

資料

## 広島県において実施した新型インフルエンザウイルス検査と、患者から検出されたウイルス株の性状 (2009年4月～2010年3月)

高尾 信一, 島津 幸枝, 重本 直樹, 福田 伸治, 谷澤 由枝, 竹田 義弘,  
桑山 勝, 大原 祥子\*, 妹尾 正登, 松尾 健

### A Laboratory Examination for Influenza A(H1N1)pdm and the Characteristic of Viruses Isolated from Patients in Hiroshima Prefecture (April 2009—March 2010)

SHINICHI TAKAO, YUKIE SHIMAZU, NAOKI SHIGEMOTO, SHINJI FUKUDA,  
YUKIE TANIZAWA, YOSHIHIRO TAKEDA, MASARU KUWAYAMA, SACHIKO  
OOHARA, MASATO SENO and TAKESHI MATSUI

(Received September 30, 2010)

2009年4月中旬に、これまでのAソ連型ウイルス株とは抗原性の異なるブタ由来のA(H1N1)新型インフルエンザウイルス(AH1pdm)がメキシコ・北米を中心に発生し、日本を含む世界各国に広がった。それを受けて、広島県立総合技術研究所保健環境センターではAH1pdmに対する検査体制を整備し、6月9日に県内初のAH1pdm陽性患者を確認した。その後、県内の患者数が増加するに伴って検査対象数も増加し、2010年3月末までに、AH1pdm遺伝子検査法により合計400名のAH1pdm陽性患者を確認した。

AH1pdm陽性検体のうち、348検体からMDCK細胞を用いてAH1pdmが分離された。これらのAH1pdm株については、抗原性に違いのないウイルスが流行期間中を通じて、県内で流行していたと考えられた。分離されたAH1pdm株について、インフルエンザ治療薬に対する耐性獲得の有無を確かめた結果、157株中1株(0.64%)にオセルタミビル耐性マーカーH275Yの遺伝子変異が確認され、この株は薬剤感受性試験でもオセルタミビル耐性であることが明らかとなった。

キーワード：新型インフルエンザ, AH1pdm, real-time RT-PCR, RT-LAMP, H275Y

#### はじめに

2009年4月中旬に、これまでのAソ連型ウイルス株とは抗原性の異なるブタ由来のA(H1N1)新型インフルエンザウイルス(AH1pdm)がメキシコ・北米を中心に発生し[1]、その後、日本を含む世界各国に広がった[2]。広島県立総合技術研究所保健環境センター(当センター)では、政令市である広島市を除いた広島県内全域で発生した患者の検査を担当し、6月9日に県内初の患者を確認した。それ以降、新型インフルエンザ国内流行初期における患者確定のための検査、その後の入院・重症患者を対象とした検査、集団発生の早期探知を目的としたクラスターサーベイランス、それに加えて通年で実施している定点医療機関を通じてのウイル

スサーベイランス検査によって、2010年3月末までに、合計400名のAH1pdm陽性患者を確認した。今回の報告では、広島県におけるAH1pdm検査体制の推移、新型インフルエンザ患者の発生状況と患者からのAH1pdm検出状況、検出されたAH1pdmの性状について説明する。

#### 材料および方法

##### 1 広島県内におけるインフルエンザ患者の発生状況

広島県感染症発生動向調査事業によって、広島県内の115カ所のインフルエンザ定点医療機関から報告されたインフルエンザ患者数について、2009年4月第1週(第15週)から2010年3月第5週(第13週)までの、定点医療機関当りの週別報告患者数をまとめた。

\*現広島県食肉衛生検査所：Present Address, Hiroshima Prefectural Meat Sanitation Inspection Station

## 2 AH1pdm 検査

### (1) 検査の対象

2009年4月28日から2010年3月31日までの間に、新型インフルエンザが疑われた患者から採取された鼻咽腔拭い液498件を今回の集計対象とした。

### (2) 遺伝子学的検査

#### (a) real-time RT-PCR 法と conventional RT-PCR 法による遺伝子検査

検体からのウイルス RNA 抽出は QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 社) を用い、最終的に70 $\mu$ l の Elution Buffer 中に抽出した。real-time RT-PCR 法と conventional RT-PCR 法は、国立感染症研究所(感染研)から示された「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) に従って実施した。なお、2009年11月からは、同マニュアルが一部改定されたマニュアル (2009年11月 ver.2) に従って実施した。

AH1pdm 陽性の判定は、real-time RT-PCR 法によって得られた検査結果が、A 型インフルエンザウイルスの各亜型間の相同性が高い領域である M 遺伝子が陽性、かつ AH1pdm の HA 遺伝子も陽性を示した検体を AH1pdm 陽性と判定した。判定に際しては、併せて実施した conventional RT-PCR 法の検査結果も参考にした。なお、real-time RT-PCR には LightCycler 480 (ロッシュ社) を使用した。

#### (b) Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) 法による遺伝子検査

2009年の新型インフルエンザの流行期間中に、我々が新たに開発した AH1pdm 遺伝子を特異的に検出可能な RT-LAMP 法 [3] を一部の検体について併用し、AH1pdm 判定の参考にした。

### (3) 培養細胞を用いたウイルス分離検査と分離ウイルスの(亜)型の同定

#### (a) ウイルス分離

インフルエンザウイルスの分離には MDCK 細胞を用いた。組織培養用 6 穴プレートに培養した MDCK 細胞 1 穴 (直径35mm) 当りに、患者の検体を0.2ml 接種し、37 $^{\circ}$ C で1時間の吸着操作を加えた後に、トリプシンを添加したダルベッコ変法イーグル MEM 培地を 2 ml 加えて、37 $^{\circ}$ C の炭酸ガスふ卵器内で静置培養した。細胞変性効果 (CPE) を指標として7日間ウイルス分離の有無を観察し、CPE が出現しなかった場合は、培養細胞上清の一部を新たな MDCK 細胞に継代接種した。3代継代後も CPE が認められなかったものをウイルス分離陰性と判定した。

#### (b) 分離ウイルスの同定

CPE が認められた MDCK 細胞上清については、0.5% 七面鳥赤血球 PBS(-) 浮遊液を用いて赤血球凝集 (HA) 性を確認し、HA 性が確認された場合は、ウイルス(亜)型特異的な抗血清を用いた赤血球凝集抑制 (HI) 試験で同定した。抗血清は、感染研から分与された2008/09年シーズン用および2009/10年シーズン用 HI 抗血清と、AH1pdm 用血清を用いた。なお、AH1pdm 用抗血清は A/California/07/2009pdm 株を抗原として作成されたものである。

### (4) 分離ウイルス株の生物学的性状解析

#### (a) AH1pdm 株の血球種別による HA 性の比較試験

AH1pdm 株の一部については、0.5%七面鳥赤血球、0.5%ニワトリ赤血球、および0.75%モルモット赤血球の PBS(-) 浮遊液を用いて HA 価を測定し、血球の種類による HA 価の違いの有無を検討した。

#### (b) 培養温度の違いによるウイルス増殖試験

AH1pdm 株として A/Hiroshima/201/2009pdm 株と A/Hiroshima/385/2009pdm 株を、季節性ウイルス株として A/Hiroshima/05/2009 (H1N1) 株と A/Hiroshima/52/2008 (H3N2) 株の4種類のインフルエンザウイルスを用いた。それらのウイルス株を、6穴プレートに培養した MDCK 細胞に1穴当たり5 PFU/0.2ml の多段増殖となるように感染させ、1時間の吸着操作後に PBS(-) で5回洗浄し、トリプシンを添加したダルベッコ変法イーグル MEM 培地を 2 ml 加えて34 $^{\circ}$ C と37 $^{\circ}$ C の2通りの温度で培養した。培養開始後24時間ごとに4日間、培養上清の一部 (140 $\mu$ l) を採取し、その中のウイルス量 (AH1pdm の M 遺伝子コピー数) を、先に述べた real-time RT-PCR 法で測定した。なお、ウイルス遺伝子の定量に際しては、M 遺伝子の一部をプラスミドに組み込んで作成したプラスミド DNA を用いて定量用の検量線を作成し、それを基準として検体中のウイルスコピー数を算出した。

### (5) オセルタミビル耐性株の検出

#### (a) 耐性遺伝子マーカー H275Y の検出

感染研から示された AH1pdm のノイラミニダーゼ (NA) 遺伝子の一部を増幅するように設計されたプライマーセット (swN1-676-694F, swN1-1130-1111R) を用いた RT-PCR 法により、AH1pdm 分離株から抽出したウイルス RNA を鋳型として455bp の塩基を増幅した。増幅産物はダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定、得られた塩基配列からアミノ酸配列を推定し、オセルタミビル耐性マーカーである NA 遺伝子の275番目の H275Y [ヒスチジン (H) からチロシン (Y) への変異]

の有無 [4] を確認した。

(b) 薬剤感受性試験

H275Y 変異の認められた AH1pdm 分離株については、化学発光法である NA-Star ノイラミニダーゼ阻害剤耐性インフルエンザ検出キット (アプライドバイオシステムズ社) を用いて、オセルタミビルとザナミビルに対する薬剤感受性を調べた。なお、この試験は感染研において実施された。

結 果

1 新型インフルエンザ対策における検査対象と検査体制

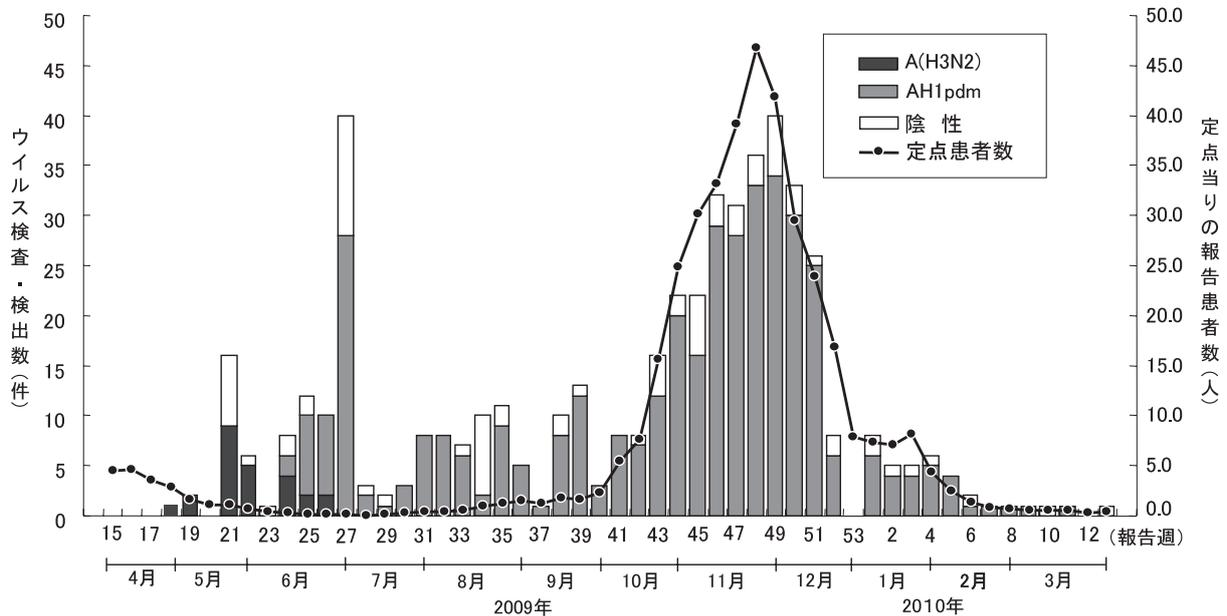
(1) 検査体制の構築

当センターでは、2009年4月12日にメキシコからWHOに報告された、肺炎による死亡者とインフルエンザ患者の増加に関する情報をインターネットのWEBサ

イト [1] から探知したのを機に、それらに関連する情報の収集を開始した。その後、4月25日の「広島県新型インフルエンザ警戒本部」の設置と相談窓口の開設を機に、それまでの季節性インフルエンザウイルスに加えてAH1pdm に対する検査体制の準備に取りかかり、5月3日に感染研から新型インフルエンザ遺伝子検査用の試薬と陽性コントロールRNA が届いた時点でAH1pdm を含めたインフルエンザ検査体制を整えた。なお、この時点では、県内で新型インフルエンザを疑う患者が発生した場合には、患者は感染症指定医療機関 (広島県内で2カ所、うち1カ所は広島市内) での入院とし、そこにおいて検体が採取される計画であった。

(2) 検査対象の変遷と検査体制の推移

広島県において定められた AH1pdm 検査対象の経日的な変遷と、それに関連した検査体制の推移の概要を図1 (下段) に示した。



患者発生状況	~4/27	4/28~5/8	5/9~6/8	6/9~7/5	7/6~10/20	10/21~12/9	12/10~
	未発生期	海外発生期	国内発生早期	国内発生初期	県内拡大期	県内まん延期	回復期
検査対象	5/3~		7/6~		8/28~		12/17~
	インフルエンザが疑われる全ての患者		集団発生 (全例) 入院患者 (全例)		集団発生 (一部) 入院患者 (全例)		入院患者 (重症例・死亡例)
検査体制	24時間 (3交代制) 即日検査		入院患者は即日検査、それ以外は週2回検査 (火・金)				
病原体定点医療機関におけるウイルスサーベイランス (流行ウイルス型、抗原性の変化、薬剤耐性株の調査)							

図1 広島県における AH1pdm 検査体制の推移, 週別の検査数, 検出ウイルス数および定点当り患者数

5月1日からは県内10カ所(後に16カ所に拡大)の中核医療機関が発熱外来を担当する医療機関として指定され、それらの医療機関(広島市内の1カ所を除く)を受診した全てのインフルエンザが疑われる患者がAH1pdm 遺伝子検査の対象となった。6月10日からは、病原体検査定点病院(広島市を除いて県内16カ所)を受診したインフルエンザ患者についても全例がAH1pdm 遺伝子検査の対象に追加された。7月6日からは、それまでの全数検査が中止され、代わって集団発生の疑いがある事例と、重症化する恐れがある入院患者が検査の対象となった。この変更に伴い、当センターの検査体制も、それまでの即日24時間(3交代)体制から、入院患者については1日1回の即日検査、それ以外は週2回の指定日での検査の体制へと変更された。8月28日からは、集団発生事例においても、必要と認められた場合のみ検査対象とすることとなり、さらに12月17日からは、入院患者のうちで、死亡例あるいは重症化した患者のみを検査対象とすることとなった。

感染症発生動向調査事業による検査定点病院でのウイルスサーベイランスについては、流行するウイルスの型や抗原性変化の確認、薬剤耐性株出現を監視する目的のために、通年で実施した。

## 2 インフルエンザ患者の発生状況と、患者からのウイルス検出

2009年4月(第15週)から2010年3月末(第13週)までの間に、県内のインフルエンザ定点医療機関から報告された定点当りの週別患者数の推移と、当センターにおいて実施した週別のインフルエンザウイルス検査数および、その結果検出された亜型別ウイルス数を図1(上段)に示した。

県内においては、4月の時点でも季節性インフルエンザの流行は完全には終息しておらず、定点当たり4.7~2.9人の患者が報告されており、4月28日には県内のインフルエンザ患者からA香港(H3N2)型ウイルスが検出された。A香港(H3N2)型ウイルスは、その後も少数例ではあるものの、6月第4週(第26週)までの間に合計25名から検出された。

一方、AH1pdmについては、米国から帰国した患者から6月9日(第24週)に検出されたのが県内初の事例であり、それ以後もAH1pdmに感染した患者は継続して発生し続け、2010年3月末(第13週)までに、合計400名のAH1pdm患者が確認された。

県内のインフルエンザ報告患者数の推移をみると、県内でAH1pdm感染者が確認されはじめた6月から8月にかけても、患者数は定点あたり1.0未満と少なかったが、10月第1週(41週)には5.0を越え、10月第3週(第43週)には報告数が10.0の注意報レベルを越えた。さら

に翌週には30.0の警報レベルに達し、11月第4週(第48週)には46.8と、このシーズンのピークを示した。しかしその後は、報告患者数は急減し、3月末には流行は終息した。

当センターで実施したAH1pdm検査数をみると、全数検査を実施していた6月第5週(第27週)には、1週間当たりの検査数が40件に達したが、全数検査が中止された7月6日以降は減少した。しかし、その後、県内での患者発生の増加とともに再び検査数も増加し、11月第5週(第49週)には再び一週間の検査数が40件に達した。その後は患者発生の減少に伴って検査数も減少した。

## 3 分離されたAH1pdm株の性状

検査対象となった全ての検体は、遺伝子学的検査とウイルス分離を実施した。AH1pdmが遺伝子学的検査で陽性となった400検体のうち、348検体からMDCK細胞でAH1pdm株が分離された(分離率87.0%)。なお、遺伝子検査陰性でウイルス分離陽性となった例は認められなかった。

### (1) HI試験によるAH1pdm株の抗原性状

分離されたAH1pdm株のHI価については、抗A/California/07/2009pdm血清を用いた成績では、分離された348株中344株がHI価:640~5,120を示し(ホモ価のHI価:2,560)、4株ではHI価:320を示した。

### (2) AH1pdm株のHA性

分離AH1pdm株のうち不作為に抽出した25株について、七面鳥、ニワトリおよびモルモット赤血球に対するHA価を比較した。その結果、七面鳥 $\geq$ モルモット>ニワトリの順にHA価が高かった。また、0.5%七面鳥血球を用いた場合のAH1pdm株のHA価は、MDCK細胞での分離初代では2~64HAを示し(多くの株は8~16HA)、HA価が2~4HA価の場合でも、MDCK細胞に継代培養することで、培養上清のHA価は8HA以上に上昇した。

### (3) AH1pdm株の培養温度の違いによる増殖態度

AH1pdm株について、培養温度の違いによるMDCK細胞でのウイルス増殖態度の違いの有無を確かめるために、2009年の流行初期(6月)に分離された株であるA/Hiroshima/201/2009pdm株と、流行中期(10月)に分離されたA/Hiroshima/385/2009pdm株、それに加えて比較のために2008/09年シーズン中に分離された季節性インフルエンザウイルスのA/Hiroshima/05/2009(H1N1)株とA/Hiroshima/52/2008(H3N2)株の4種類のウイルスについて、34℃と37℃の培養温度におけるウイルス増殖量を4日間観察した。その結果、いずれ

の AH1pdm 株も, 従来の季節性インフルエンザウイルス株と同様に, 34℃と37℃でのウイルス増殖態度には違いは認められなかった (図 2)。

(4) オセルタミビル耐性株の検出状況と耐性株における薬剤感受性

2009年6月から2010年1月にかけて分離された AH1pdm 株のうち, 合計157株について, H275Y オセルタミビル耐性マーカーの有無について検査した。その結果, 11月に分離された1株 (A/Hiroshima/590/2009pdm) において, NA 遺伝子の824番目の塩基が T から A に変異したことによる275番目のアミノ酸がヒスチジン (H) からチロシン (Y) へと変異していた。それ以外の156

株 (A/Hiroshima/201/2009pdm 他155株) については, その部位の変異は認められなかった (図 3)。

H275Y が認められた1株について, NA-Star 基質を用いた化学発光法でオセルタミビルおよびザナミビルに対する薬剤感受性試験を実施した。その結果, オセルタミビルに対する IC50 の値は, 感受性株である A/California/07/2009pdm (AH1pdm 標準株) や, A/Denmark/524/2009pdm (オセルタミビル耐性の陰性コントロール株) では, それぞれ0.10, 0.12であったのに対し, A/Hiroshima/590/2009pdm 株では29.24と高い値を示し, オセルタミビルに対して耐性を獲得していることが確認された。なお, ザナミビルに対しては薬剤感受性を保持していた (表 1)。

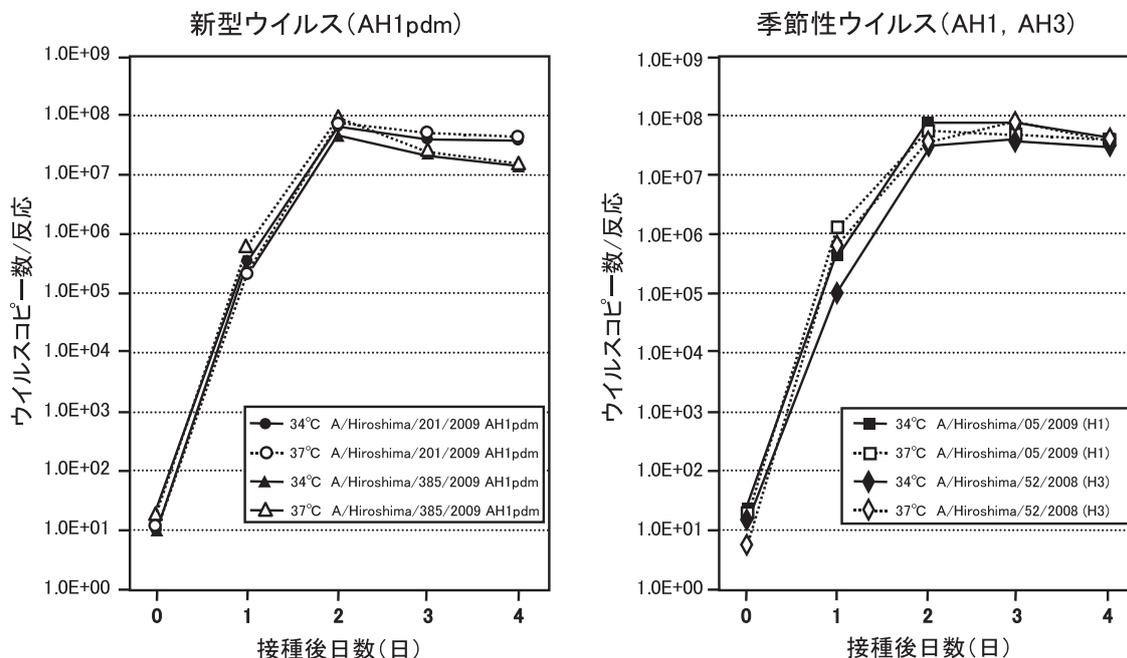


図 2 培養温度の違いによるウイルスの増殖態度

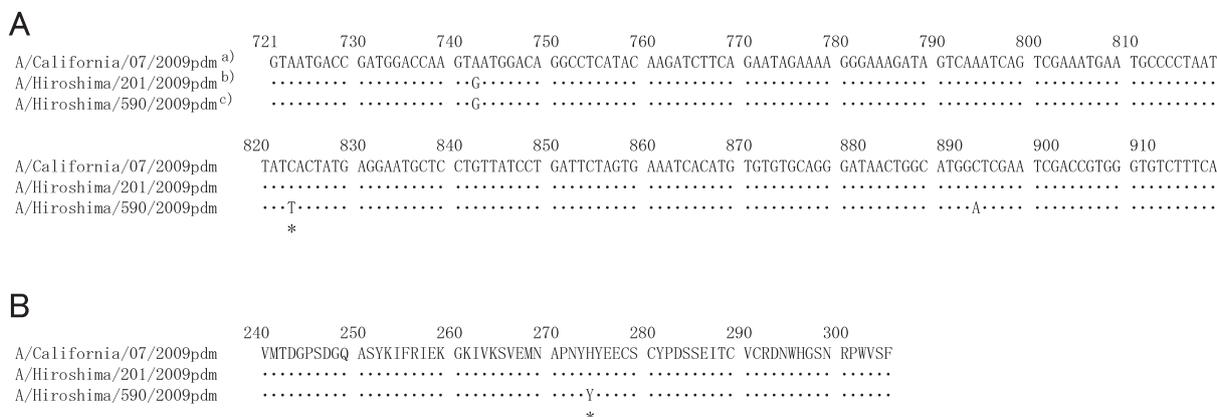


図 3 AH1pdm 株における NA 遺伝子の塩基配列 (A) とアミノ酸配列 (B)

a) : AH1標準株 (オセルタミビル感受性), b) : AH1分離株 (オセルタミビル感受性), c) : AH1分離株 (オセルタミビル耐性)  
\* : H275Y に関連する塩基 (A) とアミノ酸 (B) の変異部位を示す

表1 オセルタミビルおよびザナミビル感受性試験結果

ウイルス株	耐性遺伝子マーカー H275Y	IC50 (nM)	
		オセルタミビル	ザナミビル
A/California/07/2009Epdm <sup>a)</sup>	275H	0.10	0.40
A/Hiroshima/590/2009pdm <sup>b)</sup>	275Y	29.24	0.36
A/Denmark/528/2009pdm <sup>c)</sup>	275Y	42.14	-
A/Denmark/524/2009pdm <sup>d)</sup>	275H	0.12	-

- a) AH1pdm標準株
- b) AH1pdm分離株
- c) オセルタミビル耐性陽性コントロール株
- d) オセルタミビル耐性陰性コントロール株

## 考 察

2009年4月から始まったAH1pdmの世界的なパンデミックについては、我々も含めてインフルエンザ関係者にとっては意外なものであった。それまでは、高病原性トリインフルエンザH5N1型がヒトの世界に流行する可能性や、あるいは鳥に対して病原性が強いH9型やH7型が、ヒトでのパンデミックを起こす新型インフルエンザに変異する可能性が高いと予想されていた [5, 6]。それにもかかわらず、今回のAH1pdmの発生において、大きな混乱もなく2009/10年インフルエンザシーズンを乗り越えられたのは、国や各地方自治体が、新型インフルエンザウイルスの出現に対して、事前に準備していたためであろう。即ち、広島県においては、2005年に新型インフルエンザに対する「新型インフルエンザ対策行動計画」を策定、新型インフルエンザが発生した場合の対応方針を定めるとともに、県内10医療機関を感染症指定協力医療機関（後に16カ所に拡大）として指定し、さらに2006年からは感染防御服やマスク、抗インフルエンザ治療薬等の備蓄を開始した。また、保健所と医療機関による防疫訓練や研修会を繰り返し実施するなど、新型インフルエンザが発生した際の円滑な対応と適切な医療体制の整備に努めていた [7]。

一方、当センターにおけるAH1pdm検査体制に関しても、感染研において2008年9月に開催された高病原性トリインフルエンザH5N1検査に対する研修会に参加するとともに、検査マニュアルに基づく検査トレーニングなどを実施していたため、2009年4月に発生したAH1pdmに対しても、遺伝子検査に使用するプライマーとプローブを一部変更するだけで迅速に検査体制を構築することが可能であった。

当センターで実施したAH1pdmの遺伝子検査に関しては、発生当初の検査では、全例real-time RT-PCR法とconventional RT-PCR法とを併用して実施し、それらの結果を総合的に解析して判定を行っていたが、検査

対象患者数が急増した7月下旬からは、その時点で既にreal-time RT-PCR法の信頼性が確認できたこと、また、当センターにおいて開発したRT-LAMP法を用いてAH1pdmを検出できるようになったこと等の理由から、real-time RT-PCR法とRT-LAMP法による検査を主とし、必要に応じてconventional RT-PCR法を併用する検査体制に改めた。これにより検査の迅速化を図ることが可能となった。

今回、我々が対象とした498検体中400検体から遺伝子検査でAH1pdmが検出され、そのうちの348検体はAH1pdm分離も陽性であった。real-time RT-PCR検査に関しては、感染研から示された検査マニュアルに従って、A型インフルエンザウイルスM遺伝子の検出系、AH1pdmのHA遺伝子の検出系、季節性インフルエンザA (H1N1)のHA遺伝子の検出系、および季節性インフルエンザA (H3N2)のHA遺伝子の検出系、合計4種類の検査系を必ず同時に実施し、AH1pdm陽性の判定はM遺伝子陽性かつAH1pdmHA遺伝子陽性となった場合とした。これにより、real-time RT-PCR検査における非特異反応等を原因とする偽陽性の可能性を排除できたものと考えている。検体中のウイルス量が極めて微量な場合には、real-time RT-PCR法でもウイルス遺伝子が検出されない可能性も考えられるが、我々が実施したAH1pdmのHA遺伝子検出のためのreal-time RT-PCR法の感度については、少なくとも遺伝子36.6コピー/反応を検出できることを確認しており [3]、感度も十分確保できていたと考えている。一方、このreal-time RT-PCR検査に関して、川上らはreal-time RT-PCR法で陰性にもかかわらず、ウイルス分離陽性例が認められたことを報告している [8] が、少なくとも我々が実施したreal-time RT-PCR法の系では、そのような事例は認められなかった。しかし、今後、AH1pdmの遺伝子変異により、real-time RT-PCR法やconventional RT-PCR法の感度が低下する可能性も考えられるので、必要に応じて、それら2種類の検査法や、後で述べるRT-LAMP法などの検査法を組み合わせ

行くことも必要であると考えている。

MDCK細胞を用いて分離されたAH1pdm株の性状に関しては、AH1pdm標準株であるA/California/07/2009pdmに対する抗血清を用いたHI試験による抗原性については、県内で分離されたAH1pdm株については、2009年6月の県内発生初期から、2010年3月の県内での終息時期まで一貫して大きな違いは認められなかったことから、抗原性に大きな差の無いウイルスが流行していたものと推察された。これについては、広島県内で分離された株に限らず、日本国内外で分離された株の大半がA/California/07/2009pdmと類似の抗原性を有していたことが明らかとなっている[9]。

AH1pdmについては、それまでの季節性インフルエンザウイルスよりも肺炎を起こす割合が高いとする指摘が、流行当初から見受けられていた[1, 2, 10]。これに関しては、AH1pdmが、上部気道よりも、より体温の高い下部気道で増殖しやすい性状を有している可能性が考えられたので、分離されたAH1pdm株について、培養温度の違いによる増殖能の差について調べてみたが、それまでの季節性インフルエンザウイルスと同様に、明瞭な差は認められなかった[11]。

2008/09年シーズンに流行していた季節性インフルエンザであるAソ連(H1N1)型ウイルスについては、日本国内で流行していたウイルス株の99.6%がオセルタミビル耐性となっていたことが判明しており[12]、AH1pdm株についてもインフルエンザ治療薬に対する耐性株の出現が危惧された。そのため感染研と全国の地方衛生研究所が共同でAH1pdm分離株についての薬剤耐性株調査が実施された。その結果、本県では調べた157株中1株(0.64%)のみがオセルタミビル耐性株であり、日本国内で確認されたオセルタミビル耐性株の頻度(69株/6089株:1.13%)[13, 14]と同等の低い割合であった。なお、この耐性株が分離された患者は、AH1pdm感染により入院していた家族の付き添いのため、オセルタミビルを発症前に8日間予防的に内服していたことが分かっている。インフルエンザ治療薬の予防的内服は、高頻度に耐性株を出現させる可能性があることが指摘されている[13]ので、この点については今後とも注視していく必要があると考えている。

今回、我々が用いたAH1pdmのRT-LAMP法[3]は、AH1pdmの流行が始まってから急きょ開発したものである。本法の優れた点は、①反応系に標的遺伝子8カ所の領域に対して6種類のプライマーを用いているので感度と特異性が高い(AH1pdm流行期間中に採取された139件の臨床検体についてreal-time RT-PCR法と比較した成績では、感度は98.2%、特異性は100%[3])、②検査開始から10~25分程で反応を確認することができ、40分以内に判定が可能であり迅速性に優れ

ている、③real-time RT-PCRのような高価な検査機器も必要としない、などの利点が挙げられる[15]。従って、RT-LAMP法は当センターのような検査機関のみならず、医療機関におけるAH1pdm確定診断のための有用な検査法となり得ると考えられる。

2010/11年シーズンのインフルエンザについては、現在(2010年9月30日)までのところ、県内で流行の兆しは認められていない。しかし、世界的に見ると2010/11年シーズンのインフルエンザの流行は、AH1pdmに加えて、季節性のA(H3N2)型ウイルスの流行が予想されている[16]。また、日本国内においても、現在は少数例ではあるがAH1pdmと、A(H3N2)型ウイルスが検出されている[17]。今後、これらの型のウイルスが日本国内でも流行していくことが予想されるので、ウイルスの抗原性の変化、薬剤耐性株の出現の頻度等について、引き続き監視をしていく必要があると考えている。

## 文 献

- [1] WHO Global Alert and Response [internet]. Influenza-like illness in the United States and Mexico [cited 2009 April 24]. Available from: [http://www.who.int/csr/don/2009\\_04\\_24/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html)
- [2] Novel swine-origin influenza A (H1N1) virus investigation team, Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med.* 2009;360(25):2605-2615.
- [3] 重本直樹, 福田伸治, 高尾信一, 島津幸枝, 谷澤由枝, 桑山 勝, 大原祥子. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) 法による新型インフルエンザウイルスおよび季節性A型インフルエンザウイルス(H1N1, H3N2)の迅速検出. *感染症学雑誌*, 2010;84(4):431-436.
- [4] Wang B, Dwyer DE, Blyth CC, Soedjono M, Shi H, Kesson A, Ratnamohan M, McPhie K, Cunningham AL, Saksena NK. Detection of the rapid emergence of the H275Y mutation associated with oseltamivir resistance in severe pandemic influenza virus A/H1N1 09 infections. *Antiviral Res.* 2010;87(1):16-21.
- [5] Khanna M, Kumar P, Choudhary K, Kumar B, Vijayan VK. Emerging influenza virus: a global threat. *J Biosci.* 2008;33(4):475-82.
- [6] Kobasa D, Kawaoka Y. Emerging influenza

- viruses: past and present. *Curr Mol Med*. 2005;5(8):791-803.
- [7] 広島県新型インフルエンザ対策専門委員会. 感染症危機管理における保健福祉行政の役割—期待と現実を踏まえ— 広島県における新型インフルエンザの対応. *広島医学*. 2010;63(6):477-496.
- [8] 川上千春, 宇宿秀三, 七種美和子, 百木智子, 熊崎真琴, 高津和弘, 池淵 守, 蔵田英志, 岩田真美, 豊澤隆弘, 他. <速報>ウイルス分離により確認された新型インフルエンザの国内初症例について—横浜市. *病原微生物検出情報*. 2009;30(9):239-241.
- [9] 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第一室 WHO インフルエンザ協力センター, 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター, 独立行政法人製品評価技術基盤機構, 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. <特集関連情報>2009/10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*. 2010;31(9):253-260.
- [10] Perez-Padilla R, de la Rosa-Zamboni D, Ponce de Leon S, Hernandez M, Quiñones-Falconi F, Bautista E, Ramirez-Venegas A, Rojas-Serrano J, Ormsby CE, Corrales A et al. Pneumonia and respiratory failure from swine-origin influenza A(H1N1) in Mexico. *N Engl J Med*. 2009;361(7):680-689.
- [11] 高尾信一, 島津幸枝, 重本直樹, 福田伸治, 谷澤由枝, 竹田義弘, 桑山 勝, 大原祥子, 松尾健, 妹尾正登. <速報>新型インフルエンザウイルスの分離状況と分離ウイルス株の性状について—広島県. *病原微生物検出情報*. 2009;30(12):321-322.
- [12] 国立感染症研究所ウイルス第三部第一室インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスチーム, 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部ゲノム解析部門インフルエンザウイルス遺伝子解析チーム, 全国地方衛生研究所. <速報>2008/2009インフルエンザシーズンにおけるインフルエンザ (A/H1N1) オセルタミビル耐性株 (H275Y) の国内発生状況 [第2報]. *病原微生物検出情報*. 2009;30(4):101-106.
- [13] 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第一室, 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源情報部門, 地方衛生研究所. <速報>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*. 2010;31(2):49-53.
- [14] 国立感染症研究所インフルエンザ研究センター第一室, 全国地方衛生研究所, 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター, 独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部生物遺伝資源情報部門. <速報>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2報]. *病原微生物検出情報*. 2010;31(6):174-178.
- [15] 行正信康. 市販の遺伝子増幅試薬. *臨床と微生物*. 2010;37(5):429-436.
- [16] WHO Global Alert and Response [internet]. Influenza update-24 September 2010 [cited 2010 Sept24]. Available from: [http://www.who.int/csr/disease/influenza/2010\\_09\\_24\\_GIP\\_surveillance/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/influenza/2010_09_24_GIP_surveillance/en/index.html)
- [17] 国立感染症研究所感染症情報センター IASR [internet]. インフルエンザウイルス分離・検出速報 2009/10シーズン (季節性+ AH1pdm) [cited 2010 Sept 29]. Available from: <http://idsc.nih.gov.jp/iasr/influ.html>