

## 長野県環境保全研究所における 新型インフルエンザ (A/H1N1) 検査状況－2009年～2010年

笠原ひとみ<sup>1</sup>・粕尾しず子<sup>2</sup>・宮坂たつ子<sup>1</sup>・畔上由佳<sup>1</sup>・吉田徹也<sup>1</sup>  
内山友里恵<sup>1</sup>・上田ひろみ<sup>1</sup>・長瀬 博<sup>1</sup>・藤田 暁<sup>1</sup>

新型インフルエンザ (A/H1N1) は2009年4月下旬の発生以降、約1年間にわたり流行した。この間、当所では1,008検体の検査を実施し、リアルタイム RT-PCR法により853検体から新型インフルエンザウイルス (AH1pdm) の遺伝子を検出した。一方、季節性インフルエンザウイルスは9検体検出されたのみであった。このことから、2009年春から2010年春にかけてインフルエンザに罹患した患者のほとんどが、AH1pdmに感染したことが強く示唆された。

キーワード: 新型インフルエンザ (A/H1N1), 新型インフルエンザウイルス (AH1pdm), リアルタイム RT-PCR法, サーベイランス

### 1. はじめに

新型インフルエンザ (A/H1N1) は2009年4月下旬、メキシコやアメリカにおけるヒトからヒトへの感染確認から始まった<sup>1)</sup>。日本国内では5月9日に初の新型インフルエンザ患者が確認され、長野県内では当所の検査により6月13日に初発患者を確認した。以降、患者数が徐々に増加し、2009年第47週にピーク(1定点あたり55.31人)を迎え、2010年第10週に1定点あたり1.0人を下回るまで流行が続いた<sup>2),3)</sup>。発生当初から現在に至るまで、当所では県内(長野市を除く)の新型インフルエンザウイルス (AH1pdm) (以下「AH1pdm」) の検査を実施してきた。

今回は、当所における2009年5月から2010年6月末までの当所における検査体制の経過およびウイルス検出状況について報告する。

### 2. 材料および方法

検査は、国立感染症研究所(以下「感染研」)が示したマニュアル<sup>4)</sup>に準じて実施した。検体は新型インフルエンザが疑われる患者から県内の医療機関で採取され、管轄保健福祉事務所を経由して搬入された咽頭または鼻腔ぬぐい液とし、そこからRNAを抽出した。AH1pdm遺伝子の検出は、原則としてリアルタイム RT-PCR法を用い、必要に応じてコンベンショナル RT-PCR法を併用した。

なお、8月以降はリアルタイム RT-PCR法に加え、一部の検体についてはMDCK細胞を用いたウイルスの分離培養を試みた。

さらに2010年1月以降は、抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランスも行った。すなわち、無作為に分離株を抽出し、オセルタミビル耐性に関与する部位を含む、NA遺伝子の一部をコンベンショナル RT-PCR法によって増幅した。PCR産物は、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を明らかにし、オセルタミビル耐性の有無を推定した。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 検査体制の構築と経過

感染研から、2009年5月1日に「病原微生物検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ」が提示され、5月2日にリアルタイム RT-PCR法検査試薬が配布された。このことを受け、5月3日までに当所における検査体制を整備し、5月4日から検査受入可能とした。

検査は厚生労働省通知に基づき、疑い例の全数検査(7月23日まで)、クラスター(集団発生)サーベイランス(7月24日から8月23日まで)、インフルエンザ入院サーベイランス(7月24日から2010年3月30日まで、以降はインフルエンザ重症サーベイランスとして重症者のみ実施)およびウイルスサーベイランス(7月24日以降)として実施した。全数検査は24時間体制で実施したが、そ

1 長野県環境保全研究所 感染症部 〒380-0944 長野市安茂里米村 1978

2 長野県佐久保健福祉事務所 〒385-8533 佐久市跡部 65-1

の後は緊急時を除き、勤務時間内のみの実施体制に切り替えた。なおこの間の検査体制は、当所感染症部職員6人で、リアルタイムPCR装置（ABI PRISM 7500）1台により実施した。

### 3.2 検査検体数の推移

2009年5月から2010年6月までの間の検体数は、1,008検体であった。感染症発生動向調査事業により、県内88か所（小児科55か所、内科33か所）の定点から保健所への毎週の報告により集計されたインフルエンザ患者報告数（長野県）とウイルス検査数の推移を図1に、サーベイランス区別の検体数および検出数を表1に示した。

検体数は、2009年7月下旬から8月下旬にかけて急増した。これは、多くが県外から課外活動の合宿などで本県を訪れた学生などの集団から、インフルエンザ様疾患を呈し、クラスター（集団発生）サーベイランスとして探知されたからである<sup>3)</sup>。その後、8月23日のクラスター（集団発生）サーベイランスに伴う検査の中止とともに、検体数は一旦減少した。しかし、本格的な感染拡大に伴いインフルエンザ入院サーベイランスおよびウイルスサーベイランスによる検体が増加をはじめ、第46週（11月10日～11月16日）に1週間あたり78検体とピークを迎

えた。これは、1定点あたり55.31人であった患者数のピーク（第47週：11月17日～11月22日）<sup>2),3)</sup>とほぼ一致した。1日あたりの最大検査数は、11月11日の24検体であった。その後は流行の沈静化とともに減少し、2010年第10週（3月8日～3月14日）には1週間あたりの検体数が1検体を下回った。

### 3.3 各種サーベイランス別ウイルス検出状況

#### 3.3.1 総数

1,008検体のうち、リアルタイムRT-PCR法により853検体（84.6%）がAH1pdm陽性であった。一方、季節性は2009年5月から9月にかけて検出されたAH3（香港型）7検体（0.8%）と、2010年2月から3月にかけて検出されたB型2検体（0.2%）で、陰性は141検体（14.0%）であった（表1、図1）。この間、前シーズン（2008-2009）に流行したAH1（ソ連型）は全く検出されなかった。以上のことから、2009年春から2010年春にかけてインフルエンザに罹患した患者のほとんどが、AH1pdmに感染していたことが強く示唆された。

#### 3.3.2 全数検査

発生初期の全数検査（5月4日～7月23日）は51件実施し、AH1pdm陽性が21件（41.2%）、陰

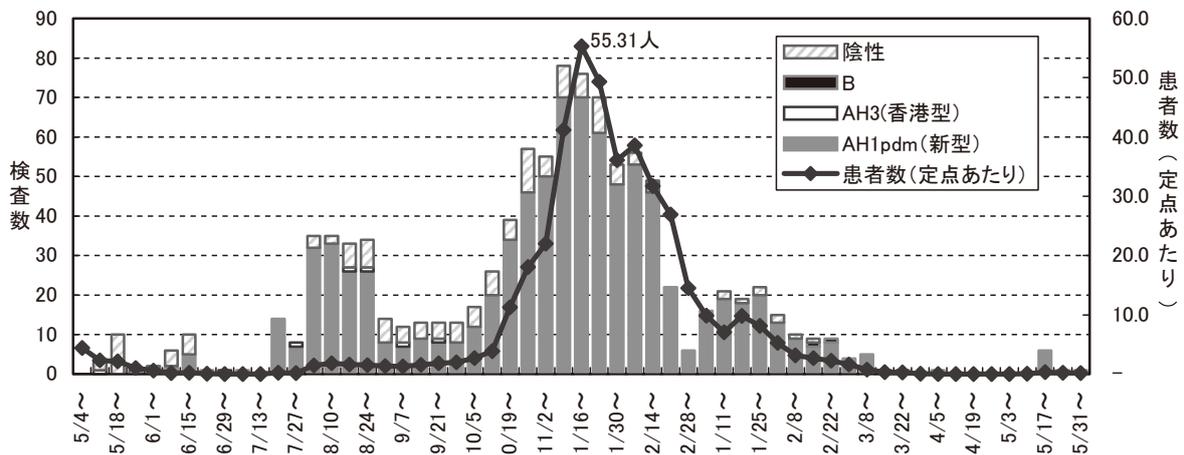


図1 インフルエンザ患者報告数（長野県）とウイルス検査数（当所）推移

表1 サーベイランス別検査数・ウイルス検出状況（リアルタイムRT-PCR法）

サーベイランス区分	(調査期間)	検査数	AH1pdm (新型)	AH1 (ソ連型)	AH3 (香港型)	B型	陰性	判定不能
全数	(5/4～7/23)	51	21 (41.2)	0 (0.0)	2 (3.9)	0 (0.0)	24 (47.1)	4 (7.8)
クラスター	(7/24～8/23)	114	103 (90.4)	0 (0.0)	2 (1.8)	0 (0.0)	9 (7.9)	0 (0.0)
入院・重症	(7/24～'10/6/30)	413	323 (78.2)	0 (0.0)	2 (0.5)	0 (0.0)	88 (21.3)	0 (0.0)
ウイルス	(7/24～'10/6/30)	430	406 (94.4)	0 (0.0)	1 (0.2)	2 (0.5)	21 (4.9)	0 (0.0)
合計		1,008	853 (84.6)	0 (0.0)	7 (0.7)	2 (0.2)	141 (14.0)	4 (0.4)

注) ( )内の数字はサーベイランス区分ごとの検査数に占める割合(%)

性 24 件 (47.1%) であった。またこの時期、リアルタイム RT-PCR 法では判定が困難であった判定不能例が 4 検体 (7.8%) があった。

5 月 4 日の検査受入体制整備以降、初めての検査は 5 月 11 日であった。当所で初めて AH1pdm 陽性例を確認したのは国内で初めて発生が確認された 5 月 9 日より約 1 か月後の 6 月 13 日で、当所の 24 例目として検査を実施した検体であった。この事例は県内初の患者発生事例となった。

判定不能例のうち 3 検体は 5 月 18 日、1 検体は 6 月 19 日と、いずれも比較的発生初期の段階で受け入れた検体であった。なお、この 4 検体のうち、3 検体は再度検体を採取して検査を実施し、2 検体は陰性、1 検体は陽性と確認された。他 1 検体は MDCK 細胞を用いてウイルス培養を試みたが、不検出であった。

### 3.3.3 クラスター (集団発生) サーベイランス

集団感染事例の把握に伴う検査 (7 月 24 日～8 月 23 日) は 114 検体の検査を実施し、AH1pdm 陽性が 103 件 (90.4%)、陰性 9 件 (7.9%) であり、全数検査時に比べ、AH1pdm 陽性率が大幅に高くなった。

この時期は学校等の夏季休暇シーズンであったこともあり、県内発生集団に比べ合宿等で県外から県内へ訪れた集団からの検体搬入が非常に多かった<sup>3)</sup>。

### 3.3.4 インフルエンザ入院・重症サーベイランス

入院患者から採取された検体の検査 (7 月 24 日～2010 年 3 月 30 日。以降は重症化した患者のみ重症サーベイランスへ移行) は 413 検体の検査を実施し、AH1pdm 陽性が 323 件 (78.2%)、陰性 88 件 (21.3%) であり、クラスターサーベイランスやウイルスサーベイランスに比べ AH1pdm 陽性率が低かった。

### 3.3.5 ウイルスサーベイランス

7 月 24 日以降、感染症発生動向調査に基づくインフルエンザ定点のうち、病原体定点に指定されている県内 13 か所の医療機関から検体送付があり、430 検体の検査を実施した。AH1pdm 陽性が 406 件 (94.4%)、陰性は 21 件 (4.9%) であった。

ウイルスサーベイランスは、他のサーベイランス区分に比べ最も AH1pdm の陽性率が高かった。

### 3.4 年代別検出数

AH1pdm 陽性者の年代別割合を図 2 に示した。20 歳未満は 5 歳刻みに、20 歳以上は 10 歳刻みに分類した。5～9 歳の 236 件 (28.1%) が最も多く、次いで 10～14 歳の 220 件 (25.8%) と続いた。5～14 歳が全体の 53.9% となり、半数を超えた。また、15～19 歳が 130 件 (15.2%)、0～4 歳が 109 件 (12.8%) であり、20 歳未満の割合が 80% を超えた。一方、60 歳以上は 24 件 (2.3%) と非常に少なかった。これは、同期間の感染症発生動向調査に基づく患者届出数の年代別割合<sup>2),3)</sup> とほぼ一致しており、検査結果が県内の流行状況を反映していたと考えられた。

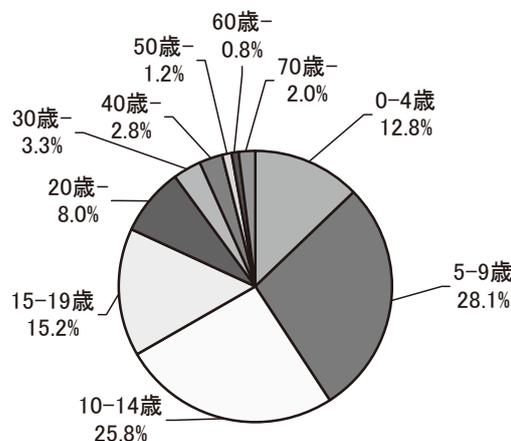


図2 AH1pdm 陽性者の年代別割合

### 3.5 迅速診断キット (IC 法) とリアルタイム RT-PCR 法との比較

搬入された 1,008 検体のうち、各医療機関で実施された IC 法の結果が把握できたのは 958 件であった。IC 法で A(+)B(-) であった 831 検体のうち、リアルタイム RT-PCR 法で AH1pdm 陽性は 778 検体 (93.6%)、陰性は 45 検体 (5.4%) であった (表 2)。

特に、全数検査期間中に IC 法で A(+)B(-) と判定されて搬入された 20 検体中、リアルタイム RT-PCR 法で AH1pdm 陽性であったのはわずか 9 検体 (45.0%) であった。また IC 法 A(+)B(-) でリアルタイム RT-PCR 法陰性であったのは 8 検体 (40.0%) であり、他のサーベイランス検査より検査結果不一致率が高かった。

IC 法で A(-)B(-) の検体は合計 118 検体であったが、このうち 23 検体 (19.5%) はリアルタイム RT-PCR 法で AH1pdm 陽性であった。特に入院・重症サーベイランスで搬入された検体でその割合が高かった (20 検体、25.3%)。

表2 IC法とリアルタイム RT-PCR法との比較

IC法	リアルタイム RT-PCR法						
	AH1pdm	AH3	B型	陰性	判定不能	小計	
全数	A(+ )B(-)	9 (45.0)	2 (10.0)		8 (40.0)	1 (5.0)	20
	A(-)B(+)						
	A(+ )B(+)						
	A(-)B(-)	1 (5.0)			16 (80.0)	3 (15.0)	20
	不明、未実施	11 (100.0)					11
	小計	21	2		24	4	51
クラスター	A(+ )B(-)	101 (96.2)	2 (1.9)		2 (1.9)		105
	A(-)B(+)						
	A(+ )B(+)						
	A(-)B(-)				7 (100.0)		7
	不明、未実施	2 (100.0)					2
	小計	103	2		9		114
入院・重症	A(+ )B(-)	274 (89.8)	2 (0.7)		29 (9.5)		305
	A(-)B(+)						
	A(+ )B(+)	1 (100.0)					1
	A(-)B(-)	20 (25.3)			59 (74.7)		79
	不明、未実施	28 (100.0)					28
	小計	323	2		88		413
ウイルス	A(+ )B(-)	394 (98.3)	1 (0.2)		6 (1.5)		401
	A(-)B(+)	1 (33.3)		2 (66.7)			3
	A(+ )B(+)	1 (20.0)			4 (80.0)		5
	A(-)B(-)	2 (16.7)			10 (83.3)		12
	不明、未実施	8 (88.9)			1 (11.1)		9
	小計	406	1	2	21		430
合計	A(+ )B(-)	778 (93.6)	7 (0.8)		45 (5.4)	1 (0.1)	831
	A(-)B(+)	1 (33.3)		2 (66.7)			3
	A(+ )B(+)	2 (33.3)			4 (66.7)		6
	A(-)B(-)	23 (19.5)			92 (78.0)	3 (2.5)	118
	不明、未実施	49 (98.0)			1 (2.0)		50
	計	853	7	2	142	4	1008

注) ( )内の数字は割合 (%)

### 3.6 細胞培養による分離同定結果およびリアルタイム RT-PCR法との比較

細胞培養による分離同定結果とリアルタイム RT-PCR法との比較したものを表3に示した。

2009年8月以降、インフルエンザ入院・重症サーベイランスおよびウイルスサーベイランスとして搬入された検体のうち236検体は、MDCK細胞を用いて分離同定を実施した。培養法でAH1pdmを検出したのは166検体であり、これらはリアルタイム RT-PCR法によってすべて陽性であった。

一方、培養法で不検出だったのは70検体で、そのうち56検体(80.0%)はリアルタイム RT-PCR法陽性であった。これは、検体に含まれる感染ウイルス量が少なかったためであると推測された。

表3 培養法とリアルタイム RT-PCR法との比較

培養法	リアルタイム RT-PCR法			
	AH1pdm陽性	陰性	判定不能	計
AH1pdm検出	166 (100.0)			166 (70.3)
不検出	56 (80.0)	13 (18.6)	1 (1.4)	70 (29.7)
計	222 (94.1)	13 (5.5)	1 (0.4)	236 (100.0)

注) ( )内の数字は割合 (%)

### 3.7 抗インフルエンザ薬剤耐性株サーベイランス結果

2010年1月以降、インフルエンザ入院・重症サーベイランスおよびウイルスサーベイランスで培養法によりAH1pdmを検出した検体のうち、地域の偏りが生じないことを考慮した上で無作為抽出した52検体(株)について本検査を実施した。その結果、すべての株は、オセルタミビルに対し感受性であった。

一方、国内では約1%の割合でオセルタミビル耐性株が、散発的に検出されている。ただし、これら耐性株のほとんどは、オセルタミビルの予防投与または治療投与中に検体を採取したケースであったと報告されている<sup>5)</sup>。

日本は世界最大のオセルタミビル使用国であることから、薬剤に対する耐性株が増加することが懸念されるため、今後も継続して耐性株の出現状況を把握し、関係者へ広く情報提供していくことが必要であると考えられる。

## 文 献

### 4. 今後の課題

今回の新型インフルエンザ (A/H1N1) への検査対応を踏まえ、いくつかの課題が考えられた。

まず、発生初期の段階では、病原ウイルスに対する正確かつ迅速な検査が求められる。未知の病原ウイルスに対する検査体制の早期構築が不可欠だが、これには平常時からの体制整備 (マニュアル整備、模擬訓練の実施、関係機関との連携・支援等) や、人材育成 (新たな検査技術の習得・向上) が必要である。さらには、ウイルスの特性や臨床像などの情報を迅速に探知することも重要である。

一方、まん延期の課題としては、患者数の増加に伴って検査検体数が急増する点である。この時期は、ウイルスの抗原性・性状変化の監視や薬剤耐性の検査を重点的に実施し、治療方針の見直し等に役立てていくことが必要である。

今回の新型インフルエンザ (A/H1N1) に対する対応は、発生当初から終息に至るまで約1年間を要した。この間、通常業務を行いながら平常時よりはるかに大量の検査を実施せざるを得ず、業務の優先順位の付け方が非常に重要なものとなった。

今後懸念される、鳥インフルエンザ A/H5N1 などの原因とする新たな新型インフルエンザの発生に備え、流行期別の特徴を加味した上で、検査機器、検査施設、人員配置など各側面からの整備、再構築が必要不可欠である。

- 1) World Health Organization ,Global Alert and Response. Influenza-like illness in the United States and Mexico, 24 April 2009. :  
[http://www.who.int/csr/don/2009\\_04\\_24/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_04_24/en/index.html)  
(2010年1月6日確認)
- 2) 長野県, 感染症情報年別届出数一覧 :  
<http://www.pref.nagano.lg.jp/eisei/hokenyob/kansen/kansen-ydata.htm>(2011年1月6日確認)
- 3) 2009 (平成21) 年 - 2010 (平成22) 年新型インフルエンザ (A/H1N1) 対策検証報告書 (平成22年6月) 長野県新型インフルエンザ対策本部
- 4) 国立感染症研究所ウイルス第3部 病原体検査マニュアル高病原性鳥インフルエンザ (2009.5月 ver.1) 国立感染症研究所; 2009
- 5) 国立感染症研究所感染症情報センター, インフルエンザウイルス分離・検出速報 :  
<http://idsc.nih.go.jp/iasr/influ.html>  
(2011年1月6日確認)

## Inspection of pandemic influenza A/H1N1 virus in the Nagano Environmental Conservation Research Institute from 2009 to 2010

Hitomi KASAHARA<sup>1</sup>, Shizuko KASUO<sup>2</sup>, Tatsuko MIYASAKA<sup>1</sup>, Yuka AZEGAMI<sup>1</sup>, Tetsuya YOSHIDA<sup>1</sup>, Yurie UCHIYAMA<sup>1</sup>,  
Hiromi UEDA<sup>1</sup>, Hiroshi NAGASE<sup>1</sup> and Satoru FUJITA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Nagano Environmental Conservation Research Institute, Infectious Disease Division,  
1978 Komemura, Amori, Nagano 380-0944, Japan

<sup>2</sup> Saku Health and Welfare Office, 65-1 Atobe, Saku 385-8533, Japan