

福井県における新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) への 検査対応について

中村雅子・東方美保・平野映子・望月典郎

Examination and Research of Influenza A(H1N1)pdm
in Fukui Prefecture

Masako NAKAMURA, Miho TOHO, Eiko HIRANO, Michio MOCHIZUKI

1. はじめに

2009年4月にメキシコとアメリカでアウトブレイクの発生が報告された新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) は、またたく間に世界中に広がった。我が国においても4月28日、厚生労働省がこれを「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律」における「新型インフルエンザ等感染症」として位置づけ、対策が強化された。

初期には患者の早期発見を目的とした全数把握を、まん延期以降は感染拡大の早期探知やウイルス性状の変化の監視等を目的として、クラスター・入院サーベイランスおよび重症・死亡例サーベイランスなどが行われた。

このような中、当センターでは県内唯一の新型インフルエンザ検査機関として、これらのサーベイランス検体の検査を行うとともに、感染症情報ホームページを通じて患者数や検査結果などの感染症情報を発信した。

本報では当センターにおける新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) への対応状況と、2009年5月から2010年3月までの検査結果について報告する。

2. 検査体制

2. 1 サーベイランス体制

2009年5月4日；国立感染症研究所（感染研）から必要な試薬等が配布された。検査体制を整備し、発熱外来経由の全数把握検査を開始。

6月16日；サーベイランス体制が強化され、以後は発熱外来受診者は迅速診断キット陰性でもPCR検査を実施。

インフルエンザ病原体定点として指定された福井県立病院、公立丹南病院および市立敦賀病院の3病院の検体を毎日検査。

7月5日；県内1例目を検出。

7月24日；全数把握が中止され、以後はクラスター・入院サーベイランス、ウイルスサーベイランスとなる。インフルエンザ病原体定点は福井県立病院と市立敦賀病院の2病院となり、週1回検査を実施。

8月25日；クラスターサーベイランスの検査が中止される。

12月21日；入院全例把握が中止され、以後は重症例・死亡例のみの検査となる。

2010年4月5日；通常のサーベイランス体制に移行。

(表1)

2. 2 当センターが実施した業務

(1) 検体搬入後、直ちに遺伝子検査を行った。

当初は Conventional RT-PCR 法とリアルタイム RT-PCR (TaqMan Probe) 法を併用したが、7月8日以降はリアルタイム RT-PCR 法のみを行い、即日結果を報告した。7月24日からは病原性や薬剤耐性などのウイルスの性状の変化を把握する目的で、ウイルス分離・HI 試験と薬剤耐性株サーベイランスを併せて実施し、その結果は後日追加報告した。

(2) 患者数定点報告や検査情報を集計し、新型インフルエンザに関する情報等を福井県感染症情報ホームページ (<http://kansen.erc.pref.fukui.jp/>) に毎週掲載した。

表1 福井県における新型インフルエンザ検査体制

	2009年5月4日～	6月16日～	7月24日～	8月25日～	12月21日～	2010年4月5日～
	5/4検査系の立ち上げ	サーベイランス強化	全数把握の中止	クラスター検査の中止	入院全例検査の中止	通常のサーベイランス体制に移行
行政検査	発熱外来等(全数把握)		クラスター・入院	入院	重症例・死亡例	重症例・死亡例
	インフルエンザが疑われるすべての患者		発生集団の中から1～2名すべての入院患者	すべての入院患者		
定点 サーベイランス		福井県立病院 公立丹南病院 市立敦賀病院	福井県立病院 市立敦賀病院	福井県立病院 市立敦賀病院	福井県立病院 市立敦賀病院	小児科2医療機関
		(毎日)	(週1回)	(週1回)	(週1回)	(週1回)
検査体制	24時間体制		原則1日1回検査	原則1日1回検査	原則1日1回検査	随時検査

2. 3 検査体制の整備

2. 3. 1 所内の体制

(1) 所内に所長、管理室長、保健衛生部長等 6 名で構成される新型インフルエンザ対策委員会を設置し、検査全般の指揮、健康増進課との連絡調整、検査結果の確認・報告およびマスコミ対応（技術的情報）などを行った。検査結果はすべてこの委員会の複数人数で確認し、検体受領後 6 時間以内に管理室から健康増進課へ報告した。

(2) 検査班はウイルス研究グループ 3 名に加え、5 月 13 日～18 日および 6 月 24 日～7 月 13 日に所内研修を 13 回実施し、6 名の応援要員を確保した。全数把握期間（7 月 23 日まで）は、夜間・休日は保健衛生部 2 名ずつでオンコールによる 24 時間体制をとった。

(3) 定点サーベイランス検体は、7 月 23 日までは県内 3 病院の検体を交替制で毎日回収、7 月 24 日以降は 2 病院の検体を週 1 回回収した。

2. 3. 2 機器整備

以下の機器を緊急に整備した。

(1) リアルタイム PCR 装置；

Step One Plus リアルタイム PCR システム（アプライドバイオシステムズジャパン(株)）を購入し、既存の ABI 7900HT との併用で検体数の増加に備えた。

(2) シーケンサー；

既存の ABI PRISM 377XL の更新として、ABI 3130 ジェネティックアナライザ（アプライドバイオシステムズジャパン(株)）を購入し、検査の迅速化を図った。

(3) 遺伝子抽出装置；

これまで遺伝子抽出は用手法で行っていたが、EZ1 Advanced（(株)キアゲン）を購入して自動化し、検査精度と検査効率の向上を図った。

2. 3. 3 その他

(1) 感染研から提示されたマニュアルをもとに、直ちに使用するキットの比較検討を行い、当センター検査マニュアルおよび検査ワークシートを整備した。300 検体分の遺伝子検査用試薬を確保した。

(2) 検査依頼状況、検査結果などすべてのデータをグループ共有フォルダに入れ、情報の共有を図った。

(3) 検体採取液を約 500 本作成し、検体採取用綿棒および搬送容器とともに各健康福祉センターに配布した。

3. 検査法

3. 1 検査材料

2009 年 5 月から 2010 年 3 月までの期間、前記のサーベイランスにより新型インフルエンザ感染が疑われる患者から採取された咽頭拭い液または鼻腔拭い液 266 検体。内訳は発熱外来経由 48 件、クラスターサーベイランス 9 件、入院サーベイランス 144 件および定点サーベイランス 65

件である。発熱外来経由、クラスターサーベイランスおよび入院サーベイランスは健康福祉センターから搬入され、定点サーベイランスは当センターが回収した。

検体を採取した綿棒を採取液に浸した状態で冷蔵で搬入し、0.22μm のフィルターでろ過した後、検査に供した。

3. 2 検査方法

3. 2. 1 遺伝子検査

A 型インフルエンザウイルス共通の M 遺伝子 (A/M) と、新型 (AH1pdm)、A ソ連型および A 香港型それぞれの HA 遺伝子 (SwH1・H1・H3) の 4 種類の遺伝子を検出する検査を同時に行った。

それぞれの検査法は感染研から提示されたマニュアル（病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ：2009 年 5 月 Ver.1、2009 年 11 月 Ver.2）に従った。

RNA 抽出には Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) または EZ1 Virus Mini Kit (QIAGEN) を用いた。Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた場合は検体 140μL を、EZ1 Virus Mini Kit (QIAGEN) を用いた場合は検体 200μL を用い、どちらも 60μL に溶出した。

Conventional RT-PCR 法には、OneStep RT-PCR Kit (TaKaRa)、OneStep RT-PCR Kit(QIAGEN)、Access Quick RT-PCR System (Promega) の 3 社のキットの感度を比較検討した結果、OneStep RT-PCR Kit(QIAGEN) を用いた。

リアルタイム RT-PCR 法は感染研のマニュアルで使用されている QuantiTect Probe RT-PCR Kit(QIAGEN) を用いた。

3. 2. 2 ウイルス分離—HI 試験

ウイルス分離は、MDCK 細胞を用い既報¹⁾ に準じて行った。抗血清は、新型は抗 A/California/7/2009(H1N1pdm) を、その他は今シーズンのインフルエンザサーベイランスキットとして感染研から分与された抗 A/Brisbane/59/2007(H1N1)、抗 A/Uruguay/716/2007(H3N2)、抗 B/Brisbane/3/2007 および抗 B/Malaysia/2506/2004 を用いた。(11 月 13 日までは昨シーズンのサーベイランスキットの抗血清を用いた。)

HA 価が上昇せず、HI 試験ができない場合は MDCK 細胞培養上清液から抽出した遺伝子をリアルタイム RT-PCR 法で同定した。

3. 2. 3 薬剤耐性株サーベイランス

感染研から提示されたマニュアル（新型インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス A/H1N1pdm—NA 遺伝子解析実験プロトコル：平成 21 年 9 月）により、NA 遺伝子の部分的なシーケンスを行い、ノイラミニダーゼ阻害薬 (NAI) 耐性の指標となる H275Y マーカーの検索を行った。

4. 検査結果

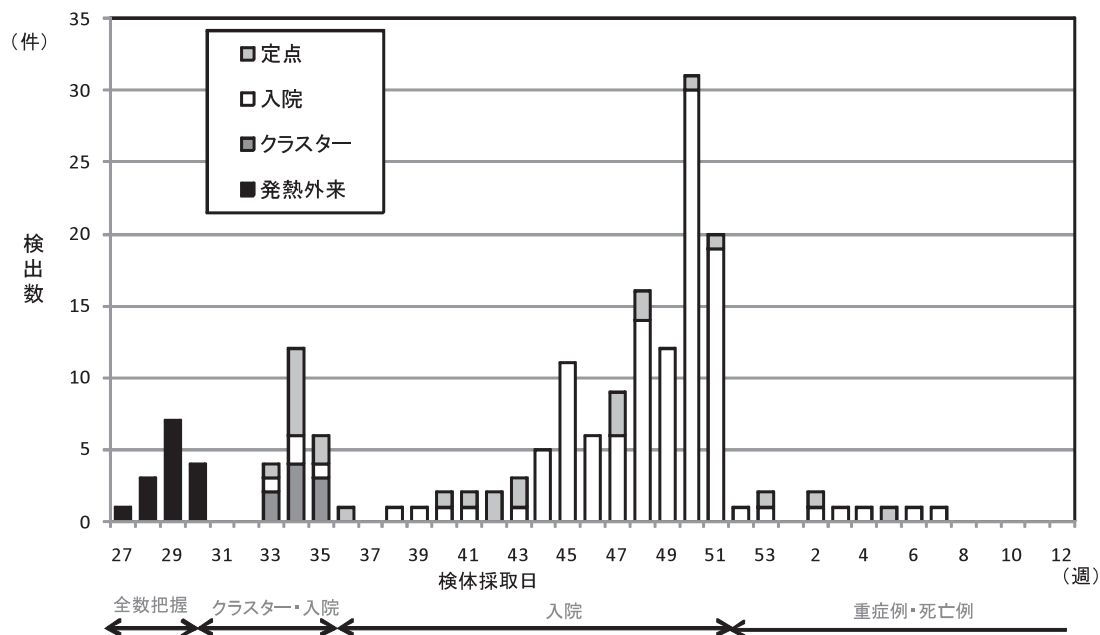


図1 AH1pdm検出状況(～2010年12週、福井県)

4. 1 遺伝子検査

(1) Conventional RT-PCR 法とリアルタイム RT-PCR 法により AH1pdm を 169 件、A ソ連型を 1 件および A 香港型を 2 件検出した (表 2)。

表2 検体数とウイルス検出状況 2009.5.4～2010.3.31

	発熱外来	クラスター	入院	定点	計
AH1pdm	15	9	119	26	169
A ソ連型	1				1
A 香港型	2				2
陰性	30	0	25	39	94
検体数 (計)	48	9	144	65	266

AH1pdm が本県で初めて検出されたのは 7 月 5 日で、若狭健康福祉センター管内において県外からの帰省者から 7 月 4 日に採取された検体であった。5 月 15 日に神戸市で国内初感染例が報告されて以降、都道府県別では 45 番目の検出であった。これ以降、発熱外来の検体からは第 30 週までに 15 件、クラスターサーベイランスでは第 33～35 週に 9 件、入院サーベイランスでは第 33 週以降に 119 件、定点サーベイランスでは第 33 週以降に 26 件検出された。サーベイランスの種類によって検体数が大きく異なるので、検出数が流行状況をそのまま反映している訳ではないが、検出数のピークは 12 月上旬の第 50 週であり、患者報告のピーク (第 48 週) よりも 2 週遅れであった²⁾。12 月 21 日に入院サーベイランスが重症例・死亡例のみになってからは検査数が減少した。

A ソ連型は第 29 週に香港・中国からの帰国者から、A

香港型はいずれも第 28 週に中国からの帰国者から検出されたのみであった。

(2) この検査系では A/M と SwH1 が陽性になった場合に AH1pdm と同定されるが、ほとんどの場合 H1 も陽性であった。H1 が陰性であったのは 169 件中 16 件であり、いずれも A/M や SwH1 の Ct 値が高く、ウイルス量が少ない検体であったと考えられる。

(3) 発熱外来の検体では、ほぼ同時期に採取された検体で迅速診断キットとリアルタイム RT-PCR 法を行ったが、結果が一致しない例もあった (表 3)。迅速診断キット陰性でリアルタイム RT-PCR 法陽性となるのは感度の差によると考えられるが、迅速診断キット陽性でリアルタイム RT-PCR 法陰性となったのが 2 件あった。このような例は全国的にも見られており、全国地方衛生研究所の集計では、ほとんどが迅速診断キット実施の際に新型インフルを見逃すまいとする心理から本来陰性のものを拾ってしまったことによると考察している。(当センターで得た情報でも、本来なら陰性とするべきの薄いラインを陽性としたというケースがあった。)

表3 迅速診断キットとの比較

		リアルタイム RT-PCR 法		
		(+)	(-)	計
迅速診断 キット	(+)	10	2	12
	(-)	5	27	32
	不明		1	1
	計	15	30	45

(発熱外来のうち A ソ連型、A 香港型を除いた 45 検体)

表4 分離されたウイルスの抗原性状

モルモット血球 (0.5%)

HI価							分離数	
A/California/7/2009 (H1N1)pdm	A/Brisbane/59/2007 (H1N1)	A/Uruguay/716/2007 (H3N2)	B/Brisbane/3/2007*	B/Malaysia/2506/2004*	B/Brisbane/60/2008	B/Bangladesh/3333/2007		
320	<10	<10	<10	<10			1	1
640	<10	<10	<10	<10			3	14
					<10	<10	11	
1280	<10	<10	<10	<10			8	51
					<10	<10	43	
2560	<10	<10	<10	<10			13	32
					<10	<10	19	
5120	<10	<10	<10	<10			2	2
PCR法で同定							34	34
計							134	134

(ホモ価)

2560

640

2560

2560

5120

1280

2560

*) 2008/09シーズン用抗血清

4. 2 ウイルス分離・HI 試験

7月24日以降に遺伝子検査で陽性となった検体について、ウイルス分離を実施した。インフルエンザウイルスが分離されたのは134検体であった。

HA 価が上がらない株が多く、血球の種類や濃度を変えて試してみたが、思わしい結果が得られず、結局例年通り0.5%モルモット血球でHI試験を行った。

HI試験を実施した100株はすべてAH1pdmであった。ワクチン株である抗A/California/7/2009 (H1N1pdm)に対する抗原性状は、ホモ価と4倍以内が99株と99%を占め、8倍以上の変異株は1株のみであった(表4)。国内外の分離株も遺伝的にはほぼ均一で、代表株抗A/California/7/2009 (H1N1pdm) 類似株が大勢を占めているとのことである³⁾。HI試験が実施できなかった34株は培養液を材料としたRT-PCR法で同定した結果、すべてAH1pdmであった。

なお、県内のウイルス分離状況は福井県感染症情報ホームページに随時掲載した。

4. 3 薬剤耐性株サーベイランス

7月24日以降に検出されたA/H1N1pdmのうち、ウイルス分離可能であった135検体すべてについて薬剤耐性株サーベイランスを実施した。その結果、275番目のアミノ酸がTyrosine(Y)にアミノ酸置換を起こしているNAI耐性株が1株(A/FUKUI/159/2009pdm)検出された。これは丹南保健所管内在住の女兒から12月4日に採取された検体で、患者は5日間タミフルを投与しており患者の体内で薬剤の選択圧を受けたものと考えられた。感染研で実施した感受性試験の結果では、この株は薬剤耐性マーカーを持たないA/H1N1pdmに比べ、オセルタミビルに対して約330倍感受性が低下していた。一方、ザナミビルに対しては感受性を保持していた(表5)。

この試験は通常MDCK培養上清を用いて実施するが、死亡例のうち1例についてはウイルス分離陰性であったため臨床検体から直接試験を実施した。2nd-PCRで遺伝子を再増幅することによって検査可能であり、耐性変異は起こしていないことが確認された。

なお、全国のA/H1N1pdm耐性株の出現率は2009年6月1日時点で1.09%であった⁴⁾。一方、Aソ連型は2007/08

表5 オセルタミビルおよびザナミビル感受性試験結果 (1/21/2009 感染研実施)

Strains	Subtype	H275Y	IC50(nM)	
			Oseltamivir	Zanamivir
A/CALIFORNIA/07/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.10	0.40
A/NARITA/1/2009Epdm*	H1N1pdm	275H	0.37	0.99
A/FUKUI/159/2009pdm	H1N1pdm	275Y	33.89	0.18
A/DENMARK/528/2009pdm (オセルタミビル陽性コントロール)	H1N1pdm	275Y	39.63	—
A/DENMARK/524/2009pdm (オセルタミビル陰性コントロール)	H1N1pdm	275H	0.09	—
IC 50 平均値(A/H1N1pdm感受性株)			0.09±0.01	0.28±0.05

*前回測定したデータ

シーズンからオセルタミビル耐性ウイルスが出現し、現時点では国内ではほぼ 100%が耐性株となっている⁵⁾。この A ソ連型耐性株との遺伝子交雑で感染伝播力を持った A/H1N1pdm が発生することが懸念されている。現在検出されている A/H1N1pdm 耐性株はほとんどが薬剤の投与中に発生しており、効率よくヒト-ヒト感染する性質はまだ獲得していない⁶⁾が、今後も引き続き監視が必要である。

5. まとめ

- (1) 2009 年 5 月から 2010 年 3 月までの期間、266 検体を検査し、AH1pdm を 169 件、A ソ連型を 1 件および A 香港型を 2 件検出した。検出数が最も多かったのは 12 月上旬の第 50 週であった。
- (2) インフルエンザウイルスが分離されたのは 134 検体であり、これはすべて A/H1N1pdm であった。
- (3) 試験の結果、ほとんどが抗 A/California/7/2009 (H1N1pdm)に対してホモ価と 4 倍以内のワクチン類似株であった。
- (4) 薬剤耐性株サーベイランスでは、H275Y 耐性変異株が 1 株検出された。

参考文献

- 1) 中村雅子他：2005/2006 シーズンの福井県のインフルエンザ，福井県衛生環境研究センター年報，4, 91-97 (2006)
- 2) 福井県感染症情報：福井県におけるインフルエンザの推移，<http://kansen.erc.pref.fukui.jp/>
- 3) 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・WHO インフルエンザ協力センター：2008/09 シーズンの季節性および新型インフルエンザ分離株の解析，病原微生物検出情報，30，287-297(2009)
- 4) 国立感染症研究所感染症情報センター：2009 年 5 月～2010 年における新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) オセルタミビル耐性株検出情報，<http://idsc.nih.gov.jp/iasr/graph/tamiful09-10.gif>
- 5) Makoto Ujike : Oseltamivir-Resistant Influenza Viruses A(H1N1) during 2007-2009 Influenza Seasons, Japan, Emerg Infect Dis, 16, 926-935(2010)
- 6) 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：新型インフルエンザ (A/H1N1pdm) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第 1 報]，病原微生物検出情報，31，49-53(2010)