

## 資料

## 岐阜県における新型インフルエンザ(AH1N1pdm)検査について

葛口剛, 青木聡, 岡隆史, 三輪由紀子, 白木豊, 猿渡正子

## 要 旨

2009年世界的に猛威をふるった新型インフルエンザの岐阜県での患者発生に伴い、保健環境研究所において「全数調査」、「クラスターサーベイランス」、「入院サーベイランス」の検査として延べ618事例、および「発生動向調査」の検査として70事例の検体について遺伝子検査を行い、579人の新型インフルエンザ(AH1N1pdm)陽性(陽性率84%)、5人のAソ連型インフルエンザ、10人のA香港型インフルエンザ陽性を確認した。

キーワード：新型インフルエンザ(AH1N1pdm)、パンデミック、遺伝子検査

## 1 はじめに

2009年4月にメキシコ及び米国において、今まで流行していたインフルエンザウイルスと抗原性が異なるインフルエンザウイルスの流行が確認され、「新型インフルエンザウイルス」と認められた。このウイルスの伝播速度は速く全世界中に広まり、発生確認から約2ヶ月後の6月11日には「WHOによる新型インフルエンザ世界的流行の警戒水準」が最高のフェーズ6(パンデミックが起きていることを示す)に引き上げられた。日本国内においても、発生国からの帰国・入国の際の空港等における検疫が強化されたが、発生確認から約3週間後の5月16日には渡航歴のない人の感染・発症が関西地方で確認され、国外での感染・発症ではなく、国内での感染が起きていることが示され、その後全国各地に感染が拡大していった。

## 2 保健環境研究所における検査経緯

岐阜県においては、メキシコでの発生が公表された翌4月25日には「岐阜県新型インフルエンザ対策推進会議」が開催され、WHOの警戒水準がフェーズ4に引き上げられた28日には「岐阜県新型インフルエンザ対策本部」が設置された。当所においては、5月より国立感染症研究所が示した検査マニュアルに基づき検査体制を整え、新型インフルエンザ疑いの患者を全て検査する「全数把握」に対応した24時間検査体制を敷いた。

「全数把握」は7月23日まで行い、翌24日から

は同一の集団(学校、施設、サークル等)に属する者の間でインフルエンザ(疑いを含む)が続発している場合、当該感染疑い集団の一部の患者について検査を行う「クラスターサーベイランス」(8月27日まで)及び入院患者全てを検査する「入院サーベイランス」(12月21日まで)を行い、12月22日からは入院患者のうち重症患者のみを検査する「入院サーベイランス」で対象となる患者検体を検査した(表1、表2)。また、7月24日からは感染症発生動向調査事業による定点医療機関等からのインフルエンザ検体の受け入れも同時に行った。

表1 岐阜県における主な新型インフルエンザ対応検査の経緯

月 日	新型インフルエンザ対応検査
5月2日	新型インフルエンザ検査体制整備
5月7日	県内最初の感染疑い患者(米国より帰国、陰性)
5月16日	[検疫を除く国内初の患者確認、神戸市]
6月16日	県内初の患者確認(2名、米国より帰国/学校内感染)
7月23日	県内患者確認数100名を超える
7月24日	患者の全数検査取りやめ→集団の一部及び入院患者のみ検査(クラスターサーベイランス、入院サーベイランス)
8月27日	クラスターサーベイランス終了
10月19日	ワクチン接種開始
12月21日	入院サーベイランス 検査対象を重症患者のみに限定

[ ]は国内の経緯

表2 検査件数とインフルエンザウイルス検出状況

区分	期間	検査件数	新型インフルエンザウイルス検出	AH3	AH1
全数把握	～H21.7.23	143	99	10	5
クラスターサーベイランス	H21.7.24～H21.8.27	72	68	0	0
入院サーベイランス	H21.7.24～H21.12.20	398	344	0	0
入院サーベイランス (重症患者のみ)	H21.12.21～	5	2	0	0
計		618	513	10	5
発生動向調査	H21.7.24～	70	66	0	0
総合計		688	579	10	5

### 3 検査材料および検査方法

#### 3.1 検査材料

検査材料は、医療機関等においてインフルエンザを疑う患者または、インフルエンザ迅速診断キットでA型陽性を示した患者から咽頭及び鼻腔の拭い液（両方または片方）を採取し、所管の保健所が当所に搬入した。

#### 3.2 検査方法

##### 3.2.1 検体処理

実験室内感染を防止するために検体処理は、防護服、前掛け、ゴーグル、N95 マスク、2重手袋、長靴を装備した上で、安全キャビネット内で行った。搬入された検体材料の綿棒をメジウム内でよくほぐし、取り除いた後、3,000rpm、20分間遠心分離し、上清を検査検体とした。

##### 3.2.2 ウイルス遺伝子検出検査

遺伝子検出手順は図1に示す国立感染症研究所が作成した検査マニュアル<sup>1)</sup>に従い行った。

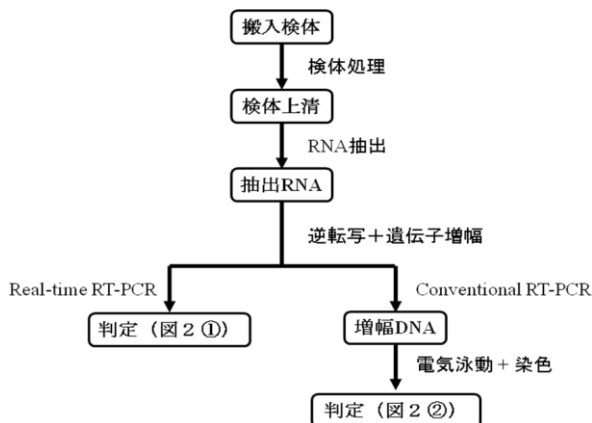


図1 遺伝子検出の手順

ウイルス RNA の抽出は、市販の RNA 抽出試薬 (QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)) を用いて行った。得られた RNA を鋳型に QuantiTect Probe RT-PCR Kit (QIAGEN, リアルタイム RT-PCR) 及び、OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN, コンベンショナル RT-PCR) を用いて次に挙げる①～⑤のウイルス遺伝子の増幅反応を行った。

- ①A 型インフルエンザウイルス特異的 M タンパク質遺伝子 (以下 TypeA と略す)
- ②新型インフルエンザウイルス特異的ヘマグルチニン (HA) 遺伝子 (以下 SwH1 と略す)
- ③A 香港型インフルエンザウイルス特異的 HA 遺伝子 (以下 AH3 と略す)
- ④ソ連型インフルエンザウイルス特異的 HA 遺伝子 (以下 AH1 と略す)
- ⑤B 型インフルエンザウイルス特異的 M タンパク質遺伝子 (以下 TypeB と略す)

##### 3.2.3 判定

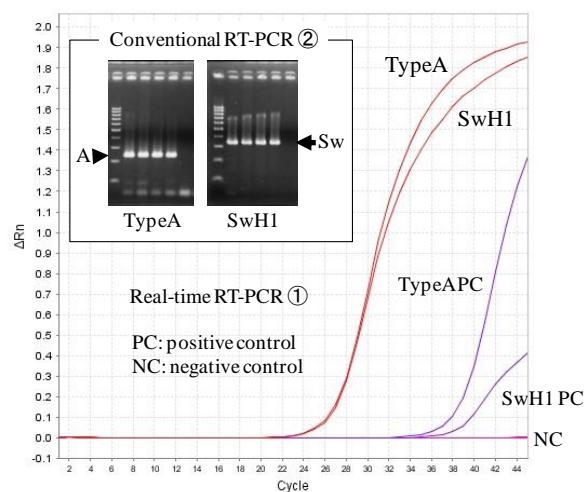


図2 リアルタイム RT-PCR①及びコンベンショナル RT-PCR②によるウイルス遺伝子の検出事例  
リアルタイム RT-PCR①：目的遺伝子の増幅に伴い、経時的に濃度に応じ蛍光強度が上がり、 $\Delta Rn$  値が上昇するカーブを描く。コンベンショナル RT-PCR②：反応終了後の電気泳動写真。（増幅目的遺伝子を→で示す。）

上記図2-①の様にリアルタイム RT-PCR で TypeA 及び SwH1 が検出されたもの、もしくは図2-②の様にコンベンショナル RT-PCR において TypeA 及び SwH1 の増幅が確認できた検体を新型インフルエン

が陽性とした。一方、TypeA 及び AH3 の増幅を確認した検体はA 香港型インフルエンザ陽性とし、TypeA 及び AH1 の増幅を確認した検体はA ソ連型インフルエンザ陽性とした。

#### 4 結果

県内初の疑い症例患者は米国より帰国した子供で、検体は5月7日未明に搬入され、検査の結果はインフルエンザ陰性であった。県内最初の感染確認事例は国内発生から1ヶ月経過した6月16日に検体採取・即日検査した2名の患者(米国より帰国した男児および隣県の大学に通う男子大学生)であり、検査開始から20及び21事例目にあたる。これらの事例を含め、「全数把握」では143事例について検査を行い、99事例から新型、5事例からA ソ連型、10事例からA 香港型インフルエンザウイルスが検出された。「クラスターサーベイランス」において72事例を検査し、新型インフルエンザウイルスが68事例から検出された。「入院サーベイランス」において403事例を検査し、新型インフルエンザウイルスが346事例から検出された。また、発生動向調査事業として搬入された70事例では、新型インフルエンザウイルスが66事例から検出された。総検査数は延べ688事例分、新型インフルエンザは579事例であった(表2)。

表3 男女別入院患者数及び年齢分布

		入院サーベイランス患者数 403					
年齢 性別	0~6歳	7~12歳	13-15歳	16-18歳	19-60歳	61歳~	合計
男性	119	86	16	5	14	13	253
女性	72	42	9	1	12	13	149
合計	191	130	25	6	26	26	402

性別年齢記載漏れ1名

#### 5 考察

「全数把握」、「クラスターサーベイランス」が行われた流行初期には、米国など感染者が出ている地域からの帰国者や学校内感染の学生およびその家族、医療関係者が事例の大半を占めた。一方、流行時に行った「入院サーベイランス」では、事例の約8割(319事例)が12歳以下で、入院患者が低年齢層に集中しており、また、女性よりも男性の入院患

者が多かった(表3)。

更に、クラスターサーベイランスが終了し、入院サーベイランスのみとなった第36週以降の週あたりの入院サーベイランス検査数と岐阜県内インフルエンザ患者報告数を示す「定点あたりのインフルエンザ患者数」が同じように推移していることから(図3)、新型インフルエンザ患者は一定の割合で重症化し、入院したと推測される。

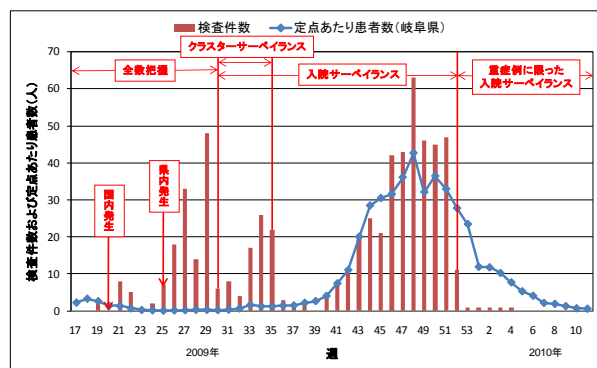


図3 検査件数および定点あたり患者数の推移

また、入院患者の症状としては「脳炎・脳症」、「異常言動・意識障害」、「肺炎」、「喘息の悪化」など重い症例が86事例、重症化が懸念された基礎疾患を有する患者が約1/3の133事例であった(基礎疾患を有する重症患者を含む)。これに対し、「経過観察」が目的と思われる「基礎疾患なし」かつ「重症例でない」入院事例が非常に多かった。全国で急激に容態が悪化する事例が多発した影響があったためと思われる(表4)。

表4 入院患者の症状及び基礎疾患保有状況

		入院サーベイランス患者数 403	
重症事例	86	基礎疾患あり	133
肺炎併発	37	呼吸器疾患	86
呼吸異常(喘息等)	15	てんかん	7
脳炎・脳症	5	糖尿病	4
意識障害・異常言動	14	腎疾患	4
(熱性)けいれん	14	脳疾患	3
嘔吐・下痢	14	心疾患・高血圧	6

複数の症状・基礎疾患を有する患者あり

表2に示したように、インフルエンザ検出検査において8月以降、県内で季節性インフルエンザウイ

ルスは検出されず、インフルエンザ陽性患者は全て新型インフルエンザウイルスによるものであった。このことは2009/10シーズン全国集計で新型インフルエンザウイルスが全インフルエンザウイルス検出例の95%以上を占める結果と合致している(Aソ連型インフルエンザウイルスは全国的にも検出されておらず、A香港型およびB型インフルエンザウイルスのみ検出されている)<sup>2)</sup>。今回のパンデミックを起こした新型インフルエンザウイルスは、ブタ-ブタ間で感染していたウイルスがヒトへの感染性を有するように変異したことによって発生したと考えられ、従来の季節性インフルエンザウイルスと抗原性が異なったため新型インフルエンザ感染が優位に広まり、相反して季節性インフルエンザ感染が抑制されたと考えられている。

インフルエンザウイルスの検査は一般的に迅速診断キットが用いられる。迅速診断キットは簡便かつ数十分で判定が可能であるが、A型もしくはB型インフルエンザ感染を判定するのみである。遺伝子検査は迅速検査よりも高コストで判定までに数時間かかるが、検出感度は数段高く、感染初期や末期のウイルス量が少ない場合の診断に威力を発揮する。また、A型インフルエンザであった場合の新型・Aソ連

型・A香港型の型別には遺伝子検査又はウイルス分離同定検査が必要となる。ウイルス分離により得られた分離株を用いて流行しているウイルスの抗原性状分析を行うことも可能で、翌シーズンのワクチン株選定の基礎資料となる。また、薬剤耐性試験にも必要不可欠である。

## 6 まとめ

国内における新型インフルエンザの流行は収まったと思われるが、「新型の再流行」、「薬剤耐性ウイルスの出現」などが危惧されている。今後も県民の健康に役立てるため検査を適宜行っていきたい。

## 謝辞

本感染症に関する疫学情報および検査情報を提供して頂いた県内医療機関並びに新型インフルエンザ対策本部事務局・保健所の皆様に深謝致します。

## 文献

- 1) 病原体検出マニュアル H1N1 新型インフルエンザ
- 2) IDWR 感染症発生動向調査 感染症週報

## Inspection of Influenza virus (AH1N1pdm) in Gifu Prefecture.

Tsuyoshi KUZUGUCHI, Satoru AOKI, Takashi OKA, Yukiko MIWA, Yutaka SHIRAKI, Seiko SAWATARI

*Gifu Prefectural Research Institute for Health and Environmental Sciences:*

*1-1, Naka-fudogaoka, Kakamigahara, Gifu, 504-0838, Japan*