認された。

( 3 ) MD simulationの実施環境整備 : 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、溶液中のタンパク質構造の動的挙動を原子レベルで解析できる。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。したがってMD simulationは、変異ウイルスの受容体指向性、薬剤感受性、抗原性・抗体感受性等の性質変化の予測の精度向上に役立つと考えられる。我々は、既にHIVのエンベロープタンパク質の適応進化の研究(薬剤耐性、中和抗体逃避、感染・増殖能昂進などの研究)にこの技術を応用して論文に公表している。そこで最終年度は、インフルエンザウイルスHAタンパク質三量体のMD simulationの実施基盤を構築した。

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。

（４）北大・感染研の連携体制整備：人獣共通感染症リサーチセンターのスーパーコンピュータを用いて糖鎖付加型HA三量体分子のMD simulationを開始した。これにより、病原体ゲノム解析研究センターをハブとしてインフルエンザウイルス研究センター、北大・人獣共通感染症リサーチセンターが連携する対インフルエンザの新たな連携体制の発足に寄与した。

（倫理面への配慮）

該当無し。本研究は、計算機を用いた解析を実施するものである。

## D．考察

本研究の推進により、株サーベイランス体制強化に資する２つの成果が得られた。

（１）連携基盤の強化：インフルエンザの疫学・ウイルス学・計算科学の研究を統合的に実施する連携体制の整備が進んだ。これには、国立感染症研究所内連携（インフルエンザウイルス研究センターと病原体ゲノム解析研究センター）と感染研・所外の

連携（北大・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）が含まれる。これにより、計算・情報科学を取り入れてインフルエンザウイルスのリスク管理を進める連携基盤が着実に強化された。今後も共同研究等を通じて継続的に強化していくことが重要と考える。

（２）技術基盤の強化：新たに発生した変異ウイルスのリスク評価、並びにハイリスク変異の予測を実施し、さらにサーバイランスでその妥当性を検証することで、予測に使える諸技術の基盤強化が進んだ。また、計算機環境を所外に確保することで、ウイルス粒子上の糖鎖付加型 HA 三量体分子の分子動力学計算を実施する計算機環境が強化された。これにより、変異による HA の物性変化を詳細に解析することが可能になり *in silico* 予測の精度向上が期待される。

## E．結論

本研究により、計算・情報科学を取り入れてインフルエンザウイルスのリスク管理を進める連携体制と技術基盤の強化が着実に進んだ。今後もこの連携を継続的に強化していくことが論理的なウイルスのリスク管理につながると考えられる。

## 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) Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama

M, Sato H, Tashiro M, Odagiri T.  
Mutations at the monomer-monomer  
interface away from the active site of  
influenza B virus neuraminidase  
reduces susceptibility to  
neuraminidase inhibitor drugs. *Journal  
of Infection and Chemotherapy* (2013)  
19:891-895.

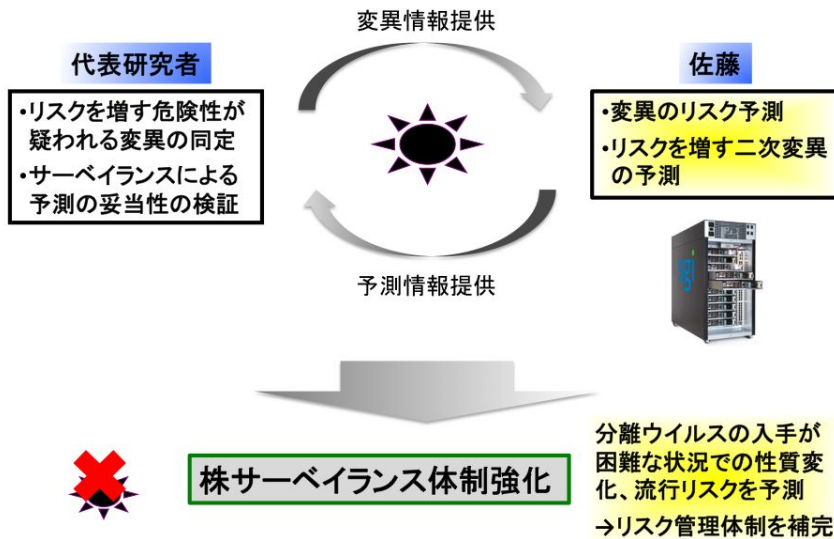
## 2 . 学会発表

( 1 ) 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**

なし

計算科学を株サーベイランスに活用する連携・技術基盤の構築



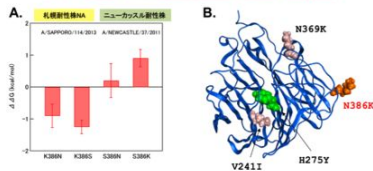
変異のリスク予測とサーベイランスによる検証

(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

386K変異はNA蛋白質の安定化に寄与するか?

NAモデリング→In silico 変異導入解析→構造安定性評価



386K: NA蛋白質を不安定にする  
386N/S: 同程度に安定(Sがやや安定)

- 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

(2) 伝播リスクを高める二次変異の予測

中国 トリIFV A(H7N9)

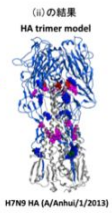
鳥インフルエンザウイルスA (H7N9)のリスク変異の予測

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原遺
- ◆HA受容体結合部位周辺: 44種類の変異
- (ii) 蛋白質安定化の原遺(補償変異)
- ◆HA三量体境界面: 14種類の変異

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28年1月30日現在、予測した変異をもつ AH7N9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

インフルエンザウイルス研究センター

流行せず

サーベイランス~3年間

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)



## 遺伝子解析による変異検出と進化系統樹解析

研究分担者 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

研究協力者 小口晃央、花巻朝子、大下龍蔵（同上）

### 研究要旨

2012/2013 シーズン後半の分離株および一部の参照株について、重要セグメントの塩基配列を決定し、分子系統解析を行った。A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、B のいずれの型においても、シーズン前半と比べて流行株の傾向に大きな変動は見られなかった。また、どの型についても、NA セグメントの系統樹と HA セグメントの系統樹は樹形が概ね一致しており、亜型間もしくはクレード間の顕著な再集合は起こっていないと判断された。M セグメントはいずれの型においても特定の変異の増加傾向は認められなかった。薬剤耐性変異についても、動向に大きな変化はなかった。次世代型シーケンサーを用いた全セグメント解析手法については、昨年度に作成した暫定プロトコルの改良を行い、*de novo* でのアセンブル、解析費用の圧縮等に目処をつけた。引き続き情報処理の自動化に向けた検討を実施している。

### A . 研究目的

シーズンを通してインフルエンザウイルスの重要遺伝子セグメントの塩基配列を決定し、分子系統解析を行うことにより、薬剤耐性株、高リスク変異株等の早期発見に結びつける。全 8 セグメントを解析するためのプロトコルの整備を進めるとともに、高リスクが疑われる変異株が認められた場合には、全 8 セグメントの全長解析を実施し、病原性、増殖性等に係る遺伝子変異やその由来等の解析を行う。

### B . 研究方法

地研等を通して国立感染症研究所に集積されたインフルエンザウイルスの 5-10%を目処に、重要な遺伝子セグメントの塩基配列を決定する。今年度は、前年度から引き

続き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。なお、HA1 領域については別途感染研インフルエンザセンターにおいて配列決定を行っている。

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、の順序で行った。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。

高リスクが疑われる株や新型ウイルスが出現した際に必要となる全 8 セグメント解析の Protokol については、23 年度までに A(H1N1)pdm09、A(H3N2)および B 型について順次整備を行ったのに引き続き、24 年度からは次世代型シーケンサーを用いたウイルス型に依存しない全セグメント解析の手法について検討を開始した。

(倫理面への配慮)

患者の個人情報等、倫理面での配慮が必要な情報は提供を受けていない。また、データの公表(データベースへの登録)はすべて感染研インフルエンザセンターを通して行った。

表 1 本事業での遺伝子解析の実績

シーズン	型・亜型	受入数	成功数
2009/2010	A(H1N1)pdm	73	71
	A(H3N2)	38	37
	B	105	101
2010/2011	A(H1N1)pdm	75	73
	A(H3N2)	99	99
	B	130	126
2011/2012	A(H1N1)pdm	9	9
	A(H3N2)	186	183
	B	111	110
2012/2013	A(H1N1)pdm	18	18
	A(H3N2)	53	53
	B	72	72
合計		969	952

参照株として前シーズン以前の株を一部含む

## C. 研究結果

### 1. 変異解析の概要

2013年7月から2013年8月までの間に、3回に分けて、2012/2013シーズン後半の分離株を中心に計83株のRNAサンプルを受領し、A型についてはNA、M、HA2の各セグメ

ント、B型についてはNA、HA2の各セグメントの中から必要なセグメントの塩基配列を解析した。昨年度までの分と合わせた本事業における解析実績を表1に示す(重複分を除く)。なお、前年度までは12月から翌1月にかけて、新シーズン初期の分離株の解析を行っていたが、研究代表者との協議により、今年度はこの分の解析は全量を感染研インフルエンザセンターで担当することとした。

### 2. A(H1N1)pdm09の変異解析

2012/2013シーズンは、2011/2012シーズンに引き続いてA(H1N1)pdm09の流行は小規模であった。NAセグメントのアミノ酸配列をもとに分子系統解析を行ったところ、すでに報告しているHA1の系統樹と樹形がほぼ一致しており、クレード間での顕著な再集合は起こっていない判断された。NAセグメントの配列は、昨年度に解析した2012/2013シーズン初期までの分離株の傾向をほぼ引き継いでいた。すなわち、ワクチン株であるA/California/7/2009と比べると、V106IおよびN248Dの変異に加えて、オセルタミビル耐性変異(H275Y)の安定化に寄与すると報告されているV241IおよびN369Kの変異をすべて持っていた。ただし、今回解析した中に、H275Y変異を持つものはなかった。また、2013年末に札幌市で分離された複数のオセルタミビル耐性変異株すべてに共通して見られたN364K変異は、今回解析した株の中には認められなかった。

M1およびM2のアミノ酸配列は引き続き均質であり、初期分離株からの際だった変異の蓄積は認められなかった。なお、これまでと同様、解析した株のすべてがM2にS31Nのアマンタジン耐性変異を持っており、A/(H1N1)pdm09は発生以来一貫してアマンタジン耐性を保持しているものと思われる。2010/2011シーズン株の解析ではM2のイオ

ンチャンネル付近の 27 位に従来は見られなかった V27F のアミノ酸置換を持つ株が 3 株認められたが、それ以降はこの変異を持つものは見つかっていない。

### 3 . A(H3N2)の変異解析

A(H1N1)pdm09 の場合と同様、NA セグメントのアミノ酸配列をもとに作成した系統樹は HA1 の系統樹と樹形がほぼ一致した。NA セグメントの配列は、2011/2012 シーズン以降、新たに L81P、N402D および D93G の変異を獲得したグループ (HA1 の系統樹ではサブクレード 3C に相当) へのシフトが見られたが、今年度に解析した株もほぼすべてがこのグループに属しており、新たな変異の蓄積も認められなかった。なお、これまでに解析した 2009/2010 シーズン以降の株には、E119V、R292K の薬剤耐性変異を持つものは見つかっていない。

M1 には引き続き変異の蓄積は見られなかった。一方 M2 については、2009/2010 シーズンは V51A と N82S のアミノ酸置換のいずれかまたは両方を持つ株が全体の 30% を占めたが、2010/2011 シーズンは 15%、2011/2012 シーズンは 0.5% と減少し、2012/2013 シーズンは前半、後半とも検出されなかった。今年度に解析した株はすべて M2 に S31N のアマンタジン耐性変異を持っていた。

### 4 . B 型の変異解析

2012/2013 シーズンは、2011/2012 シーズンに引き続き Victoria 系統と Yamagata 系統の混合流行が見られた。ビクトリア系統では、2011/2012 シーズン以降に N340D 変異を持つ株が顕著に増加したが、今年度に解析した株も 1 株を除いてすべてこのグループに属していた。一方 Yamagata 系統は、2011/2012 シーズン以降に、HA1 の系統樹でクレード 2 に相当するグループが増加する

傾向がみられたが、今年度の解析株もすべてこのグループに属していた。I221T の薬剤耐性変異を持つものは、2011 年 7 月以降の分離株の中には見つかっていない。

### 5 . 次世代型シーケンサーを用いた全ゲノム解析プロトコルの整備

#### (a) プロトコル検討にあたっての考え方

サンガー法による全セグメント解析では、各型・亜型ごとに、また、各セグメントごとに、セグメントの末端配列および 10 個所程度の内部配列に対応するプライマーを設計する必要がある。そのため、流行株の変遷にともなって随時プロトコルの見直しが必要なほか、新型ウイルスが出現した際には新たにプロトコルを開発することが必要となる。一方、次世代型のシーケンサーは配列決定のスループットが格段に高いため、ランダムな位置からの配列を大量に取得してセグメント全長の配列を決定することが可能である。プロトコルの検討にあたっては、すべてのゲノムセグメントの 3' 末端側に高度に保存されている配列 (従来から逆転写用のユニバーサルプライマーとして利用されてきた配列 ; A 型では AGCAAAAGCAGG の 12 塩基、B 型では AGCAGAAGCR の 10 塩基) のみに依存し、より多型の多い 5' 末端側の保存配列およびセグメント内部の配列には依存しない方法を採用することとした。これにより、未知のセグメントを含む新型のウイルスにもそのまま適用できる可能性が高いと考えられる。

次世代型のシーケンサーを用いたインフルエンザウイルスの全セグメント解析については、Roche 社の 454 シーケンサーや Illumina 社の GA シーケンサーを用いた例などがすでに報告されているが、次世代型シーケンサーは配列決定のスループットが高い反面、1 回の運転にかかる費用が高額

なため、解析する株数が少ない場合には、1株あたりの解析費用が極めて高額となる。また、Illumina社のHiSeq等の大型のシーケンサーでは、1回の運転に一週間以上を要するため、機動性が要求されるサーベイランスの目的には適さないと判断した。そこで、解析費用および機動性の両面から判断して、Illumina社のベンチトップ型のシーケンサーであるMiSeqを使用し、一度に20株程度を同時に解析することを前提として、プロトコルの検討を行うこととした。

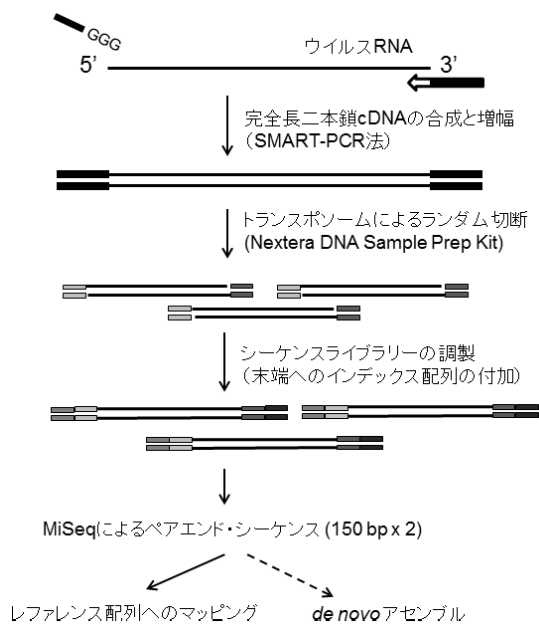


図1 MiSeqによる全セグメント解析の暫定プロトコル

### (b) SMART-PCR法による暫定プロトコル

上記の検討に基づき、昨年度に図1に示す暫定プロトコルを作成した。ここでは一本鎖RNAから二本鎖cDNAを合成するために、Clontech社のSMARTシステムを応用することとした。原プロトコルでは、mRNAのポリA鎖に相補的なオリゴT配列を含むプライマーを逆転写(1次鎖合成)に用いているが、このうちオリゴTの部分インフルエンザウイルス用のユニバーサルプライマー(上記)の配列に置き換えたものを使用した。SMART-PCRでは、2次鎖合成に際してPCRによる増幅が行われるため、次ステッ

プでシーケンスライブラリーを作成するために十分な量の二本鎖DNAを確保することができる。このプロトコルにより、A(H1N1)pdm09、A(H3N2)、Bのいずれの型についても、4日間で20株の配列データを取得することが可能であり、リファレンス配列へのマッピングによって8セグメントすべての全長配列をアセンブルできることを確認した。配列の冗長度はセグメント中央部で1,000以上、セグメント末端でも数十あり、ウイルス集団内での薬剤耐性変異等の割合を求める目的にも十分であった(図2)。しかし、(i) *de novo*でのアセンブルが難しくリファレンス配列へのマッピングが必要である、(ii) 1株あたりのランニングコストが5万円近いなど、いくつかの点で改良が必要と考えられた。

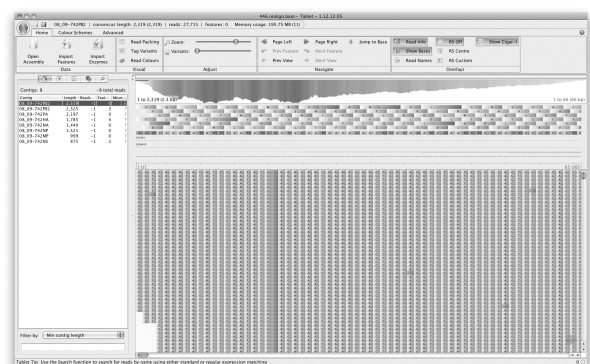


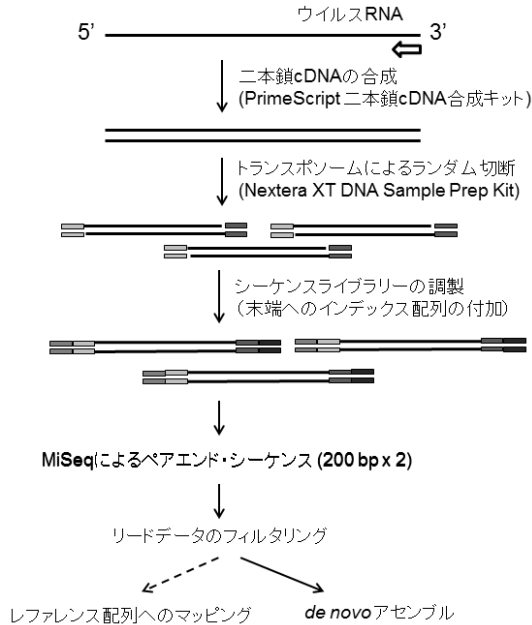
図2 アセンブル状況の例(PB2セグメント末端部分の拡大)

### (c) プロトコルの改良

上記プロトコルで見いだされた問題点を踏まえ、本年度は以下のからの点について、改良を実施した(一部は実施途中)。現状での改良プロトコルを図3に示す。

図3 改良後の全セグメント解析プロトコル

シーケンスリード長の最適化



MiSeqの最新バージョンであるv3では最大600サイクル(片鎖300塩基のペアエンド)のシーケンスが可能である。昨年度は片鎖150塩基のペアエンドシーケンスを行っていたが、運転時間および費用を考慮し、v2試薬で片鎖200塩基のペアエンドシーケンスを行うように改良した。Nextera XTキットで作成したライブラリーの平均長が約300塩基であるため、この条件では中央部で約100塩基のオーバーラップを生じることになり、アセンブルの際に有利となる。これにより、運転時間を約30時間に据え置いたまま、より精度の高いアセンブルが可能となった。

#### 二本鎖cDNA合成法の改良

解析単価を押し上げている最大の要因はSMART-PCRの試薬代であった。そこで二本鎖cDNAの合成ステップをより一般的な方法に置き換えることを試みた。幸い、Illumina社のライブラリー調製キットであるNextera DNA sample prep kitがNextera XTにバージョンアップされたことにより、ライブラリー作成に必要なDNA量が従来の50 ngから1 ngに減少したため、二本鎖合成のステップでPCRを行う必要性が薄れた。そこで、2次鎖の合成に特異プライマーを必要としないニック・トランスレーション法を採用した方法として、タカラバイオのPrimeScript Double Strand cDNA Synthesis Kitを用いたところ、良好な結果が得られ

た。これによりcDNA合成にかかる費用を約1/5に圧縮することができた。他の要因と合わせて、1株あたりのランニングコストは2万円弱となり、従来サンガー法で全セグメント解析を行う場合(約1万5千円)と同程度にまでランニングコストを圧縮することができた。ただし、cDNA合成の段階でPCRを行わないため、初期RNA量の影響をより強く受けることとなった。この点については更に検討が必要と思われる。なお、SMART-PCRを用いる場合と比較して、セグメント末端部での配列冗長度の低下がより顕著であったが、アセンブルに使用するリード長を増やすことで対応は可能であった。

#### 宿主由来配列の除去

*de novo*でのアセンブルを阻害している要因を分析したところ、ウイルスの培養に用いた宿主細胞(MDCK)に由来するリードが全リードの40-90%(SMART PCRを用いた場合でも10-20%)に達しており、これがアセンブルミスを引き起こしていることがわかった。そこで宿主由来配列を除去するため、コンピュータによるフィルタリングおよびRNAの精製処理の両面から検討を行っている。

コンピュータによって宿主由来の配列をフィルタリングするため、イヌ、ニワトリのゲノム配列等からなるデータベースを作成し、これにヒットするリードを除外する方法、およびNCBIから取得したインフルエンザウイルスの配列(約7万株分)からなるデータベースを構築し、これにヒットするリードのみを残す方法、の2つを比較検討し、両者でほぼ同等のフィルタリング効果が得られることを確認した。これにより、前述のリード長の最適化と合わせて、リファレンス配列に依存しない*de novo*でのアセンブルが可能となった。後者のほうがデータベースサイズが小さいためより高速にフィルタリングを行なうことができ

る。計算能力に限られるデスクトップ PC や Mac を使用する場合でも、後者の方法であれば実用的なスピードでフィルタリングを実行可能と思われる。

一方、RNA の精製処理については、扱う RNA 量が微量であるため、エタノール沈殿等が必要となる DNase 処理は不向きと考えられた。そこで、一本鎖 RNA のみを吸着するカラムを用いた方法を検討中である。

#### (d) データ処理パイプラインの構築

次世代型シーケンサーを用いる場合、データ量が膨大となるため、データ処理の自動化が必須と考えられる。そこで、ホスト由来配列等の除去、アセンブル、コード配列の抽出とアミノ酸配列への翻訳、変異個所の抽出、変異割合の算出等の一連の処理を自動化するためのパイプラインを構築中である。処理プログラムはシステムに依存しない JAVA 言語を使用しているため、Linux もしくは MacOS のいずれでも実装可能なものとなる予定である。

#### D . 考察

A(H1N1)pdm09 亜型、A(H3N2) 亜型、B/Victoria 系統、B/Yamagata 系統のいずれにおいても、NA セグメントの系統樹と HA セグメントの系統樹は樹形が概ね一致しており、亜型間もしくはクレード間の顕著な再集合は起こっていないと判断された。次世代型シーケンサーを用いた解析は、各セグメントの末端に存在する共通配列のみに依存し、セグメント内部の塩基配列に依存しないため、新型のウイルスが出現した際にも即座に適用できる可能性が高い。また、得られる配列冗長度は、従来法に比べて格段に高いため、同一株内での配列多型（薬剤耐性変異等）の定量的な解析にも使用できるメリットがある。ただし、複数の株が混合感染しているような場合にどの程度対

応できるかは、今後さらに検討が必要である。

#### E . 結論

A(H1N1)pdm09 亜型、A(H3N2) 亜型、B/Victoria 系統、B/Yamagata 系統のいずれにおいても、2012/2013 シーズン初期までの流行を引き継いでおり、新たなクレードに遷移する傾向は見られなかった。また、薬剤耐性変異を含めて、懸念される変異の蓄積は認められなかった。次世代型シーケンサーを用いた全 8 セグメント解析のプロトコルについて検討を行い、実用的な期間（4 日程度）および費用（1 株あたり約 2 万円）で 20 株程度を同時に解析する目処がたった。

#### F . 健康危険情報

#### G . 研究発表

##### 1 . 論文発表

〔研究課題に関連するもの〕

- 1 岸田典子 , 高下恵美 , 藤崎誠一郎 , 徐 紅 , 土井輝子 , 伊東玲子 , 佐藤 彩 , 菅原裕美 , 江島美穂 , 金 南希 , 三浦 舞 , 今井正樹 , 小田切孝人 , 田代真人 , 小口晃央 , 大下龍蔵 , 藤田信之 , 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 . 2012 / 13 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月報 , **34** , 328-334 , 2013 .

〔その他〕

- 1 Fukuhara, Y., Kamimura, N., Nakajima, M., Hishiyama, S., Hara, H., Kasai, D., Tsuji, Y., Narita-Yamada, S., Nakamura, S., Katano, Y., Fujita, N., Katayama, Y., Fukuda, M., Kajita, S. and Masai, E.: Discovery of pinoresinol reductase genes in sphingomonads. *Enz. Microbial Tech.*, **52**, 38-43, 2013.
- 2 Ichikawa, N., Sasagawa, M., Yamamoto, M., Komaki, H., Yoshida, Y., Yamazaki, S. and Fujita, N.: DoBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 408-414, 2013.
- 3 Miura, H., Hori, K., Sasaki, Y., Inahashi,

- Y., Yagisawa, Y., Fujita, N., Omura, S. and Takahashi, Y.: Simple analytic method of diaminopimelate epimerase activity. *J. Biosci. Bioeng.*, **116**, 253-255, 2013.
- 4 Matsumoto, A., Kasai, H., Matsuo, Y., Shizuri, Y., Ichikawa, N., Fujita, N., Omura, S. and Takahashi, Y.: *Illumatobacter nonamiense* sp. nov. and *Illumatobacter coccineum* sp. nov. isolated from seashore sand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **63**, 3404-3408, 2013.
- 5 Shintani, M., Hosoyama, A., Ohji, S., Tsuchikane, K., Takarada, H., Yamazoe, A., Fujita, N. and Nojiri, H.: Complete genome sequence of the carbazole degrader *Pseudomonas resinovorans* CA10 (= NBRC 106553). *Genome Announc.*, **1**, e00488-13, 2013.
- 6 Matyi, S., Hoyt, P., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Fujita, N. and Gustafson, J.: Draft genome sequences of *Elizabethkingia meningoseptica*. *Genome Announc.*, **1**, e00444-13, 2013.
- 7 Fujinami, S., Takarada, H., Kasai, H., Sekine, M., Omata, S., Harada, T., Fukai, R., Hosoyama, A., Horikawa, H., Kato, Y., Nakazawa, H. and Fujita, N.: Complete genome sequence of *Illumatobacter coccineum* YM16-304<sup>T</sup>. *Stand. Genomic Sci.*, **8**, 430-440, 2013.
- 8 Ohtsubo, Y., Fujita, N., Nagata, Y., Tsuda, M., Iwasaki, T., and Hatta, T.: Complete genome sequence of *Ralstonia pickettii* DTP0602, a 2,4,6-trichlorophenol degrader. *Genome Announc.*, **1**, e00903-13, 2013.
- 9 Mochizuki, D., Arai, T., Asano, M., Sasakura, N., Watanabe, T., Shiwa, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Fujinami, S., Fujita, N., Abe, A., Sato, J., Nakagawa, J. and Niimura, Y.: Adaptive response of *Amphibacillus xylanus* to normal aerobic and forced oxidative stress conditions. *Microbiology*, 2014, in press (DOI: 10.1099/mic.0.068726-0)
- 10 Ohji, S., Hosoyama, A., Tsuchikane, K., Ezaki, T., Yamazoe, A. and Fujita, N.: The complete genome sequence of *Pseudomonas putida* NBRC 14164<sup>T</sup> confirms high intraspecies variation. *Genome Announc.*, **2**, e00029-14, 2014.
- 11 Yamamura, H., Ashizawa, H., Hamada, M., Hosoyama, A., Komaki, H., Otaguro, M., Tamura, T., Hayashi, Y., Nakagawa, Y., Ohtsuki, T., Fujita, N., Ui, S. and Hayakawa, M.: *Streptomyces hokutonensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the strawberry root rhizosphere. *J. Antibiot.*, in press.

## H . 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 抗インフルエンザ薬耐性ウイルスの地域流行に関する研究

研究分担者 高下恵美

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 主任研究官

### 研究要旨

インフルエンザ A(H1N1)pdm09 の予防および治療には抗インフルエンザ薬の NA 阻害剤が用いられる。NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつ NA 阻害剤耐性ウイルスは国内外で散発的に検出されており、我々は全国地方衛生研究所と共同で、抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施し、継続的に耐性ウイルスの監視を行っている。札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制を強化したところ、2013 年 2 月中旬までに、490 株の解析株中 41 株の耐性ウイルスが検出され、検出率は 8% に達することが明らかになった。国内外の A(H1N1)pdm09 耐性ウイルス検出率は、過去数シーズンにわたって 1-2% 程度であり、8% の検出率は憂慮すべき事態である。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いるが、今後、全国的に耐性ウイルスの流行が拡大することが危惧される。国内における耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関に速やかに情報提供するために、耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。

### A . 研究目的

日本国内においてインフルエンザ A(H1N1)pdm09 の予防および治療には主に、インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼ（NA）蛋白を標的とする NA 阻害剤、オセルタミビル（商品名タミフル）、ペラミビル（商品名ラピアクタ）、ザナミビル（商品名リレンザ）、ラニナミビル（商品名イナビル）が使用されている。世界各国で分離される A(H1N1)pdm09 ウイルスのほとんどは上記の抗インフルエンザ薬に対して感受性であるが、国内外で散発的に、NA 蛋白に特徴的なアミノ酸変異（H275Y）をもつオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが検出されている。日本是世界最大の抗インフルエンザ薬使用国であることから、国内における薬剤耐性ウイルスの発生状況を迅速

に把握し、自治体および医療機関に速やかに情報提供することは公衆衛生上極めて重要である。そこで我々は全国地方衛生研究所と共同で、2009 年 9 月から、A(H1N1)pdm09 ウイルスの抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランスを実施している。

札幌市衛生研究所で実施された遺伝子解析により、札幌市で 2013 年 11 月から 12 月にかけて分離された A(H1N1)pdm09 ウイルス 5 株すべてが H275Y 耐性変異をもつことが明らかになった。そこで、2014 年 1 月から全国的に耐性株サーベイランス体制の強化を図った。

### B . 研究方法

全国地方衛生研究所において、A(H1N1)pdm09 ウイルスの NA 遺伝子解析

によるH275Y耐性変異の1次スクリーニングを行った。検出されたH275Y耐性変異ウイルスに関しては、引き続き国立感染症研究所において、詳細な遺伝子解析および抗原性解析を行った。さらに、MUNANA基質を用いた蛍光法によって、H275Y耐性変異ウイルスのオセルタミビル、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、 $IC_{50}$ 値を算出した。

### C . 研究結果

2013年2月中旬までに、全国31都道府県の43地方衛生研究所で490株のA(H1N1)pdm09ウイルスが解析され、そのうち41株のH275Y耐性変異ウイルスが検出された。H275Y耐性変異ウイルスはいずれもオセルタミビルおよびペラミビルに対して著しく感受性が低下していた。一方で、ザナミビルおよびラニナミビルに対しては感受性を保持していた。オセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスが検出された患者のほとんどは検体採取前に抗インフルエンザ薬の投与を受けておらず、薬剤により患者の体内で耐性ウイルスが選択された可能性は否定される。国内における薬剤未投与例からの耐性ウイルスの検出率はシーズン毎に増加傾向にあり、海外の状況も同様である。

2013/2014シーズンには、米国および中国においてもH275Y耐性変異ウイルスの検出が相次いで報告されている。日本国内で検出された耐性ウイルスの詳細な遺伝子解析から、国内の耐性ウイルスは中国の耐性ウイルスと共通の祖先に由来する可能性が示唆された。また、2009年の(H1N1)2009パンデミックの際にヨーロッパの重症患者の一部で報告された、鳥型レセプターへの結合性を高めるようなヘムアグルチニン(HA)遺伝子の変異(D222G、Q223R)は起こって

おらず、耐性ウイルスの病原性が増強している所見はない。

国内で分離されたオセルタミビル・ペラミビル耐性ウイルスについて抗原性解析を行った結果、2013/14シーズンのワクチン株A/California/7/2009の抗原性と一致していることが明らかになった。したがって、今シーズンのワクチンは、オセルタミビル・ペラミビル耐性A(H1N1)pdm09ウイルスに対する有効性が期待される。

### D . 考察

国内外におけるH275Y耐性変異ウイルスの検出率は、過去数シーズンにわたって1-2%程度であったが、2月中旬までの2013/2014シーズンの国内における耐性ウイルスの検出率は8%に達した。一方、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ます、北海道以外の地域における耐性ウイルスの検出率は3%となる。しかし、札幌市を訪問後に居住地で発症し、札幌で流行する耐性ウイルスと遺伝的に同一の耐性ウイルスが検出される症例が増えており、今後、全国的に耐性ウイルスの流行が拡大することが危惧される。

### E . 結論

国内では、札幌市を中心にH275Y耐性変異ウイルスの検出が続いている。H275Y耐性変異をもつインフルエンザウイルスに関して、小児ではオセルタミビル投与群と非投与群の間で有熱期間に差がなかったという報告があり、抗インフルエンザ薬の投与に際しては、各地域での耐性ウイルスの検出状況に注意を払う必要がある。したがって、国内における耐性ウイルスの発生状況を迅速に把握し、自治体および医療機関に速やかに情



報提供するために、引き続き全国地方衛生研究所と国立感染症研究所における耐性ウイルスの監視体制を強化する必要がある。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

T.Kageyama, S.Fujisaki, E.Takashita, H.Xu, S.Yamada, Y.Uchida, G.Neumann, T.Saito, Y.Kawaoka and M.Tashiro. Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013. *Euro surveillance*, 18, 20453,2013

R.Uraki, M.Kiso, K.Iwatsuki-Horimoto, S.Fukuyama, E.Takashita, M.Ozawa and Y.Kawaoka. A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges. *Journal of virology*, 87,7874-7881,2013

E.Takashita, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu, M.Imai, M.Tashiro, T.Odagiri and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7,1390-1399,2013

T.Watanabe, M.Kiso, S.Fukuyama, N.Nakajima, M.Imai, S.Yamada, S.Murakami, S.Yamayoshi, K.Iwatsuki-Horimoto, Y.Sakoda, E.Takashita, R.McBride, T.Noda, M.Hatta, H.Imai, D.Zhao, N.Kishida, M.Shirakura, R.P.de Vries, S.Shichinohe, M.Okamatsu, T.Tamura, Y.Tomita, N.Fujimoto, K.Goto, H.Katsura, E.Kawakami, I.Ishikawa, S.Watanabe, M.Ito, Y.Sakai-Tagawa,

Y.Sugita, R.Uraki, R.Yamaji, A.J.Eisfeld, G.Zhong, S.Fan, J.Ping, E.A.Maher, A.Hanson, Y.Uchida, T.Saito, M.Ozawa, G.Neumann, H.Kida, T.Odagiri, J.C.Paulson, H.Hasegawa, M.Tashiro and Y.Kawaoka. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. *Nature*, 501,551-555,2013

N.Kishida, M.Imai, H.Xu, K.Taya, S.Fujisaki, E.Takashita, M.Tashiro and T.Odagiri. Seroprevalence of a novel influenza A (H3N2) variant virus in the Japanese population. *Japanese journal of infectious diseases*, 66,549-551,2013

E.Takashita, M.Ejima, R.Itoh, M.Miura, A.Ohnishi, H.Nishimura, T.Odagiri and M.Tashiro. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. *Euro surveillance*, 19,20666,2014

### 2 . 学会発表

高下恵美、小田切孝人：5シーズンにわたる日本国内の抗インフルエンザ薬耐性株サーベイランス 第54回日本臨床ウイルス学会、2013年6月

E.Takashita, M.Ejima, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu, M.Imai, M.Tashiro, T.Odagiri : A cell-based screening system to evaluate the susceptibility of influenza viruses to T-705 (favipiravir). 15th International Negative Strand Virus Meeting, June 2013

R.Uraki, M.Kiso, K.Iwatsuki-Horimoto, S.Fukuyama, E.Takashita, M.Ozawa, Y.Kawaoka : A PB2-KO influenza virus-based bivalent vaccine protects mice against pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenge. 15th

International Negative Strand Virus  
Meeting, June 2013

E.Takashita, S.Fujisaki, N.Kishida, H.Xu,  
M.Imai, M.Tashiro, T.Odagiri : Detection of  
antiviral-resistant influenza viruses in Japan  
during pandemic and post-pandemic  
periods. Options for the Control of  
Influenza VIII, September 2013

高下恵美：小児における抗インフルエンザ  
薬耐性ウイルスの検出 第45回日本  
小児感染症学会学術集会、2013年10月

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、田代眞  
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学術集会、2013年11  
月

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、田代眞  
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学術集会、2013  
年11月

高下恵美：インフルエンザウイルスのフ  
ァビピラビル（T-705）感受性 3rd  
Negative Strand Virus-Japan、2014年1  
月

## **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  
該当なし
- 3 . その他  
該当なし

「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」

「2013-14 年シーズンのインフルエンザワクチンの血清学的評価」

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 日比野亮信、菖蒲川由郷、近藤大貴（新潟大学大学院医歯学総合研究科）

樋熊紀男（女池南風苑・施設長） 高橋キイ子（女池南風苑・看護師長）

**研究要旨**

2013-2014 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/H1N1pdm09 抗原、A/H3N2 抗原、B 抗原に対する血清抗体価の調査を行った。医療従事者 100 名（平均年齢 42.0 才）と、高齢入所者 46 名（平均年齢 87.4 才）のワクチン接種前後の抗体価を HI 法で測定し、成人と高齢者における変化を評価した。結果として、成人では A/H1N1pdm09, A/H3N2, B でいずれも接種後には 80-90%を超える有意抗体価（HI 抗体 40 倍以上）の保有率を認め、GMT の上昇も有意であった。高齢者では接種後に A/H1N1pdm09 と A/H3N2 は 70%以上の良好な抗体価保有率（HI 抗体 40 倍以上）をみとめたが、B 型に関しては 52%の保有率で十分な抗体価が得られない傾向があった。接種後の副反応については、医療従事者、高齢者共に半数近くが局所の発赤を訴えたが、重篤な全身反応は見られなかった。

さらに、前シーズン（2012-2013）において本人が罹患したと申告した医療従事者の 6 名は、A/H3N2 の接種前の HI 抗体価の平均値が 142.5 と高く H3N2 に罹患したと推測された。接種後の HI 抗体価は 226.3 と 1.2 倍の上昇が有りブースター効果が見られた。

2014 年 2 月 5 日現在、当教室では全国 5 府県（北海道、新潟県、群馬県、京都府、長崎県）の医療機関からインフルエンザ疑い患者の検体を 94 件採集し、A/H1N1pdm09 が 18 件（62.1%）、A/H3N2 が 5 件（17.2%）、B 型ビクトリア系統が 2 件（6.9%）、B 型山形系統が 4 件（13.8%）と、A/H1N1pdm09 が過半数を占めた。なお、A/H1N1pdm09 は全て感受性株で H275Y 変異は認められなかった。

**A . 研究目的**

本調査では、高齢者施設の医療従事者（成人層）と入所者（高齢者層）を対象に、2013-14 年シーズンの日本の三価インフルエンザワクチン、A/カリフォルニア/7/2009（H1N1）pdm09、A/テキサス/50/2012（H3N2）、B/マサチューセッツ/02/2012（山形系）に対する、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）で評価した。また、聞き取り調査により前シーズンにインフルエンザに罹患したと考えられる成人につ

いて HI 抗体価のサブ解析を行った。

**B . 研究方法**

新潟市内の高齢者施設の医療従事者と入所者に対し、研究についての十分なインフォームドコンセントを取った上で、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、2013 年 10-11 月にデンカ生研社製の 2013-14 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。接種後48時間以内の副反応について自己申告で報告してもらった。

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/テキサス/50/2012)、B抗原(B/マサチューセッツ/02/2012)を用いて測定した。

抗体価の解析は高齢者施設の医療従事者を“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、成人群では前年度のインフルエンザ罹患の情報により、前シーズン(2012-2013)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て抗体価のサブ解析を行った。抗体価の評価にはワクチン接種前後の幾何平均抗体価(GMT)と40倍以上の抗体保有率(HI抗体価保有率)を用いた。接種後の抗体価の上昇幅の評価は、接種後の抗体上昇比(mean fold increase)と、抗体価応答率(ワクチン接種後に4倍以上の抗体価上昇があった人の割合)を用いた。

(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

高齢者施設において、成人群のペア血清は100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 $42.0 \pm 12.3$ 歳、高齢者群の平均年齢は $87.4 \pm 7.0$ 歳であった(表1)。

ワクチン接種前後の平均HI抗体価(GMT)については、成人群でA/California/7/2009接種前57.4、接種

後91.9、A/Texas/50/2012接種前54.3、接種後96.5、B/Massachusetts/2/2012接種前49.9、接種後69.2であった。一方で、Mean fold increaseは、A/California/7/2009 2.1、A/Texas/50/2012 2.2、B/Massachusetts/2/2012 1.5と反応は国際基準(成人層mean fold increase >2.5)に比べるとやや低めであったが、接種前値が高いため頭打ち現象がみられたと考えられる。

高齢者ではA/California/7/2009接種前45.1、接種後81.2、A/Texas/50/2012接種前33.4、接種後73.1、B/Massachusetts/2/2012接種前17.2、接種後33.9であった。Mean fold increaseは、A/California/7/2009 2.4、A/Texas/50/2012 3.2、B/Massachusetts/2/2012 2.9と、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。

40倍以上の抗体価保有率は、成人群でA/California/7/2009接種前71.0%、接種後93.0%、A/Texas/50/2012接種前70.0%、接種後93.0%、B/Massachusetts/2/2012接種前74.0%、接種後86.0%であり、3種の抗原とも前値から高く、結果的に接種後の抗体価保有率もすべてで国際基準の70%を越す良好な結果であった。一方、高齢者ではA/California/7/2009接種前58.7%、接種後78.3%、A/Texas/50/2012接種前52.2%、接種後84.8%、B/Massachusetts/2/2012接種前26.1%、接種後52.2%であり、A/H1N1psm09とA/H3N2は前値も高く接種後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HIの前値の有効抗体保有率が2割強と低く、結果的に抗体価は上昇したものの60%にはわずかに及ばなかった。例年みられるように成人層の抗体価の保有率は、高齢者層に比して高く、接種後の抗体価保有率も高かった。

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9.0%、A/Texas/50/2012 で 18.0%、B/Massachusetts/2/2012で6.0%であった。高齢者群では A/California/7/2009 で 21.7%、A/Texas/50/2012 で 30.4%、B/Massachusetts/2/2012 で 28.3%と数値上、高齢者群のほうが反応は良い傾向にあったが、成人層では接種前値が高いための頭打ち効果が影響して逆に上昇率が悪くなっていると考えられた。

次に、成人層を前シーズン(2012-2013)にインフルエンザに罹患した6名(罹患群)と罹患しなかった100名にわけてHI抗体価を解析した(図1)。罹患したと申告した群は、HI抗体価の平均値はA/California/7/2009接種前44.9、接種後89.8、A/Texas/50/2012接種前142.5、接種後226.3、B/Massachusetts/2/2012接種前40.0、接種後44.9であった。40倍以上の抗体価保有率は、罹患群でA/California/7/2009接種前66.7%、接種後100.0%、A/Texas/50/2012接種前100.0%、接種後100.0%、B/Massachusetts/2/2012接種前50.0%、接種後66.7%であり、A/H3N2の接種前のHI抗体価が高かったことから昨シーズンに罹患したと申告した成人は、A/H3N2に罹患したものと判断された。非罹患群のHI抗体価は成人の全体的な値と変わりなかった。

ワクチン接種後の副反応について、成人100名と高齢者で比較したところ、最も多い副反応が成人層、高齢者共に局所の発赤で、それぞれ48.0%、47.8%であった(表2)。次に多いのが局所の腫れで、成人で41.0%、高齢者で6.5%であった。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]

### 2013-14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

2014年2月5日現在、当教室では全国5府県(北海道、新潟県、群馬県、京都府、

長崎県)の医療機関からインフルエンザ疑い患者の検体を94件採集した。臨床検体そのものまたはMDCK培養株から、RNAを抽出し、cDNAを合成し、サイクリングプローブ法にて(リアルタイムPCR)、A/H1N1pdm09、A/H3N2、B型山形系統、B型ビクトリア系統を判別した。A/H1N1pdm09については、同じくサイクリングプローブ法でNA遺伝子にオセルタミビル・ペラミビル耐性となるH275Y変異をもつかどうか判定した。

結果は、A/H1N1pdm09が18件(62.1%)、A/H3N2が5件(17.2%)、B型ビクトリア系統が2件(6.9%)、B型山形系統が4件(13.8%)と、A/H1N1pdm09が過半数を占めた(表3)。なお、A/H1N1pdm09は全て感受性株でH275Y変異は認められなかった。各型・亜型の地理的な分布には差があるがまだまだシーズンのはじめで有り、H275Y変異株の出現も含めて今後の動向を監視する必要がある。

### D. 考察

高齢者施設の医療従事者(成人層)100名と高齢者施設の入所者46名(高齢者群)について、2013-2014年シーズンのインフルエンザワクチン接種前後のA/H1N1pdm09、A/H3N2、Bに対するHI抗体価をそれぞれ測定し評価した。

成人層ではA/H1N1pdm09、A/H3N2、Bいずれに対しても40倍以上HI抗体価保有率は接種後に80-90%を超える高さであり、ワクチンの免疫原性は十分であると言える。しかし、ワクチン接種前の抗体価がすでに高いことも寄与していると考えられる。当該施設ではほとんどのスタッフが毎年ワクチン接種をしており、さらに前年度と比べ3種類のインフルエンザワクチンの抗原性に大きく変化がなかったこともあり、接種前の抗体価がすでに獲得されていたと考えられる。高齢者では、A/H1N1pdm09、A/H3N2、では接種後のHI抗体価保有率が70-80%と良好であったが、B型が接種前26.1%と低く、接種後も52.2%とやや低めであった。前年度は、

3種類の抗原とも、成人層、高齢者層ともに接種後に70-90%の抗体価保有率を持っていたが、今年度はやや高齢者がB型で低い傾向にあった。しかし、全体的にみるとワクチンの免疫原性は国際基準をみたしており、良好であったと判断できる。

前年度にインフルエンザに罹患したと申告した成人層(スタッフ)はA/H3N2での接種前抗体価が高く、接種後もブースターが見られ、A/H3N2に罹患したと考えられた。スタッフの所属は施設内のそれぞれ異なる階(2階と3階)であり、施設の入所者(高齢者)にはインフルエンザ罹患は見られなかったため、院内感染対策が有効になされて流行蔓延が防がれたと考えられた。院内感染は、多くの場合、スタッフの持ち込みによる場合が多いため、今後ともワクチン接種率を高く保ち、患者が出た場合にはスタッフの場合は早めの治療と欠勤措置による隔離、高齢者の場合は、部屋の隔離や医療スタッフの標準感染予防策の施行が有効であると考えられる。

ワクチンの有効性の評価には1)免疫原性評価、2)発症予防(ワクチン効果)、3)安全性(副反応評価)がある。今回の調査では1)と3)を評価した。免疫原性について十分な反応が得られ、さらに安全性に(副反応)についても、局所の反応のみで全身的な重篤な症状はみられなかったため、インフルエンザワクチンの安全性が示された。2)の発症予防については、インフルエンザ罹患の有無を用いてワクチン効果を算出する必要があるが、当該施設ではほとんどのスタッフも高齢者もワクチン接種を行っているため、非接種群が得られずワクチン効果の評価はできなかった。しかし、過去の我々の調査から高齢者施設のワクチン接種率が下がるとインフルエンザ流行が見られるため、今後もスタッフ、入所者共にワクチン接種率は高く保たねばならない。

全国的な2013-2014年シーズンの流行状況は、当教室の調査ではA/H1N1pdm09

が優勢な状況である。国立感染症研究所の病原体検出情報でも今シーズンは同様に全国的にA/H1N1pdm09が優勢ある。また、今シーズンは札幌市でオセルタミビル・ペラミビル耐性となるH275Y変異株の検出が報告され、全国的な耐性株の蔓延が懸念されている。当教室の調査ではA/H1N1pdm09は感受性で有り、H275Y変異株は検出されていない。同研究所によると、これら札幌で地域的に発生したH275Y変異株は樹形図解析から中国由来であることが示唆されている。しかし、国立感染症研究所と地方衛生研究所の報告によると、2013年末から、大阪、三重、山形などで札幌との疫学リンクのないH275Y変異株が見つかり、今後も変異株の蔓延が心配されている。

## E. 結論

2013-2014年シーズン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。インフルエンザワクチン株は毎年流行する株に応じて国立感染症研究所がワクチン株を変更している。このため、毎年接種後に血清採血を行ってワクチンの免疫原性の調査を行う必要がある。今後も継続的な調査が必要である。

副反応も局所反応のみで重篤な症状はみられずワクチン接種の安全性が示された。

抗インフルエンザ剤の有効性を減じてしまう耐性株の蔓延は臨床的に大きな問題である。これまでのところ、今シーズンはH275Y変異株の大流行はないものの、過去には季節性A/H1N1で100%が変異株に置き換わる現象が見られたため今後も注意深くサーベイランスを続ける必要がある。

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

日比野亮信、近藤大貴、Clyde Dapat  
 Isolde Dapat、佐藤康平、八神錬、菖蒲  
 川由郷、齋藤玲子、黒木麗喜、真崎宏則。  
 2012/13 シーズン夏季に長崎で採取され  
 たA/H3N2 インフルエンザウイルスのシー  
 クエンス解析結果の報告。病原体検出情  
 報( IASR ) Vol. 34 11 月号 p. 339-342、  
 2013 年

- 2 . 実用新案登録  
なし
- 3 . その他  
なし

- 2 . 学会発表  
なし

**G . 知的所有権の取得状況**

- 1 . 特許取得  
なし

表 1 . 2013-2014 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									
Facility	Subject	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increase of HI titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=100	42.0±12.3	57.4	91.9	2.1	71.0	93.0	9.0
	Elderly	N=46	87.4±7.0	45.1	81.2	2.4	58.7	78.3	21.7
Titer of A/Texas/50/2012(H3N2) responses after influenza vaccine									
Facility	Subject	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increase of HI titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=100	42.0±12.3	54.3	96.5	2.2	70.0	93.0	18.0
	Elderly	N=46	87.4±7.0	33.4	73.1	3.2	52.2	84.8	30.4
Titer of B/Massachusetts/2/2012(Yamagata) responses after influenza vaccine									
Facility	Subject	Number	Age	GMT			Proportion of subjects protected (%)		Rate of 4 times increase of HI titer
				Pre	Post	Mean fold increase	Pre	Post	
Meikenannhuenn	Staff	N=100	42.0±12.3	49.9	69.2	1.5	74.0	86.0	6.0
	Elderly	N=46	87.4±7.0	17.2	33.9	2.9	26.1	52.2	28.3

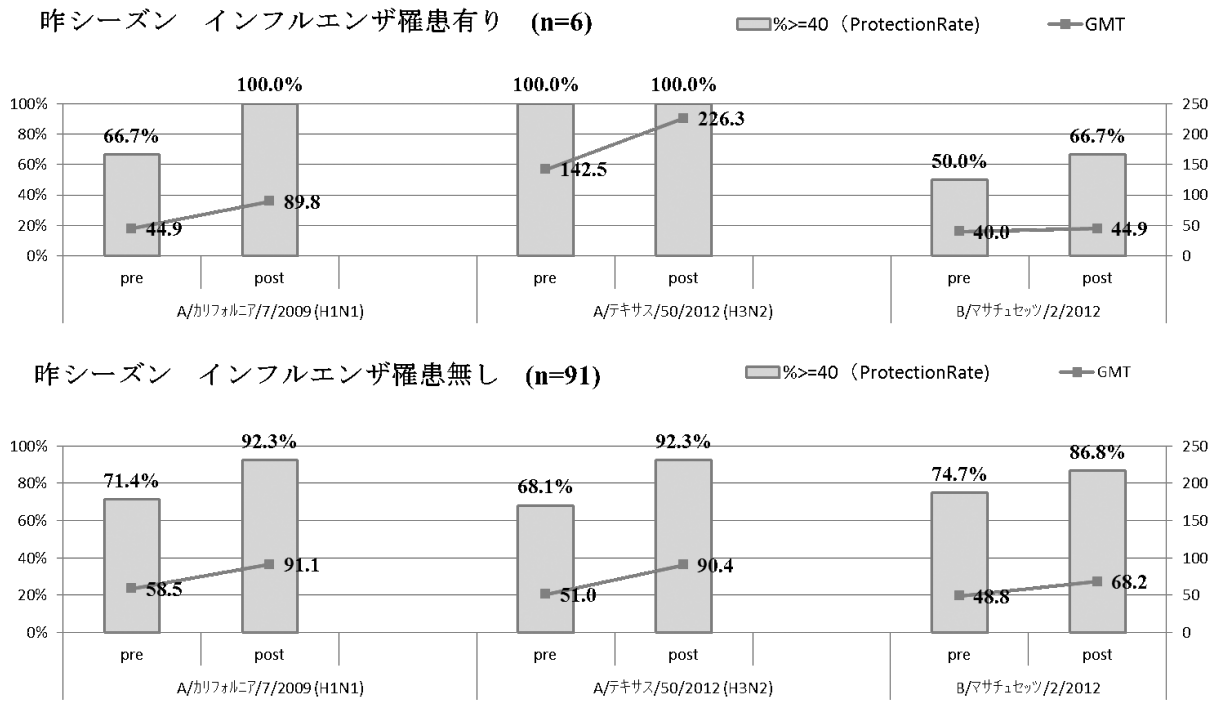


図1. 昨シーズンの成人（スタッフのみ）インフルエンザ罹患者と非罹患者のHI抗体価のワクチン接種前後の抗体価の推移

表2. インフルエンザワクチン接種後の副反応（複数回答）

インフルエンザワクチン副反応（複数回答）

	発疹	発赤	腫れ	痛み	その他
成人層(n=100)	3	48	41	27	8
%	3.0%	48.0%	41.0%	27.0%	8.0%
高齢者層(n=46)	0	22	3	1	0
%	0.0%	47.8%	6.5%	2.2%	0.0%
全体(n=146)	3	70	44	28	8
%	2.1%	47.9%	30.1%	19.2%	5.5%

表3. 2013-14年シーズン新潟大学におけるインフルエンザ検出状況（2014年2月5日現在）

調査地域	総検体数	A型			B型		陰性	型別不可	調査中		
		H1N1pdm09 内訳			H1N1pdm09	H3N2				ビクトリア系統	山形系統
		感受性	H275Y変異	合計割合							
北海道	17	0	0	0.0%	0	2	0	0	12	0	3







## 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/02/2012)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

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) 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

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

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

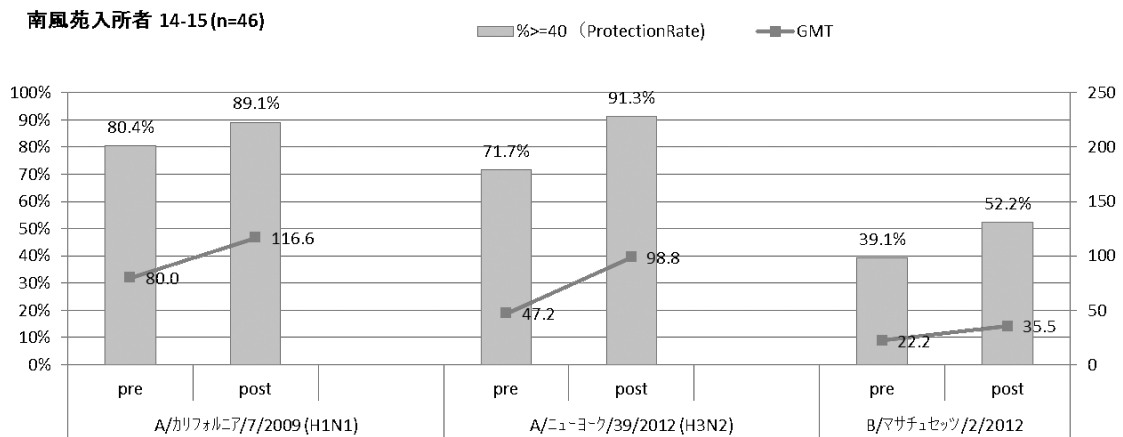
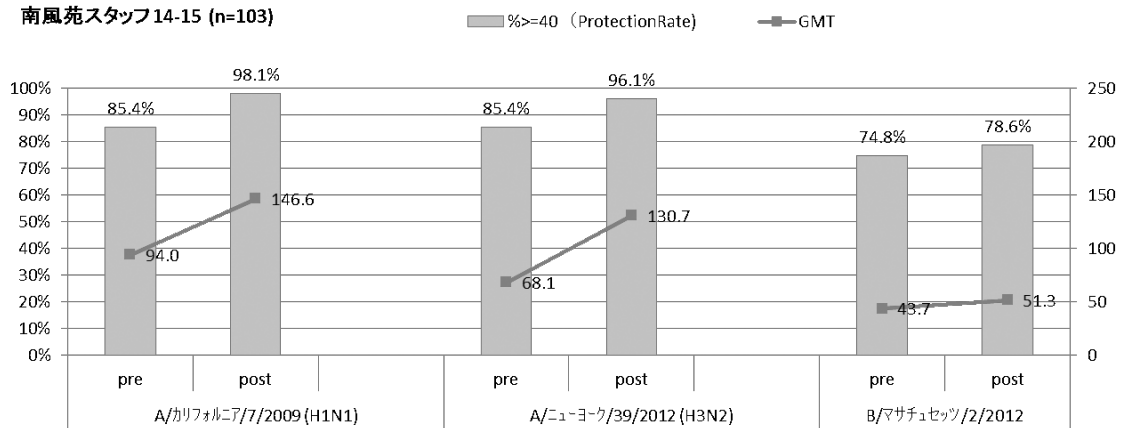


図1 .成人層(スタッフ)と高齢者層(入所者)のワクチン接種前後のHI抗体価の推移(40倍以上の抗体価保有率%と、抗体価幾何平均GMT)

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/カリフォルニア/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

## 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、岩淵香織、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報	49号	77-80	2016
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	88-91	2015
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
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
安井善宏、中村範子、安達啓一、尾内彩乃、廣瀬給美、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		2015
高橋雅輝、岩淵香織、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	岩手県環境保健研究センター年報	第13号平成25年度(2013)	71-79	2015

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, 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
Morikawa S, Hiroi S, Kase T	Detection of respiratory viruses in gargle specimens of healthy children.	J. Clin. Virol.	64	59-63	2015
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
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.	11(2)	386-390	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
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. Virology.	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(6)	e1004856	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. Virology.	doi: 10.1128/JVI.02790-15		2015
中村一哉、岸田典子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、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	2014/15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	36(11)	202-207	2015

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
安井善宏	インフルエンザウイルスの動向と疫学	The Medical & Test J.	1331	6	2015
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 2014/15シーズン	北海道立衛生研究所報	65		2015
調 恒明	インフルエンザ病原体サーベイランスの変化とその意味	Pharma Medica	33(11)	15-18	2015
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)	262-63	2014
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	254-58	2014
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耐性とその対策	医薬ジャーナル	50巻 10号	101-105	2014
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	2014
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	64		2014
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(6)	692-705	2014
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.	Eurosurveill.	19(1)		2014
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. Virology.	88(8)	4145-60	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	Microbes. Infect.	16(11)	936-44	2014
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. Infect.	16(4)	320-7	2014
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
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
Herfst S, Imai M, Kawaoka Y & Fouchier RA.	Avian influenza virus transmission to mammals.	Top. Microbiol. Immunol.	385	137-155	2014
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	5021	2014
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. Virology.	88(6)	3598-604	2014
Mochizuki, D., Arai, T., Asano, M., Sasakura, N., Watanabe, T., Shiwa, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Fujinami, S., Fujita, N., Abe, A., Sato, J, Nakagawa, J. and Niimura, Y.	Adaptive response of <i>Amphibacillus xylanus</i> to normal aerobic and forced oxidative stress conditions.	Microbiology	160(Pt2)	340-52	2014
Ohji, S., Hosoyama, A., Tsuchikane, K., Ezaki, T., Yamazoe, A. and Fujita, N.	The complete genome sequence of <i>Pseudomonas putida</i> NBRC 14164T confirms high intraspecies variation.	Genome Announc.	2(1)	e00029-14	2014
Yamamura, H, Ashizawa, H., Hamada, M., Hosoyama, A., Komaki, H, Otoguro, M., Tamura, T., Hayashi, Y., Nakagawa, Y., Ohtsuki, T., Fujita, N., Ui, S. and Hayakawa, M.	<i>Streptomyces hokutonensis</i> sp. nov., a novel actinomycete isolated from the strawberry root rhizosphere.	J. Antibiot.	67(6)	465-70	2014

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yang T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Kishida N, Shirakura M, Imai M, Asanuma H, Takeda N, Wakita T, Li T.	Characterization of self-assembled virus-like particles of ferret hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses.	J. General Virology.	94	2647-2656	2013
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, Eisfeld 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	501	551-555	2013
Wilker PR, Dinis JM, Starrett G, Imai M, Hatta M, Nelson CW, O' Connor DH, Hughes AL, Neumann G, Kawaoka Y, Friedrich, TC.	Selection on haemagglutinin imposes a bottleneck during mammalian transmission of reassortant H5N1 influenza viruses.	Nat. Commun.	4	2636	2013
Uraki R, Kiso M, Iwatsuki-Horimoto K, Fukuyama S, Takashita E, Ozawa M, Kawaoka Y.	A novel bivalent vaccine based on a PB2-knockout influenza virus protects mice from pandemic H1N1 and highly pathogenic H5N1 virus challenges.	J. Virology.	87(14)	7874-81	2013
Takashita E, Fujisaki S, Kishida N, Xu H, Imai M, Tashiro M, Odagiri T and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan.	Characterization of neuraminidase inhibitor-resistant influenza A(H1N1)pdm09 viruses isolated in four seasons during pandemic and post-pandemic periods in Japan.	Influenza and other respiratory viruses	7(6)	1390-9	2013
Fujisaki S, Imai M, Takashita E, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Yokoyama M, Sato H, Tashiro M, and Odagiri T	Mutations at the monomer-monomer interface away from the active site of influenza B virus neuraminidase reduces susceptibility to neuraminidase inhibitor drugs.	J. Infect. Chemother	19(5)	891-5	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kageyama T, Fujisaki S, Takashita E, Xu H, Yamada S, Uchida Y, Neumann G, Saito T, Kawaoka Y, Tashiro M.	Genetic analysis of novel avian A(H7N9) influenza viruses isolated from patients in China, February to April 2013.	Eurosurveill.	18(15)	20453-20459	2013
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	549-51	2013
Imai M, Herfst S, Sorrell EM, Schrauwen EJ, Linster M, De Graaf M, Fouchier RA, Kawaoka Y.	Transmission of influenza A/H5N1 viruses in mammals.	Virus Research.	178	15-20	2013
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 2012/13シーズン	北海道立衛生研究所報	63		2013
川上千春、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(2012年9月～2013年5月)	横浜市衛生研究所報	52	69-75	2013
吉富秀亮・石橋哲也・中村朋史・世良暢之	2012/13シーズンに分離されたインフルエンザウイルスの抗原性及び系統解析	福岡県保健環境研究所年報	40	90-93	2013
安井善宏、尾内彩乃、中村範子、小林慎一、山下照夫、皆川洋子	愛知県で2013/14シーズンに初めて分離されたB型インフルエンザウイルス(Victoria系統)の性状	病原微生物検出情報	34(12)	376-377	2013
岸田典子、徐紅、高下恵美、藤崎誠一郎、今井正樹、伊東玲子、佐藤彩、土井輝子、江島美穂、金南希、菅原裕美、小田切孝人、田代真人、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	国内インフルエンザ流行株の抗原性解析および薬剤体制株の検出状況(途中経過)	病原微生物検出情報	34(5)	141-142	2013
岸田典子、高下恵美、藤崎誠一郎、徐紅、土井輝子、伊東玲子、佐藤彩、菅原裕美、江島美穂、金南希、三浦舞、今井正樹、小田切孝人、田代真人、小口晃央、大下龍蔵、藤田信之、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	2012/13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	34(11)	328-334	2013
日比野亮信、近藤大貴、Clyde Dapat Isolde Dapat、佐藤康平、八神錬、菖蒲川由郷、齋藤玲子、黒木麗喜、真崎宏則	2012/13シーズン夏季に長崎で採取されたA/H3N2インフルエンザウイルスのシーケンス解析結果の報告	病原微生物検出情報	34(11)	339-42	2013
Fukuhara, Y., Kamimura, N., Nakajima, M., Hishiyama, S., Hara, H., Kasai, D., Tsuji, Y., Narita-Yamada, S., Nakamura, S., Katano, Y., Fujita, N., Katayama, Y., Fukuda, M., Kajita, S. and Masai, E.	Discovery of pinoresinol reductase genes in sphingomonads.	Emz. Micobial Tec.	52	38-43	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ichikawa, N., Sasagawa, M., Yamamoto, M., Komaki, H., Yoshida, Y., Yamazaki, S. and Fujita, N.	DoBISCUIT: a database of secondary metabolite biosynthetic gene clusters.	Nucleic Acids Res.	41	408-14	2013
Miura, H., Hori, K., Sasaki, Y., Inahashi, Y., Yagisawa, Y., Fujita, N., Omura, S. and Takahashi, Y.	Simple analytic method of diaminopimelate epimerase activity.	J.Biosci. Bioeng.	116	253-5	2013
Matsumoto, A., Kasai, H., Matsuo, Y., Shizuri, Y., Ichikawa, N., Fujita, N., Omura, S. and Takahashi, Y.	<i>Illumatobacter nonamiense</i> sp. nov. and <i>Illumatobacter coccineum</i> sp. nov. isolated from seashore sand.	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.	63	3404-8	2013
Shintani, M., Hosoyama, A., Ohji, S., Tsuchikane, K., Takarada, H., Yamazoe, A., Fujita, N. and Nojiri, H.	Complete genome sequence of the carbazole degrader <i>Pseudomonas resinovorans</i> CA10 (= NBRC 106553).	Genome Announc.	1(4)	e00488-13, 2013	2013
Matyi, S., Hoyt, P., Hosoyama, A., Yamazoe, A., Fujita, N. and Gustafson, J.	Draft genome sequences of <i>Elizabethkingia meningoseptica</i> .	Genome Announc.	1(4)	e00444-13	2013
Fujinami, S., Takarada, H., Kasai, H., Sekine, M., Omata, S., Harada, T., Fukai, R., Hosoyama, A., Horikawa, H., Kato, Y., Nakazawa, H. and Fujita, N.	Complete genome sequence of <i>Illumatobacter coccineum</i> YM16-304T. Stand.	Genome Sci.	8	430-40	2013
Ohtsubo, Y., Fujita, N., Nagata, Y., Tsuda, M., Iwasaki, T., and Hatta, T.	Complete genome sequence of <i>Ralstonia pickettii</i> DTP0602, a 2,4,6-trichlorophenol degrader.	Genome Announc.	1(6)	e00903-13	2013