

新型インフルエンザ出現の迅速探知に関する研究

林志直^a, 新開敬行^a, 長島真美^a, 吉田勲^a, 原田幸子^a, 長谷川道弥^a, 岡崎輝江^a, 細矢博子^a, 灘岡陽子^b, 池田一夫^b, 早田紀子^b, 杉下由行^b, 神谷信行^b, 甲斐明美^c

東京都健康安全研究センターは、流行発生が懸念されている新型インフルエンザに対応するために、2009年度から2011年度の3ヵ年で重点研究「新型インフルエンザ出現の迅速探知に関する研究」を実施した。

本研究では、インフルエンザA/H1N1pdm09のヘマグルチニン（HA）遺伝子と、インフルエンザA型核蛋白質（NP）遺伝子検出用のリアルタイムPCR法を開発した。NP遺伝子の変異に対応し、検出制度を維持するためにプライマーの修正を行なった。更に、検出されたインフルエンザウイルスAH1N1pdm09HA遺伝子の配列について解析を行なった。その結果、検出ウイルスは4クラスターに分類された。

新たに開発したインフルエンザA/H1N1pdm09検出用のリアルタイムPCR法により、小児科外来からの検査材料についてウイルス検索を行なった。調査期間中に、中枢神経系疾患等の呼吸器疾患以外の患者材料から、インフルエンザウイルス17件（AH1pdm09：5件，AH3：4件，B型：8件）を検出した。

新たにA/H1N1pdm09亜型のおセルタミビル耐性変異の検出法と、A/H3N2亜型（E119V）およびB型（R152K）変異検出用のreal-time PCR法を開発した。2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09亜型（151株），A/H3N2亜型（75株）およびB型（55株）を調査したところ，A/H1N1pdm09亜型2株にH275Yのアミノ酸変異が認められた。

感染症情報センター（疫学情報室）では、新型インフルエンザ発生動向の把握や情報発信，また検査結果の返信を迅速かつ効率的に行なった。特に，初めて本格稼動した東京都感染症危機管理情報ネットワークシステム（K-net）を使い，関係者間の情報の共有化を図った。

キーワード：新型インフルエンザ，リアルタイムPCR法，ヘマグルチニン遺伝子，ノイラミニダーゼ遺伝子，核蛋白質遺伝子，系統樹解析

はじめに

高病原性トリインフルエンザは2003年にタイ，ベトナム等東南アジア地域で流行が始まり，2009年にメキシコ，アメリカで豚に由来する（H1N1）2009パンデミックが確認され，またたくまに世界に広がった¹⁾。東京都では，新型インフルエンザの発生に備え，マニュアルの策定や検査対応機器の整備等の準備を行ってきた。

東京都健康安全研究センターでは，発生が懸念されている新型インフルエンザの迅速探知と行政対応を円滑に遂行するために，平成21年度から23年度の3ヵ年で重点研究「新型インフルエンザ出現の迅速探知に関する研究」を実施した。

本研究は，微生物部のウイルス研究科と疫学情報室（研究開始当時）において，①新型インフルエンザ検出法の検討，②感染症サーベイランスへの導入，③薬剤耐性の解析，④サーベイランス情報システムの改良について，の4課題として実施された。本稿では，これらの課題のそれぞれについて，3年間の研究成果を報告する。

1 新型インフルエンザウイルス検出法の検討

実験方法

1. インフルエンザウイルス(AH1N1pdm09)検出用のプライマー・プローブの設計

1) HA（ヘマグルチニン）領域のリアルタイムPCR法

本研究では，WHOが公開したA/California/04/2009株²⁾と，ブタインフルエンザウイルスA/Hsw/NJ/08/1976株のHA遺伝子配列を参考とし，Primer Express 2.0および3.0（ライフテクノロジー）を用いてプライマーとプローブの開発を行った。

2) NP（核蛋白質）領域のリアルタイムPCR法

A型インフルエンザウイルス共通領域を検出するプライマーとプローブは，A/California/04/2009株とインフルエンザAH1～H16亜型までのNP（核蛋白質）遺伝子情報を収集し，Genetyx ver.7.0（ゼネティックス）により多重アライメント解析を行い，共通配列を作製し，この配列に基づきPrimer Express 2.0および3.0を用いて，インフルエンザA型ウイルス共通のプライマーとプローブを作製した。

^a 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター企画調整部健康危機管理情報課

^c 東京都健康安全研究センター微生物部

Analysis	Target Gene	Subtype	Primer/Probe Name	Primer/Probe Sequence	
real-time PCR	HA	H1	H1-VAF	5'-CTCTGTAGTGTCTTCACATTTAGCAGAAG-3'	
			H1-VAR	5'-TGATCTCTTAC TTGGGCTTTTGG-3'	
		HA	H3	H1-MGBVA	5'-FAM-TTCACCCGAGAATA-MGB-3'
				RT-H3-F	5'-CTAAGCATCAGGAAGAATCAC-3'
			H3-R	5'-CCGATATTCGGGATTCAGTTGT-3'	
			H3-P2	5'-VIC-TCTTACCAAAGRAGCC-MGB-3'	
		B	RT-B-F210	5'-CAATCTCTAAAGTTCATCTC-3'	
			RT-B-R277	5'-GCCGCCAATCTGAGAAACA-3'	
		N1	B-239P	5'-VIC-AATGGAGTAAACACACATT-MGB-3'	
			NA1-481H-F	5'-TGTCTGTGGTGAACGGCTCATG-3'	
		NA	NA1-743H-R	5'-GAGGCGGCCCCATTACT-3'	
			NA1-708TP-H	5'-FAM-CATAATGACCGATGGCC-MGB-3'	
		N2	NA2-295-F	5'-ACATTACAGGATTTGCCACCTTT-3'	
			NA2-351-R	5'-CACACACCAGGAAGTCCAA-3'	
		NP	A	N2-319TP	5'-VIC-CTAAGGACAAATTCG-MGB-3'
				RT-ANP-24F	5'-CTCACYGAGTGACATYAMRYCATG-3'
		HA	A/RI/pdm09	RT-ANP-94R	5'-CAATGTCTCATYTGTCRFAAG-3'
				RT-ANP-24F2	5'-CTCACYGAGTGACATYAMRYCATG-3'
		HA	A/RI/pdm09	RT-ANP-94R2	5'-CATYTGTCATYTGTCRFAAG-3'
				A-NP-55	5'-FAM-CAGGCCACCAAGGRT-MGB-3'
HA	A/RI/pdm09	RT-SW-F	5'-TTGAGCTCWGTGTCATCATTGA-3'		
		RT-SW-R	5'-TWGGGCATGAAATGTCCT-3'		
HA	A/RI/pdm09	Flu-Hsw-9	5'-FAM-AGRTTGGAGATATTC-MGB-3'		
		NIID-swH1-F1	5'-AGAAAAGAAATGTAACAGTAAACACACTTGT-3'		
RT-PCR	RT-merged PCR	NIID-swH1-R1	5'-TGTTCACAAATGTARGACAT-3'		
		NIID-swH1-Prob2	5'-FAM-CAGCCAGCAATATTCATTACC-MGB-3'		
HA	A/RI/pdm09	SW-1-F	5'-GARAGTTTGGATATTC-3'		
		SW-1-R	5'-GCATATCTYGGTACCACATAGAT-3'		
HA	A/RI/pdm09	SW-2-F	5'-AAGRCARATTCATGGCCAA-3'		
		SW-2-R	5'-TCAGTCTCTGATAT-3'		
HA	A/RI/pdm09	NIID-SWH1-Conv-F1	5'-TGCATTGGGTAATGAACATTG-3'		
		NIID-SWH1-Conv-R1	5'-AATGTAGGATTTTC TGACCTTGG-3'		

表1. インフルエンザ検査に用いたプライマーとプローブの塩基配列

3) HA領域のRT-PCR法

本研究では、より長い領域のHA遺伝子を増幅・解析するために、2組のプライマーSW-1-F/RとSW-2-F/Rを作製した。これらは、国から示されたプライマー³⁾と組み合わせるOne-Step RT-PCRキット (QIAGEN) を用いた増幅により702塩基、2段階PCR法により384塩基長と350塩基長のPCR産物を得られるように設定した。

2. プライマー・プローブの動作確認

表1.にはインフルエンザウイルス (AH1N1pdm09) 検出用のプライマー・プローブの設計により得られたプライマーとプローブの塩基配列を示した。AH1N1pdm09亜型ウイルスのHA遺伝子検出用プライマー・プローブの動作確認は、ブタインフルエンザウイルスA/Hsw/NJ/08/1976株の抗原液からセパジーンRV-R (三光純薬) により抽出したウイルスRNA 5μLを用いて実施した。

また、A型共通配列の検出用プライマー・プローブの動作確認は、東京都健康安全研究センターで保有する6種類のA亜型株 (H1N1: A/Brisbane/59/2007類似株, H1N2: A/Yokohama/22/2002, H3N2: A/Uuguay/716/2007類似株, H5N1: A/Vietnam/1194/2004, H7N3: A/Mallard/Netherlands/12/2000, H9N2: A/Hongkong/2108/2003) の抗原液から抽出したウイルスRNA 5μLを用いて実施した。

リアルタイムPCR法に用いた試薬はQuantiTect Probe RT-PCR kit (QIAGEN)、検査機器はABI 7900HT (ライフテクノロジー) を用い、50°C40分、95°C15分の反応後に94°C15秒、57°C75秒を45回繰り返す反応条件とした。

One-Step RT-PCR法は、56°C30秒、50°C40分、95°C15分の加熱後、94°C30秒、51°C30秒、72°C40秒のサイクルを45回繰り返す条件で行った。また、2段階PCR法はOne-Step RT-PCR産物を基に耐熱性ポリメラーゼにTaKaRa Ex Taq (TAKARA) を用いて、94°C3分の加熱後、94°C1分、54°C (SW2-F/SW-2R) または50°C (NIID-Conv-F1/NIID-Conv-R1) 1分、72°C2分を35回繰り返して行った。

3. HA遺伝子の抗原解析

調査期間中に検出されたAH1N1pdm09亜型ウイルスのうち、解析領域が増幅可能であった239株については、得ら

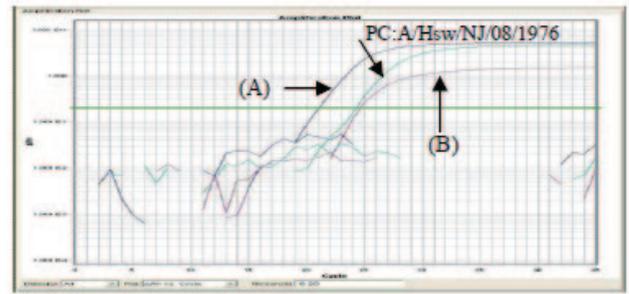


図1-1. リアルタイムPCR法によるインフルエンザAH1N1pdm09のHA遺伝子の検出

- (A): 今回開発したプライマーとプローブを使用
(B): 国の通知によるプライマーとプローブを使用

れたHA遺伝子の540bpから、ABI 3130ジェネティックアナライザー (ライフテクノロジー) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、Genetyx ver.7.0 (ゼネティックス) およびMEGA4 (メガソフト) によりアミノ酸配列に変換して多重アライメントを実施し、検出株とワクチン株および兵庫・大阪地域の流行株の配列データを対照として、近隣結合法による系統樹解析を行った。

結果及び考察

1. リアルタイムPCR用プライマー・プローブの設計および動作確認

開発したHA領域のリアルタイムPCR法のプライマー・プローブは、A/California/04/2009株およびブタインフルエンザウイルスA/Hsw/NJ/08/1976株のHA遺伝子配列を確実に検出することができた (図1-1)。AH1N1pdm09遺伝子検出の信頼性は東京都健康安全研究センターで保有していたA/Hsw/NJ/08/1976株から抽出したRNAを対照として同時に確認することで、飛躍的に高めることができた。

また、A型共通配列を含むNP遺伝子領域を検出するプライマー・プローブについては、動作確認を目的に東京都健康安全研究センターで保有しているA型インフルエンザウイルス6種類の各亜型RNAの検出を試みた。その結果、図1-2.に示したように全てのA亜型RNAは、19~23サイクルまでの比較的早いサイクル数で検出された。この結果から、AH1N1pdm09遺伝子検出において、A型共通配列の検出は、検査成績判定上の重要項目となった。

しかし、AH1N1pdm09亜型ウイルスの感染が拡大し多くの患者が確認された2009年9月以降には、NP遺伝子領域を検出するリアルタイムPCR法での検出サイクル数が、従来より6サイクル程度遅れる傾向が認められた。我々は、この原因としてNP領域の遺伝子変異を疑い、増幅領域の塩基配列の確認を行ったところ、上流プライマーおよび下流プライマーに1ヶ所ずつ、計2ヶ所の変異を確認した。そこで、2009年9月下旬にNP遺伝子検出用プライマー (RT-ANP-24F, RT-ANP-94R) の再検討を行い、上流側プライマー17番目の塩基をMからV、下流側プライマーの23番目の塩基をAからWに修正し (RT-ANP-24F2, RT-ANP-94R2)、再度AH1N1pdm09亜型ウイルスの検出確認を実施した。そ

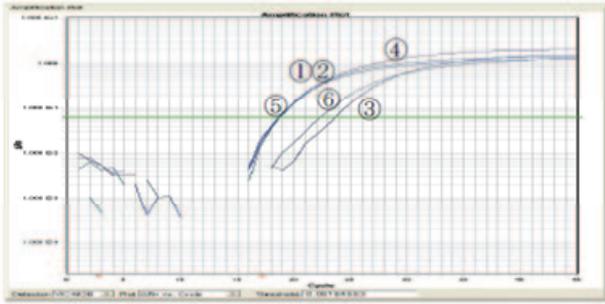


図1-2. リアルタイムPCR法によるインフルエンザA型ウイルス共通NP遺伝子の検出

- ①: A/Brubane/59/2007 類似株(H1N1), ②: A/Yokohama/22/2002 (H1N2)
- ③: A/Uruguay/716/2007 類似株(H1N2), ④: A/Vietnam/1194/2004(H5N1),
- ⑤: A/Mallard/Netherlands/12/2000(H7N3), ⑥: A/Hongkong/2108/2003(H5N2)

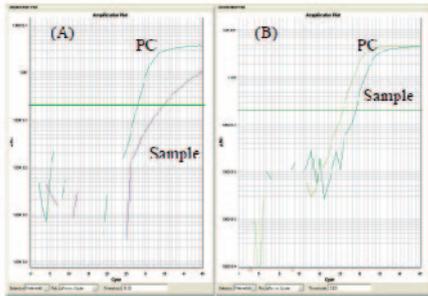


図1-3. インフルエンザA型ウイルス共通NP遺伝子検出用プライマーの変更前(A)と変更後(B)の比較

の結果, 検出サイクルの遅れは解消され (図1-3.), 新たなプライマーは2009年10月からの検査に導入した.

2. A/H1N1pdm09亜型ウイルスのHA遺伝子解析

調査対象としたAH1N1pdm09亜型ウイルス239株のHA遺伝子 (540塩基) のアミノ酸配列 (180アミノ酸) による系統樹解析を行った結果, AH1N1pdm09亜型ウイルスの都内流行株は, A/California/04/2009株を含むグループ以外にさらに3グループ, 合計4グループに分かれていることが判明した (図1-4.).

都内でのAH1N1pdm09亜型ウイルス検出第1例となった海外帰国者から検出されたウイルス (A/Tokyo/09-2057/2009) はグループ2に, 都内第2例で国内最初の流行地となった兵庫・大阪地域への旅行者から検出されたウイルス (A/Tokyo/09-2057/2009) はグループ1に属し, 発生当初はこれら2グループに属するウイルスが主体となって流行していたと考えられる. しかし, グループ1のウイルスは2009年の流行途中から消失し, その後は全く検出されていない. また, グループ2の2010年以降の検出例は数例に止まり, 2010/2011流行期はグループ3に含まれる株が大多数を占めていた. 一方, グループ4は2010年に少数検出された後, その後の検出例も認められなかった.

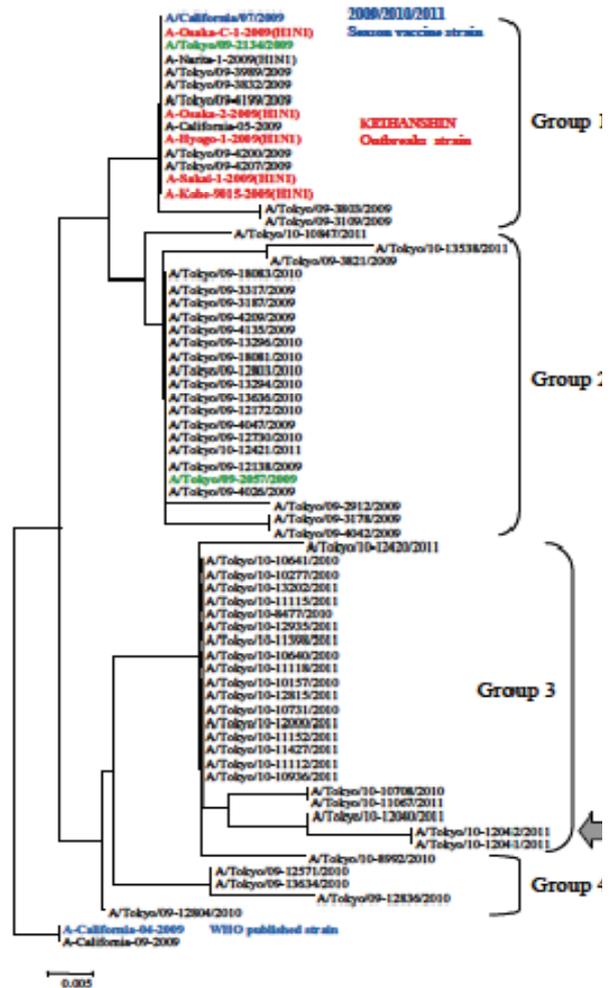


図1-4. 2009年から2011年に検出されたインフルエンザAH1N1pdm09HA領域アミノ酸配列の系統樹解析

2 新型インフルエンザウイルスの早期探知を目的とした呼吸器系疾患患者の病因検索

実験方法

1. 供試材料

本研究では, 2009年度から2011年度に東京都内の26小児科医療定点から搬入された呼吸器疾患患者の咽頭拭い液等2,546件, 無菌性髄膜炎や発疹症など呼吸器疾患以外の患者材料566件について, ウイルス検索を行った.

2. 供試材料からの核酸抽出

供試材料からの核酸抽出は, セパジーンRVR (三光純薬) を用いて, 添付書の手順に従った.

3. real-time PCR法およびnested PCR法

検査対象病原体は, インフルエンザウイルス, パラインフルエンザウイルス, エンテロウイルス, RSウイルス, アデノウイルス, マイコプラズマ, クラミジア, ヒトメタニューモウイルス, コロナウイルスであり, 検査に用いたプライマーおよびプローブを表2-1, 表2-2に示した. 検査の術式は, 既報⁴⁾に準じて行った.

表2-1. Nested-PCR法に用いたプライマー

対象病原体	プライマー名	塩基配列	配列位置	
インフルエンザ A/H1 ウイルス	PA53	5'-TGAGGGAGCAATTGAGCTCA-3'	385-404	
	PB53	5'-TGCCCTCAAATATTGTTGCC-3'	815-796	
	IU-153	5'-TTACAGAAATTTGCTATGGCTG-3'	516-535	
	IU-253	5'-AGACTAGAGAGGATAAGCATT-3'	688-689	
	HN-153	5'-TTAGAGGAGCAGGAAAGCTT-3'	337-356	
	HN-253	5'-CTCCCGGTTTACTATTGTC-3'	792-773	
	IFA-A153	5'-GATTATGCTCCCTTACGTTG-3'	387-406	
	IFA-A453	5'-CCCTTACCCAGGGTCTAG-3'	752-731	
	B	IB-153	5'-GCAAAGCTTCAACTACTCCAC-3'	313-333
		IB-253	5'-TTTGGTGAAGCCCTCCGTC-3'	808-788
IB-353		5'-GGAACCTCAGGATCTTCC-3'	488-508	
IB-453		5'-GGTAGCCCTCCGCTTCTG-3'	802-782	
RSウイルス	RO3	5'-TATAGCTGTATCCAAAGTTT-3'	696-695	
	RO4	5'-ATAGAGGTGATGTGTGTAAT-3'	697-656	
	RO1	5'-CTTGAAGGAGAAAGTGAAC-3'	6091-6108	
	RO2	5'-TGATGTGTGTAATTCCA-3'	6570-6553	
アデノウイルス B群 以外	HexAA1885	5'-GCCGAGGTGCTTACATGCACATC-3'	94-111	
	HexAA1913	5'-CAGCACCGCGGGATGCAAAATG-3'	388-367	
	NeHexAA1893	5'-GCCACCGAGAGCTACTCAGCCTG-3'	203-227	
	NeHexAA1905	5'-TTGTAAGAGTACGGGATCTCCGCGGTC-3'	329-301	
	SAD4037	5'-TTGCGAGTACCTCAGTCCG-3'	128-145	
	MS317	5'-TGTGCTGCGCAATGCAAGC-3'	365-347	
	マイコプラズマ *	MP1-1st	5'-GCAAGTGCATGAAAGTATG-3'	8087-8106
		MP2-1st&2nd	5'-ATTTGCTCACTTTTACATGCTGGCG-3'	9285-9261
		MP3-2nd	5'-GAATGACTTACGAGGTAATGGCTA-3'	8476-8499
	クラミジア ニューモニエ	CIF	5'-ACGGAATAATGACTTCGG-3'	7416-7433
C1R		5'-TACCTGGTACGCTCAATT-3'	7852-7835	
CPF		5'-ATAATGACTCGGTTGTTATT-3'	7421-7441	
CPR		5'-CGTCACTGCGCTTGGTGGCTT-3'	7642-7622	
パラインフルエンザウイルス	1型	PIP1+	5'-COTTAATTCAGATATGAT-3'	748-768
		PIP1-	5'-GATAAATAATTTGATAAG-3'	1225-1206
		PHS1+	5'-CGGTAATTTGCTAATCCTATG-3'	780-801
	2型	PIP2+	5'-AACAACTCTGCTGAGCATT-3'	803-822
		PIP2-	5'-ATGTCAGACAATGGGCAAAT-3'	1310-1291
		PHS2+	5'-CCATTTACTAAGTGTGGAAT-3'	845-866
	3型	PIP3+	5'-GCTGAACTCAGACTGGTA-3'	1048-1027
		PIP3-	5'-TTAAGCCCTGTGCAAGAAC-3'	762-781
		PHS3+	5'-ATGTCAGACAATGGGCAAAT-3'	1239-1220
	ヒトメタニューモウイルス	MPV0.2	5'-ATAGAGAGGTTATAGCAACT-3'	884-905
		MPV0.1.2	5'-AACCGTGTACTAAGTATGCACTC-3'	986-966
		MPV0.3r	5'-CAACAAGCTTCTGCTG-3'	397-415
MPV0.2		5'-CATTGTTGACCCGGCCCCATAA-3'	792-813	
コロナウイルス	ooU2	5'-CAGAAATGGATGCTTGGCTG-3'	601-624	
	ooU1	5'-GTTGTTCTTCCAAATGGCCAT-3'	756-772	
	ooU3	5'-ATAGAGAGGTTATAGCAACT-3'	74-93	
	ooU4	5'-GATGATGATGATTTACTGCG-3'	293-273	
SARSコロナ ウイルス	BN1outS2	5'-ATGAAATACCAAGTCAATGGTTAC-3'	18138-18161	
	BN1outAs	5'-CATAACCCAGTCGGTACAGCTA-3'	18327-18307	
	BN1inS	5'-GAGGTATTCGTCAGGTTCCG-3'	18186-18205	
	BN1inAs	5'-CTGTAGAAAATCCAGTCCGGAG-3'	18294-18273	
	** SAR1s	5'-CCTCTGTTGTTCTGTCGCA-3'	15256-15276	
** SAR1as	5'-TATAGTAGGCCCGCACATG-3'	15376-15356		

*: Semi-nested-PCR法, **: RT-PCR法

表2-2. リアルタイムPCR法に用いたプライマーとプローブの塩基配列

対象ウイルス	プライマー	プローブ名	塩基配列
SARSコロナ ウイルス	BN1MSARS1		5'-TTATCACCCCGGAGAAAGCT-3'
	BN1MSARS2		5'-CTCTAGTTGCATGACAGCCCTC-3'
	BN1MSARP		5'-FAM-TCGTGCGTGGATTGGCTTGGATGT-TAMRA-3'
インフルエンザ A/H1 ウイルス	AH3	HI-VAF	5'-CTCTGTAGTGTCTTCCATATAGCAGAAG-3'
		HI-VAR	5'-TGATCTCTACTTGTGGGCTTTGGT-3'
		HI-MGBVA	5'-VIC-TTGGAGCCATTGGCC-MGB-3'
	AH3	RT-H3-588	5'-TCAAGCATCAGGGAGARTCACA-3'
		RT-H3-653	5'-CCGATATTCGGGATACAGTTTG-3'
		Flu-H3-611	5'-FAM-TCTCTACAAAAGAACCA-MGB-3'
B	RT-B-265F	5'-CCTGTTACATCYGRRGTGTTCC-3'	
	RT-B-334R	5'-GAGAAGATTGGYAGYTGCTTRAT-3'	
	Flu-B-293	5'-VIC-TGCACGACAGAACAA-MGB-3'	
アデノウイルス	ADHXf		5'-CCTBGGMCARAAAMTKCTCTA-3'
	ADHXfRm		5'-CATGGGRTCSACYTCRAAAKTCAT-3'
	ADHX		5'-FAM-AACTCGGCCACGGCTAGA-TAMRA-3'
	ADHX7		5'-FAM-AACTCGGCCATCGCGTGA-TAMRA-3'

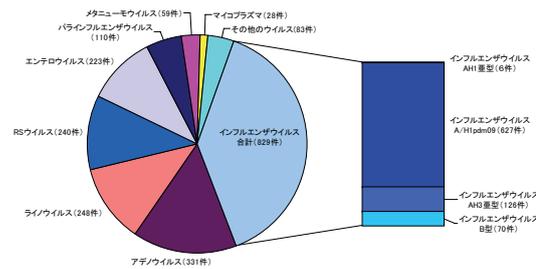


図2-1. 呼吸器系疾患患者の検体から検出されたウイルスの種類

表2-3. 臨床診断名別に見たインフルエンザウイルスの検出状況

検体採取患者の臨床診断名	AH1pdm09	AH3型	B型	陽性数	検査総数
中枢神経系疾患	2			2	182
不明発疹症	1	3	2	6	142
不明熱	1		4	5	101
川崎病				0	24
感染性胃腸炎			2	2	18
心筋炎		1		1	12
敗血症	1			1	7
その他				0	80
合計	0	5	4	8	566

結果および考察

1. 呼吸器疾患患者からのウイルス検索

調査期間中は、都内の呼吸器疾患患者の咽頭拭い液等 2,546件のうち1,802件 (70.1%) から呼吸器疾患起因病原体を検出した (図2-1)。検出された病原体は、インフルエンザウイルス829件、アデノウイルス331件、ライノウイルス248件、RSウイルス240件、エンテロウイルス223件、パラインフルエンザウイルス110件、ヒトメタニューモウイルス59件、マイコプラズマ28件、その他のウイルス83件であった。検出されたインフルエンザウイルスの亜型は、AH1pdm09亜型が最も多く627件、次いでAH3亜型126件、B型70件、AH1亜型6件であった。

2. 呼吸器疾患以外の患者からのインフルエンザウイルス検索

中枢神経系疾患や不明発疹症等の呼吸器疾患以外の患者材料566件については、インフルエンザウイルスの検索を実施した結果、17件 (AH1pdm09亜型5件、AH3亜型4件、B型8件) からウイルスが検出された (表2-3)。

3. 発熱外来への新型インフルエンザ患者の誘導

東京都では、急激な感染の拡大を防ぐために、新型インフルエンザに感染した恐れのある者に対して、一般の医療機関でなく発熱外来設置病院を受診するよう指導した。発熱外来からの検体を検査するアラート検査では、5月20日に都内で最初のインフルエンザAH1pdm09感染者を確認



図2-3. 都内の定点医療機関からのインフルエンザウイルス検出状況

していたのに対して、一般診療機関の検体からは7月に入っても新型インフルエンザウイルスが検出されなかった (図2-3)。

その後の感染の拡大により、発熱外来は7月10日をもって廃止となり、一方、一般医療機関の検体からは同月17日に検出されて以降、新型インフルエンザウイルスが続々と検出されるようになった。一般医療機関からの検体で最初にAH1pdm09が検出された症例では、患者の臨床診断名が不明熱としか記載されておらず、インフルエンザウイルスの検査範囲を呼吸器疾患以外にも拡大したことが有効であった。

医療体制の変更に伴う検査対応の変更後、一週間で一般

医療機関の検体から新型インフルエンザが検出されたことは、本研究による新型インフルエンザのスクリーニング検査が十分に機能していることを示すものと考えられた。

3 薬剤耐性インフルエンザウイルスの解析

実験方法

1. 供試材料

本研究では、2007/08シーズンから2010/11シーズンに都内で分離されたインフルエンザウイルス1,018株（A/H1N1亜型：148株，A/H1N1pdm09亜型：697株，A/H3N2亜型：101株，B型：72株）を対象とした。

2. 供試材料からのRNA抽出

本研究では、インフルエンザウイルスによる細胞変性効果を生じたMDCK細胞培養上清200 μLからQIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて核酸抽出を行い、RNA抽出液70 μLを作製した。

3. Real-time PCR法およびAllelic Assay

A/H1N1pdm09亜型については、既報⁵⁾のプライマーおよびTaqMan MGBプローブを検出に用いた。A/H3N2亜型およびB型については、Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network (NISN) の報告⁶⁾を参考に、A/H3N2亜型でE119Vを、B型でR152Kを、それぞれ調査対象とし、Chutinimitkulら⁷⁾やBolotinら⁸⁾の報告を参考に、NAタンパク質をコードする遺伝子領域の薬剤耐性変異部位を検出するプライマーおよびTaqMan MGBプローブを設定して検出に用いた (Table 3-1.)。プライマーおよびプローブの設定には、Primer Express v2.0およびPrimer Express v3.0 (ライフテクノロジー ジャパン) を用いた。

標的遺伝子の検出には既報⁵⁾に従い、RNA抽出液（または標準DNA液）3 μLを用い、QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN) を使用した（最終反応量25 μL）。A/H1N1pdm09亜型およびA/H3N2亜型の場合には、50°C40分、95°C15分反応させた後、[94°C15秒、60°C1分15秒]のサイクルを45回繰り返した。B型の場合には、50°C40分、95°C15分反応させた後、[94°C15秒、62°C1分15秒]のサイクルを45回繰り返した。なお検出機器としてはABI fast-real time PCR 7900HT (ライフテクノロジー ジャパン) を使用し

た。Real-time PCR反応の前後には、蛍光強度の測定を行い、FAMをX軸に、VICをY軸にそれぞれの蛍光強度差をプロットし、X軸側にプロットされるものを薬剤耐性変異なし、Y軸側にプロットされるものを薬剤耐性変異ありと判定した。

4. RT-nested-PCR法

標的遺伝子の増幅には、A/H3N2亜型のプライマーを一部改変し (表3-1)、それぞれの薬剤耐性変異部位を増幅できるように設計したプライマーを検出に用い、既報⁹⁾に従ってRNA抽出液3 μLを用い、1st PCRプライマー混合液およびOmniscript RT Kit (QIAGEN) を使用して、37°Cで60分間逆転写反応を行い、cDNA 10 μLを作成した。cDNA作成後は、1st PCRプライマー混合液およびTaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を使用して1st PCR反応を行った後、1st PCR産物3.0 μLを用い、2nd PCRプライマー混合液およびTaKaRa Ex Taqを使用して2nd PCR反応を行った。PCR反応の条件は、1st, 2ndとも [94°C1分, 53°C2分, 72°C2分]のサイクルを30回繰り返した。

5. ダイレクトシーケンス法

ダイレクトシーケンス法では、既報⁹⁾に従い、PCR反応産物を2.5%低融点ゲル (Nusieve GTG Agarose : CAMBREX Bio Science) で電気泳動し、特異バンドを切り出した後、QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて遺伝子精製を行い、DNA液30 μLを得た。

シーケンシング反応には、2nd PCR反応に用いたプライマーおよびBig Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing試薬 (ライフテクノロジー ジャパン) を使用し、DNA液5.0 μLを混合し、[94°C15秒, 50°C15秒, 60°C4分]のサイクルを25回繰り返した。

シーケンシング反応産物の精製は、Centri-Sep Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジー ジャパン) を用いて塩基配列を決定した。

6. 系統樹解析および薬剤耐性変異の解析

系統樹解析¹⁰⁾およびアミノ酸配列の比較は、得られた塩基配列を基に遺伝子解析ソフトMEGA4を用いたN-J法によって行った。A/H1N1pdm09亜型のNA領域における薬剤耐性変異の有無については、H275Yに加え、I223R (国立感染症研究所¹¹⁾)、I223V (Deydeら¹²⁾およびCDC¹³⁾)、N295S (Morlighemら¹⁴⁾)を対象に調査を行った。また、Montら¹⁵⁾およびSheuら¹⁶⁾の報告を参考に、A/H3N2亜型では、E119V, D151V, Q226H, G248R, K249E, R292Kを、B型では、R152K, D198E, I222Tのアミノ酸変異を、それぞれ対象に調査を行った。

表 3-1. インフルエンザウイルスA/H3N2型とB型検出用プライマーとプローブの塩基配列

型 / 亜型	プライマー・プローブ名	塩基配列(5'-3')	
A/H3N2	Real-time PCR	N2-E119V-F2a N2-E119V-R2a N2-E119-2P N2-V119-2P	Agg ATT TgC ACC TTT TTC TAA ggA TCC AAg ggC AAA Ttg ATA ACACT FAMACACAT AAg gTT CTC Ttg T-MGB VIC-CAC ATA Agg TAC TCT TgT-MGB
	Conventional PCR	RT/1st 2nd	NA3-1 NA3-6 NA3-3a NA3-8
B	Real-time PCR	B-R152K-F3 B-R152K-R3 B-R152-3P B-K152-3P	CCC ATT ATg CAg CTC AAGCA TTg CCC AAT Ttg ACT gAA ATT AgA FAM-AgCTTg TTT CTg TCT TC-MGB VIC-AgCTTg TTT Ttg ICT TC-MGB

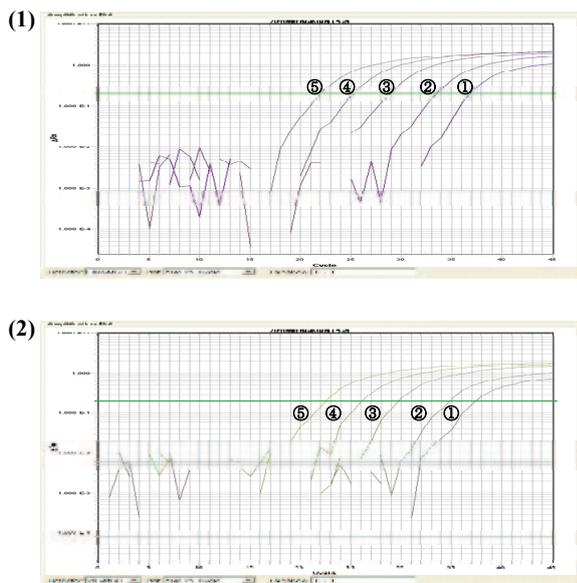


図3-1. リアルタイムPCR法によるインフルエンザウイルスAH3N2亜型のおセルタミフル感受性株(1:E119保有株)と耐性株(2:V119保有株)の増殖曲線.
ゲノム量(コピー/チューブ):①:9.0×10², ②:9.0×10³, ③:9.0×10⁴, ④:9.0×10⁵, ⑤:9.0×10⁶.

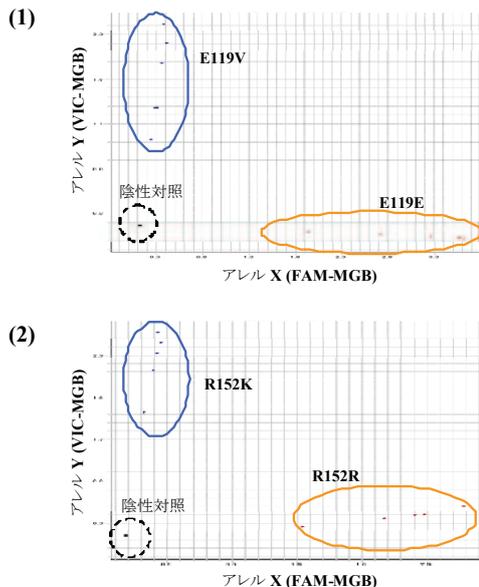


図3-3. リアルタイムPCR法による薬剤耐性型別
(1)インフルエンザAH3N2亜型ウイルス:FAM-MGBプローブはE119アレル(アレルX)を検出;VIC-MGBプローブはV119アレル(アレルY)を検出
(2)インフルエンザB型ウイルス:FAM-MGBプローブはR152アレルを検出(アレルX);VIC-MGBプローブはK152アレルを検出(アレルY)

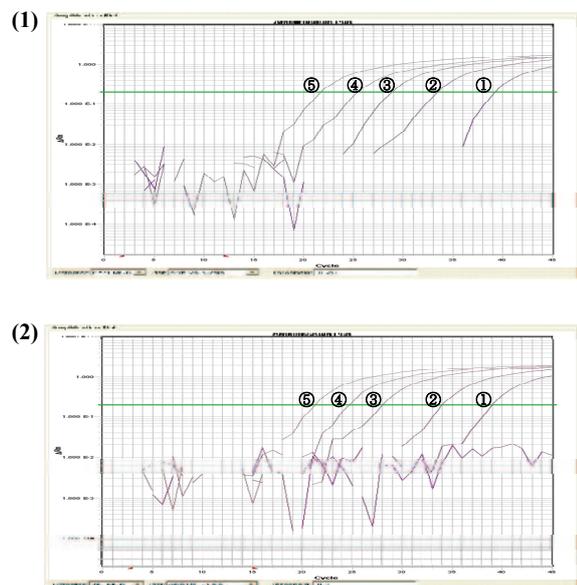


Fig. 図3-2.リアルタイムPCR法によるインフルエンザウイルスB型のおセルタミフル感受性株(1:R152保有株)と耐性株(2:K152保有株)の増殖曲線.
ゲノム量(コピー/チューブ):①:9.0×10², ②:9.0×10³, ③:9.0×10⁴, ④:9.0×10⁵, ⑤:9.0×10⁶.

結果および考察

1. Real-time PCR法を用いた薬剤耐性変異の検出系の検討 (A/H3N2亜型ウイルスおよびB型ウイルス)

Real-time PCR法の検出感度について、10倍段階希釈した標準DNAを用いて検討した結果、A/H3N2亜型検出系 (E119E検出用, E119V検出用) およびB型検出系 (R152R検出用, R152K検出用) は、いずれも9.0×10² copies/tube から9.0×10⁶ copies/tubeの範囲内において、サイクル数に比例しDNA量の増幅曲線が得られ、検出感度はいずれも9.0×10² copies/tubeと推定された (図3-1,3-2.)

反応前後に蛍光強度の測定を行い、X軸にFAM色素の蛍光増加量を、Y軸にVIC色素の蛍光増加量をプロットすると、感受性アミノ酸の標準DNA (E119EおよびR152R) はX軸に沿うよう位置し、耐性変異アミノ酸の標準DNA (E119VおよびR152K) はY軸に沿うように位置し、蛍光強度の差をプロットすることにより薬剤耐性変異の有無を判定することができた (図3-3.)

2. 薬剤耐性変異の検出およびNA遺伝子系統樹解析

1) A/H1N1pdm09亜型ウイルス

2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09亜型151株についてReal-time PCR法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した。その結果、H275H:149株(98.7%), H275Y:2株(1.3%)であった。また、2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H1N1pdm09亜型151株のうち58株について、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調

表3-2. 東京都内で検出されたオセルタミビル耐性に関連したアミノ酸変異と変異株数

NA 変異	A/H1N1pdm09	NA 変異	A/H3N2	NA 変異	B
H275Y	2/58*	E119V	0/46*	R152K	0/23*
I223R/V	0/58	D151V	0/46	D198E	0/23
N295S	0/58	(D151A)	(1/46)	I222T	0/23
		(D151E)	(1/46)		
		(D151G)	(2/46)		
		(D151N)	(2/46)		
		Q226H	0/46		
		G248R	0/46		
		K249E	0/46		
		R292K	0/46		

* : 変異株数 / 検査株数

査したところ、解析した58株のうちReal-time PCR法でH275Yと判定された2株にH275Yの変異が確認されたが(表3-2.)、I223R/V、N295Sの変異は認められなかった。さらに、NA遺伝子の系統樹解析を行ったところ、分離株58株は2009-2010および2010-2011シーズンのワクチン株(A/California/07/2009)を含む大きなクラスターを構成し、図3-4.に示したように、さらに4つのグループに分かれた。Real-time PCR法でH275Yと判定された2株は、独立したグループ(group4)を形成し、2009-2010シーズンに大阪をはじめ海外で報告されているオセルタミビル耐性変異株および都内で分離されたH275Yオセルタミビル耐性マーカー有する株(A/Tokyo/S09-1256/2009pdm)と別のグループに分類された。

国立感染症研究所が行った国内調査¹⁷⁾によると、2010-2011シーズンにH275Yアミノ酸変異が認められた分離株の検出頻度は1.9%であった。国内調査に比べ、都内分離株での検出頻度は1.3%とやや低かった。国内調査は、薬剤投与後に検体採取された症例や薬剤を投与したものの症状が改善しないなど、臨床的に薬剤耐性が疑われたケースも含んでいるため、実際の検出頻度よりも高い数値となった可能性がある。2011年7月現在、オーストラリアやニュージーランド等の南半球諸国では依然としてA/H1N1pdm09亜型が流行しており、今後耐性変異をもつA/H1N1pdm09亜型が流行することも懸念されるため、継続的な調査の必要性が示唆された。

2) A/H3N2亜型ウイルス

2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H3N2型75株については、Real-time PCR法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した結果、75株すべてがE119Eであった。

また、2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H3N2型75株のうち46株については、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、46株すべてでE119V、D151V、Q226H、G248R、K249E、R292Kのアミノ酸変異を認めなかったが、151位のアミノ酸がアスパラギン酸(D)からアラニン(A)に変異している株(D151A)が1株、グルタミン酸(E)に変異している株(D151E)が1株、グリシン(G)に変異している株(D151G)が2株、アスパラギン(N)に変異している株(D151N)が2株あった(表3-2.)。D151G/Dま

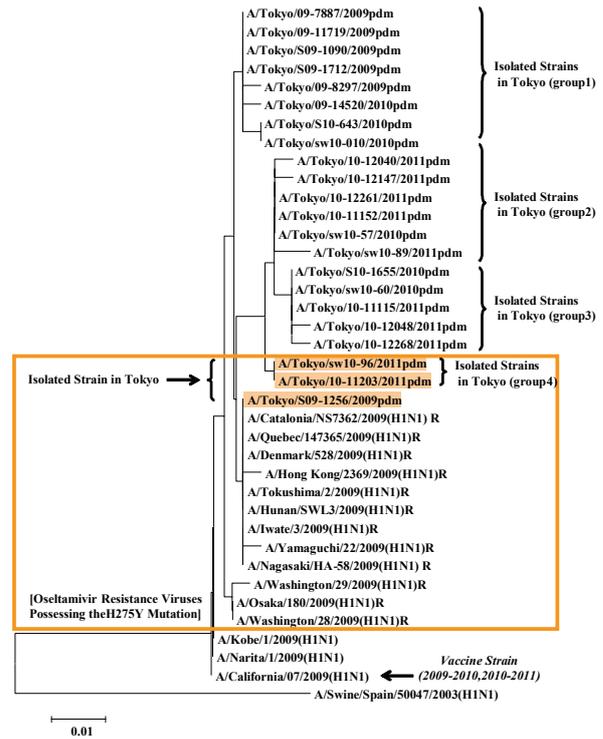


図3-4. インフルエンザウイルスAH1N1pdm09 NA遺伝子の系統樹解析

たはD151Nの変異を持つ株は、ザナミビルに対する薬剤感受性能の低下が知られており¹⁸⁾、この4株においてザナミビルに対する薬剤感受性が低下している可能性が示唆された。

また、2010-2011シーズンに都内で分離されたA/H3N2型75株のうち46株についてNA遺伝子の系統樹解析を行ったところ、2010-2011シーズンのワクチン株(A/Victoria/210/009)を含む大きなクラスターに含まれたが、分離株46株はさらに大きく4つのサブグループに分類された(図3-5.)。

3) B型ウイルス

2010-2011シーズンに都内で分離されたB型55株についてReal-time PCR法を用いて薬剤耐性変異の検出を行い、薬剤耐性変異の有無を判定した結果、55株すべてがR152Rであった。

B型インフルエンザウイルスは、B/Yamagata/16/88に代表される山形系統とB/Vicoria/2/87に代表されるVictoria系統に分類される。2010-2011シーズンに都内で分離されたB型55株のうち23株については、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析により薬剤耐性変異の有無について調査したところ、23株のすべてにR152K、D198E、I222Tのアミノ酸変異が認められなかった(表3-3.)。

さらに、2010-2011シーズンに都内で分離されたB型55株のうち23株について、NA遺伝子の系統樹解析を行ったところ、すべてVictoria系統に分類されたが、2007-2008シーズンのワクチン株(B/Malaysia/2506/2004)と同じクラスターを構成するグループと、2009-2010および2010-2011シーズンのワクチン株(B/Brisbane/60/2008)と同じクラス

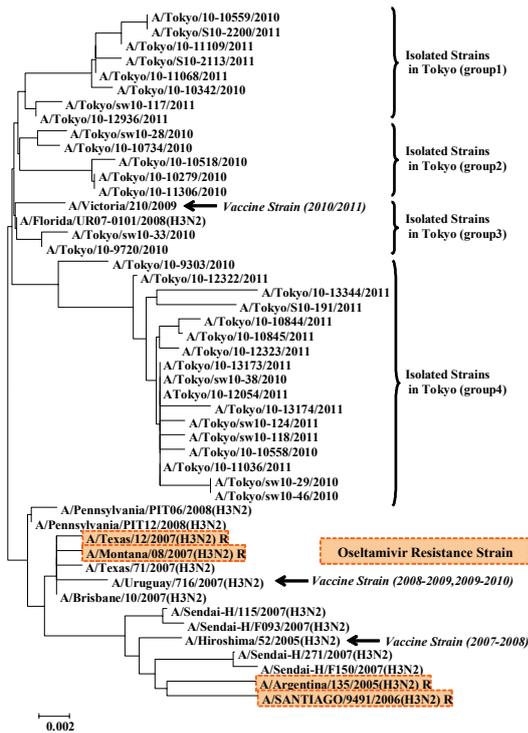


図 3-5. インフルエンザウイルスAH3N2亜型NA遺伝子の系統樹解析

ターを構成するグループに分かれた (図3-6.)

国立感染症研究所が行った国内調査^{23,24)}によれば、B型インフルエンザウイルスで薬剤耐性変異を認める株は検出されておらず、我々の調査結果においても、都内分離株では同様の結果が得られた。しかし、都内で分離されたB型ウイルスのほとんどがVictoria系統であったことと、報告されている薬剤耐性ウイルスはVictoria系統であること¹⁹⁾から、今後は、耐性変異が検出される可能性があり、継続的な調査の必要性が示唆された。

3. H275Y薬剤耐性変異株

都内で分離されたH275Yオセルタミビル耐性マーカーを有するA/H1N1pdm09亜型分離株 (A/Tokyo/sw1096/2011 pdmおよびA/Tokyo/10-11203/2011pdm) については、薬剤感受性試験を国立感染症研究所に依頼したところ、オセルタミビルに対するIC50値が感受性参照株より240倍および272倍上昇し、オセルタミビルに対する感受性が著しく低下していることが確認された。また、両株はともにザナミビルには感受性であることが確認されている。ただ、どちらの症例も検体採取はザナミビル投与前に行われており、オセルタミビル耐性能の獲得と薬剤投与との関係は不明である。

感染症サーベイランスシステム (NESID) に公開されている2011年4月から6月に行われた「2010/2011シーズン抗インフルエンザ薬剤感受性試験 (A/H1N1pdm09亜型)」の結果によると、薬剤投与前に採取された検体から分離されたH275Yマーカーを有する分離株のオセルタミビルに対するIC50値は、感受性参照株より平均で約335倍上昇しており、全国的に同様の傾向がみられている。また、2009-2010シーズンに全国で分離されたIC50値も感受性株に比べ平均で約350倍高い値であったと報告¹¹⁾されており、A/H1N1pdm09亜型の薬剤感受性については、今後も引き続き調査していく必要がある。

Real-time PCR法を用いた薬剤耐性変異の検出は、一度に多数検体の検出が可能であり、RT-nested-PCR法およびアミノ酸配列の解析による薬剤耐性変異の検出よりも短時間で解析することができる。一方で、対象となる耐性変異の有無の判定しかできないため、新たな薬剤耐性変異部位が出現した場合には、改めて検出系の開発が必要となる。

東京都は、新型インフルエンザ対策として、400万人分のオセルタミビルおよびザナミビルの備蓄を行っている。これらの薬剤の有効性など今後の動向を探る上でも、都内で分離されたインフルエンザウイルスに対する薬剤耐性変異の調査は必要不可欠であり、今後も継続して行っていく必要があると考える。

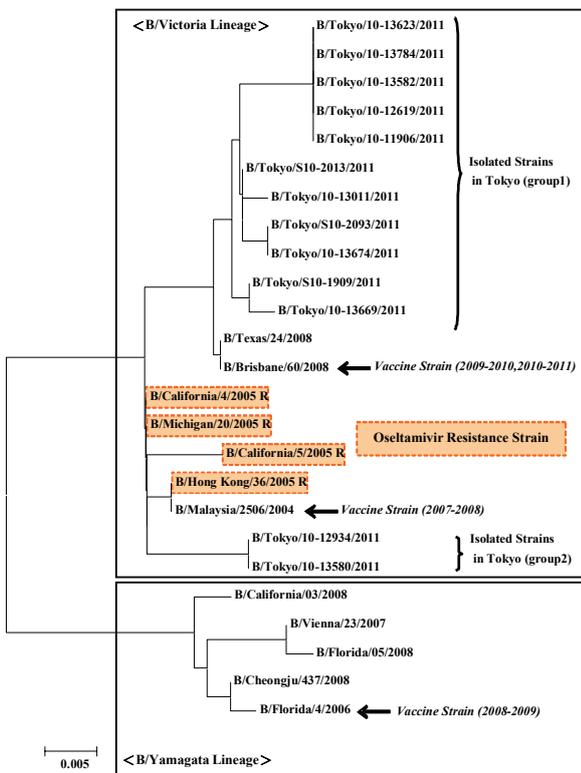


図 3-6. インフルエンザウイルスB型NA遺伝子の系統樹解析

4 新型インフルエンザ出現を迅速に探知するためのサーベイランスシステムの評価と改良

1. サーベイランスの方法

新型インフルエンザの国内での流行状況を迅速に把握するため、厚生労働省は、状況に応じて様々なサーベイランスを実施した。東京都においても、2009年4月に新型インフルエンザを「東京都感染症アラート」の対象とするとともに、流行の早期探知、患者発生や集団発生の状況、入院患者や重症患者、ウイルス検査結果等の把握のため、種々変更しながら実施した(図4-1)。

1) 検査実施に関わる情報システムの利用

(1) 東京都感染症アラート

東京都感染症アラートは、感染症の疑い例の段階で医療機関から保健所に報告をもらい、早期に病原体検査を実施することにより、都内の新興・再興感染症の発生を早期に探知するための東京都独自の仕組みである。このシステムは、24時間365日対応可能で、新たな感染症が発生した場合でも、症例定義を追加することにより、アラートが発動可能となっている。2009年までは、鳥インフルエンザやSARSが対象とされていたが、新型インフルエンザ(A/H1N1)の発生後は、それが急遽追加された。

(2) アラート以外の検査

2009年5月19日以降は、学校からの集団発生の報告や、入院医療機関からの院内感染の報告による検査を開始した。

2009年7月11日：集団クラスターがアラート扱いではなくなった。

2009年8月28日：検査対象は、重症化の可能性がある施設での集団のみに限定された。

2009年12月21日：アラート以外の検査は原則終了した。アラートおよびアラート以外の各種クラスターの症例定義を満たさない場合には、保健所の積極的疫学調査としてPCR検査を実施した。

このほかには、感染症法に基づく病原体定点医療機関からの検体についても、サーベイランスを続けた。

(3) 情報システムによる管理

新型インフルエンザ発生初期においては、「疑い例」はすべて国立感染症研究所で確認検査を実施することとなっていたため、検体搬入の際にはNESID疑い症例支援システムへの入力、検体情報に関する指定書式の作成、メール送信などの作業が必要であり、非常に煩雑であった。

アラート検査、アラート以外のクラスターの検査および保健所の積極的疫学調査のPCR検査情報の管理や結果通知には、K-netの「診療情報迅速把握システム」を利用し、患者情報、検体情報をK-netに入力するためのマニュアルを作成して保健所へ配布し、入力時の電話サポートや、入力ミスなどの修正依頼等の保健所支援を行った。

結果通知は、当初電話とFAXであったが、途中から電話(休日はメール)とK-netのみとしたところ、K-net IDを患者識別子として利用できたため、保健所、感染症対策課、ウイルス研究科、疫学情報室で、患者情報の一元管理が可能となり、迅速かつ正確な情報共有に非常に有効であった。

2) 新型インフルエンザ等感染症発生届

2009年4月28日～7月23日：新型インフルエンザが疑われるすべての事例についてPCR検査を実施し、陽性者は、すべて「患者確定例」として発生届が医師より保健所へ提出された。

2009年7月24日～8月24日：集団発生のみを対象とし、その患者についてPCR検査を実施し、陽性の場合には、当該患者の発生届(患者確定例)および残りの有症状者の発生届(疑似症患者)の提出が求められた。国への報告は、他の全数把握疾患と同様に、感染症発生動向調査システム

(NESID)へ登録することで行われることになった。しかし、疑似症患者の登録には、患者確定例の入力時に自動発番されるNESID-IDの入力が求められたため、登録保健所以外の保健所で把握できないNESID-ID情報を保健所間で共有することが必要になった。そこで、対応策としては、K-netの「診療情報迅速把握システム対策情報サブシステム」を活用して、集団発生があった施設を管轄する保健所が作成した確定患者NESID-IDリストを掲載し、全保健所間で情報の共有化を図った。

2009年8月25日以降：発生届の提出は不要となった。

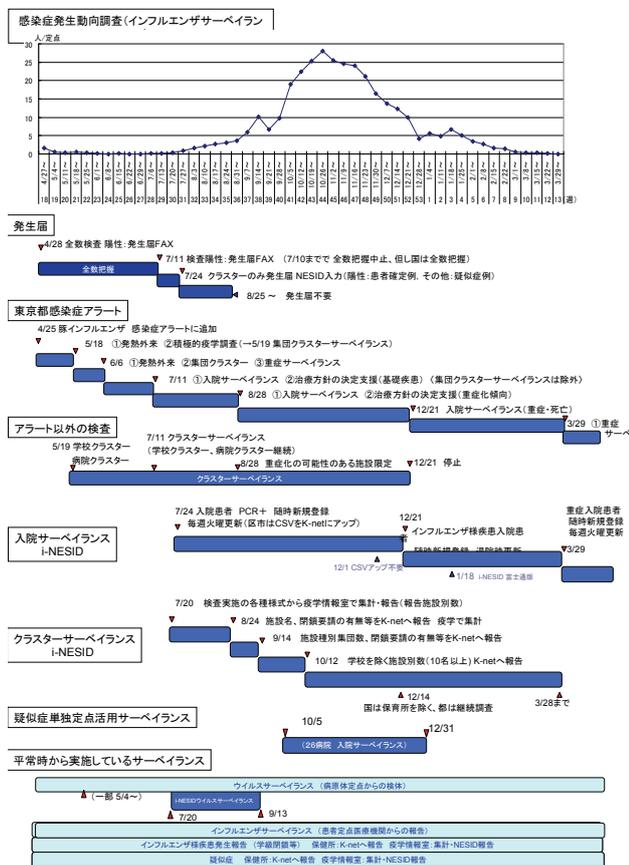


図4-1. 各種サーベイランスの推移

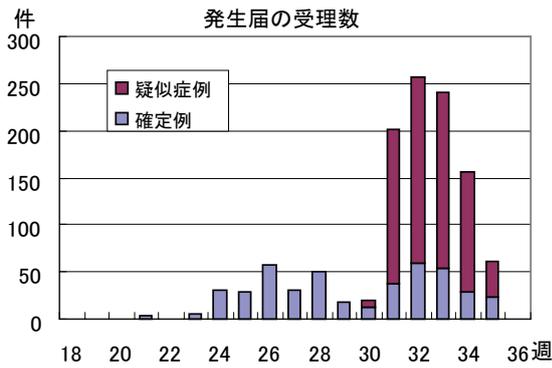


図4-2. 国へ報告した発生届数

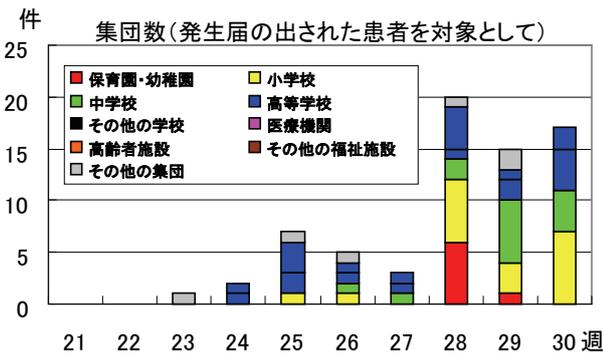


図4-3. 全数把握期間の集団発生事例数

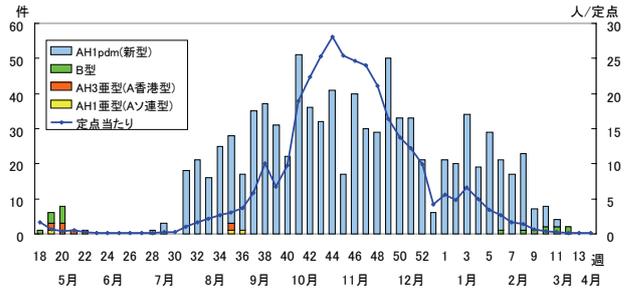


図4-4. 病原体定点医療機関からの検査材料の検査結果

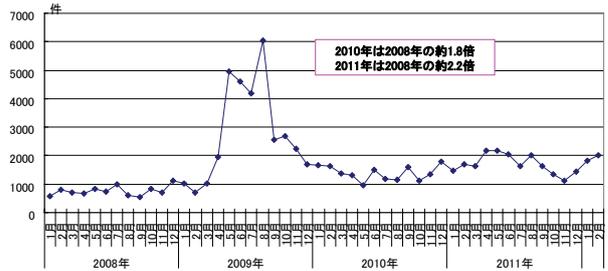


図4-5. K-netへのアクセス数の年次推移

2. サーベイランスの結果

図4-2は、国へ報告した発生届数の推移を示した。2009年27週（6月30日）から同年30週（7月26日）までの発生届数は減少傾向を示し、届け出対象が集団のみに変更になった後、同年31週（7月27日）に急増した。この現象からは、インフルエンザと診断されたものの、検査を実施しない症例が多くあったことが推測された。集団発生のみを報告する期間においても、届出数と集団数が漸減しているが、この時期も検査未実施の集団事例が多数あったことが、K-netにおける保健所間の情報交換から伺えた。

図4-3は、全数把握期間における新型インフルエンザの集団発生事例数を示した。2009年28週（7月6日）においては、保育園・小学校での集団発生が増加しており、この時点で地域内流行が始まっていたと推察される。また、病原体定点医療機関からの検体の検査結果（図4-4）においても、28週に初めて新型インフルエンザが検出されており、この時期に市中に新型インフルエンザウイルスが拡大していったことが推察される。

3. 情報収集と情報発信

本研究では、K-netシステムを利用して、患者情報の登録や検査依頼並びに結果入力を行い、東京都庁、保健所、東京都健康安全研究センターの迅速な情報共有及び疫学解析を行い、情報発信をした。

アラート検査の結果や国内外の新型インフルエンザ発生状況等をA4の用紙一枚に見やすくまとめた「感染症速報」は2010年3月末までに59号発行し、K-net「意見交換フォー

ラム」に掲載した。また、厚生労働省や東京都福祉保健局感染症対策課等から発出される大量の事務文書、アラートの症例定義や報告様式等は速やかに「意見交換フォーラム」に掲載し、情報の整理・共有に役立てた。

K-netへのアクセス数は2010年に2008年比1.8倍、2011年に同比約2.2倍と大きく伸び、特に集団発生確定患者のIDを対策情報で共有した2009年8月のアクセス数は6,000回を超えた（図4-5）。

ま と め

本研究では、2009年から流行したインフルエンザ（A/H1N1pdm）の遺伝子情報を解析し、検出試薬の開発および改良を行った。

都内のインフルエンザ（A/H1N1pdm）は4グループに分類され、遺伝子変異は1グループに収束する傾向を示した。遺伝子変異株に対しては、検出用の試薬の改良を急遽行い、検出率の低下を防ぎ検査精度を保つことに成功した。

インフルエンザ（A/H1N1pdm）流行時の感染症サーベイランス定点における検査成績からは、発熱外来への患者誘導が確実に行われたことが明確になった。

本研究では、2007/08シーズンから2010/11シーズンに都内で分離されたインフルエンザウイルス1,018株（A/H1N1亜型：148株、A/H1N1pdm09亜型：697株、A/H3N2亜型：101株、B型：72株）を対象とした。

A/H1N1pdm09亜型のH275Y変異検出法等により、2009年から2011年に都内で分離されたインフルエンザウイルス281株についてオセルタミビル耐性変異の有無を調べたと

ころ, A/H1N1pdm09亜型151株のうち2株にはH275Yのアミノ酸変異が検出された。AH3, Bについてもオセルタミビル耐性変異検出法を開発し, A/H3N2亜型75株およびB型55株について調査した結果, オセルタミビル耐性変異は認められなかった。

インフルエンザ入院(重症)サーベイランスやクラスターサーベイランスに, K-netのサブシステムを利用することで, 感染症対策課や保健所の担当部署との情報共有に役立った。

以上の成果は, 新型インフルエンザ出現の迅速探知に対応したものであり, 実際2009年から突如として始まったインフルエンザ(A/H1N1pdm)の検査に導入され, 検出ウイルスの性状についても, 薬剤耐性等の遺伝子解析を進め, 情報発信することができた。

文 献

- 1) Alexandra P.N., Eric R., Jeanne B., Timothy M. U., et al, *Emerg. Infect. Dis.*, **14**(9), 1470-1472, 2008
- 2) Influenza-like illness in the United States and Mexico, Global Alert and Response (GAR), 24 April 2009, WHO http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html (2012年8月28日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 3) 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, 11月 ver. 2)
- 4) 新開敬行, 貞升健志, 長谷川道弥, 他: 東京健安研七 年報, **55**, 25-29, 2004.
- 5) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七 年報, **61**, 121-126, 2010.
- 6) Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network : NAI resistance mutations, http://www.nisn.org/c_ni_resistance.html (2012年8月28日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 7) Chutinimitkul, S., Suwannakarn, K., Chieochansin, T., et al.: *J Virol. Methods*, **139**, 44-49. 2007.
- 8) Bolotin, S., Robertson, A.V., Eshaghi, A., et al.: *J Virol. Methods*, **158**, 190-194. 2009.
- 9) 長島真美, 新開敬行, 原田幸子, 他: 東京健安研七 年報, **60**, 61-66, 2009.
- 10) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., et al.: *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 596-1599. 2007.
- 11) 国立感染症研究所: 病原微生物検出情報, **31**, 173-178, 2010.
- 12) Deyde, V.M., Sheu, T.G., Trujillo, A.A., et al.: *Antimicro. Agents Chemother*, **54**, 1102-11110. 2010.
- 13) CDC: Oseltamivir-Resistant 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Virus Infection in Two Summer Campers Receiving Prophylaxis – North Carolina, 2009, *MMWR*, **58**, 969-972. 2009.
- 14) Morlighen, J.E., Aoki, S., Kishima, M., et al.: *PLoS ONE*, **6**, e18956. 2011.
- 15) Monto, A.S., McKimm-Berschkin, J.L., Macken, C., et al.: *Antimicrob. Agents Chemother*, **50**, 2395-2402, 2006.
- 16) Sheu, T.G., Deyde, V.M., Okomo-Adhiambo, M., et al.: *Antimicrob. Agents Chemother*, **52**, 3284-3292, 2008.
- 17) 国立感染症研究所: 2009年5月～2011年における抗インフルエンザ薬剤耐性株(A/H1N1pdm)検出情報, <http://idsc.nih.gov/iasr/influ.html> (2012年8月28日現在, なお本URLは変更または抹消の可能性ある)
- 18) Morlighen, J.E., Aoki, S., Kishima, M., et al.: *PLoS ONE*, **6**, e18956. 2011.

Study on Rapid Detection and Analysis of Novel Influenza

Yukinao HAYASHI^a, Takayuki SHINKAI^a, Mami NAGASHIMA^a, Isao YOSHIDA^a, Sachiko HARADA^a, Michiya HASEGAWA^a,
Terue OKAZAKI^a, Hiroko HOSOYA^a, Yoko NADAOKA^a, Kazuo IKEDA^a, Noriko HAYATA^a, Yoshiyuki SUGISHITA^a,
Nobuyuki KAMIYA^a, and Akemi KAI^a

From 2009 to 2011, we managed a research project titled “Study on Rapid Detection and Analysis of Novel Influenza” to prepare for novel influenza epidemic.

We developed a real-time PCR method to detect the influenza A/H1N1pdm09 hemagglutinin (HA) and influenza A nucleoprotein (NP) genes. We modified primers according to the genetic mutation of the NP gene to maintain accuracy of inspection. In addition, we analyzed the HA gene sequence of the detected influenza/AH1N1pdm09 virus. The influenza/AH1N1pdm09 virus clusters in Tokyo were divided into 4 groups.

Using our newly developed real-time PCR, we tested specimens virologically obtained from pediatric outpatients. During the research period, we detected 17 strains of influenza viruses (AH1N1pdm09: 5 strains, AH3: 4 strains, type B: 8 strains) from patients with diseases other than respiratory diseases, such as central nervous system diseases.

We developed a real-time PCR to detect and analyze oseltamivir resistance gene mutations, including a histidine to tyrosine amino acid change at position 275 (H275Y) in influenza A/H1N1pdm09 viruses, and to investigate influenza A/H3N2 viruses possessing E119V and influenza B viruses possessing R152K. Two of 151 A/H1N1pdm09 viruses possessed the H275Y mutation related to oseltamivir resistance. However, 75 A/H3N2 viruses and 55 B viruses did not possess any mutations related to oseltamivir resistance.

The Infectious Disease Surveillance Centre worked to share information regarding the pandemic AH1N1 influenza, particularly with the use of The Tokyo Metropolitan Health Crisis-Management Information Network System for Infectious Disease (K-net), among those working for public health institutions in Tokyo, and provided the information to citizens.

Keywords: novel influenza, real-time PCR method, hemagglutinin gene, neuraminidase gene, nucleoprotein gene, phylogenetic analysis

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan