

今週の話題：

＜第7回 WHO 会議における、インフルエンザウイルスの検出と亜型分類のためのポリメラーゼ連鎖反応手順の報告、ジュネーブ、2014年6月＞

## \* インフルエンザの調査、性質決定と診断における RT-PCR の使用：

地球規模のインフルエンザサーベイランス及び応答システム (GISRS) の中で逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) の使用に関するガイドラインを WHO に提供する専門的技術集団として、亜型インフルエンザ A ウイルスを検出するためのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 実施要綱に関する WHO 専門調査委員会が 2007 年に設立された。

インフルエンザ研究 WHO 協力センター (WHO CCs)、WHO H5 基準検査室、必須規制検査室 (ERLs)、国立インフルエンザセンター (NICs)、国連食糧農業機関 (FAO) と OIE/FAO による動物インフルエンザ専門家ネットワーク (OFFLU) の代表者らが 2014 年 6 月 19～20 日、ジュネーブに参集した。参加者は、具体的な進捗状況と以前の会議から行われている活動を報告し、インフルエンザ試薬リソース (IRR) に基づく新しい PCR とその試薬、現在 WHO が推奨している PCR 実施要綱との相違点、品質管理問題と現在の WHO 外部品質評価プログラム (EQAP) の構成に必要なもの、RS ウイルス (RSV) 検出実施要綱、そして PCR 専門調査委員会の機能と経営運営上の手順を評価した。

RT-PCR はインフルエンザウイルス感染の診断、監視の第一選択分析法となっている。したがって、進化を続けるウイルスを検出するためには、この分析法の感度と有用性を維持することはとても重要である。また、推奨された操作方法に対応しようとする研究室の支援も重要である。PCR 専門調査委員会は、特に人獣共通感染症であるインフルエンザ A 型 (H5N1) に関して、GISRS の中で RT-PCR の使用法を助言するために、最初に設立された。グループの活動は、H5 や他の非季節性のインフルエンザ A 亜型の検出やインフルエンザ B との区別、ルーチンにおけるサーベイランスや診断の役割を果たすこと、RT-PCR 精度保証活動を行い、WHO EQAP に基づく助言を行うなど、多岐にわたっている。

## \* OFFLU の活動：

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) ウイルスの継続的な流行発生が認められている。2013 年 1 月から 2014 年 6 月までに、270 件の HPAI ウイルスの流行が世界中で認められ、その多くは、メキシコ、ネパール、大韓民国、ベトナムで発生した。それと同時期に 104 件の低病原性鳥インフルエンザ (LPAI) ウイルスが検出され、それらの多くは中国と南アフリカで発生した。しかし、後者の多くには明白な臨床状態が乏しいため、LPAI ウイルスの発見はいつも偶然である。従って、実際の発生数はもっと多いと考えられている。このことから、動物分野において、警戒を継続することの必要性が強く示唆された。

FFLU 環状包囲試験は農務省の連邦診断施設が用意した検体で行われ、9 つの国際獣疫事務局 (OIE) 基準検査室、国連食糧農業機関 (FAO)、11 の地方や公立の検査室が参加した。FAO/OIE の検査室においては、流行閾値にばらつきはあまり見られなかった。しかし、最も信頼度の高い検査室において多くの偽陽性が確認された。さらに、すべての基準検査室が全亜型を検出できるようになる必要があること、16 種すべてのヘマグルチニンと 9 種のノイラミニダーゼを検出する低密度 RT-PCR が確立され、それに関する論文も投稿されたことが注目された。

## \* VCM 会議に至るまでのウイルスの塩基配列決定 (シーケンス) と分離手段：

年 2 回の VCM 会議の前に WHO CC と検体を共有する時期について議論がなされた。多くの検体が VCM 会議直前に出荷されることを防ぐために、NIC は一定の検体数が揃った時点でサンプルを出荷する。これによって、受取手である WHO CC の負担を減らすことができる。さらに、NICs はインフルエンザのヘマグルチニンの塩基配列を決定し、VCM 会議の準備を効率よく行うために WHO にウイルスとその塩基配列を送ることが奨励された。

## \* EQAP と安全性試験実施関連基準 (GLP) 評価：

2003 年の中国とベトナムにおける HPAI H5N1 株の出現や、家禽による風土性の人獣共通感染症に続いて、「H5 に焦点を当てた PCR によるインフルエンザ A ウイルスを検出するための外部品質評価プログラム」が 2007 年に設立された。2010 年には、このプログラムの対象がインフルエンザ B ウイルスにまで拡大された。2013 年の EQAP の成果では間違った結果の報告と関連した共通の原因を明らかにすることはできなかったが、プライマーとプローブの組み合わせが間違っていた可能性がある。パネルの構成と準備方法を統一しない限り、これらの結果を比較できないこともわかった。一年を通して比較するためには共通のベースラインが必要である。

GLP 調査は 2010 年と 2012 年に行われ、2012 年のパネルの結果は、多くの WHO EQAP 参加者がインフルエンザの分子診断に GLP を採用し、多くの領域で改善されたことを示している。定期的な試薬確認と、プライマー評価はさらに強化が必要であると考えられた。

ヨーロッパで行われた EQA の結果は、全般的に見て分子検出能力が全地域において高いことを示した。インフルエンザ B 型を識別できる検査室が増え、ウイルス単離に関しては、9 ヶ所の検査室が 16 検体を偽陰性としたが、78% の検査室は、すべてのウイルスを単離していた。これは、一部の検査室における

エラーがエラー全体の大半占めていることを示している。今後も2年ごとに分子外部制度評価と環境外部制度評価が計画されている。

世界的な WHO EQAP への改変が議論されている。また世界的な WHO EQAP において、ウイルス単離 EQA パネルの必要性はこれからさらに増大し、議論されるべきである。

**\* 新興感染ウイルスである RSV と GISRS の役割 :**

新興感染ウイルスに対する準備状況や専門知識、ヨーロッパの研究所の必要性を評価するために、プレトレーニングコースアンケートが地域全体に配布され、56 の検査室から回答があった。そのうち半分の検査室が検査室内で RT-PCR を行い、残りの半分は GISRS の非診断用キットを用いていた。さらに、インフルエンザウイルスと違い、RSV やその他の呼吸器疾患には季節性のようなワクチンは必要なく、世界的なウイルスの発生件数や感染状況などの情報が必要とされ、世界レベルでの RSV やその他呼吸器疾患の伝染や発生件数に関する既存のデータを集め、GISRS のインフルエンザ関連の活動に対する干渉を避けるため、専門家と適切に話し合う必要がある。

西ヨーロッパ諸国で行われたアンケートの結果は、69%の検査室が他の病原体について検査し、33%の検査室がインフルエンザ様疾患の場合、他の病原体について検査すると回答した。さらに、調査を受けた国の内、71.4%が他の病原体について集めたデータを報告し、55%の国は複合的な PCR 実施要綱を作製していた。実施には、多大なお金、時間、労働力を考慮する必要がある。

**\* GISRS PCR 実施要綱および試薬 :**

H7 RT-PCR 診断用キットが国立研究所によって開発され、議論の対象となっている。このキットと陽性対照 RNA (H7N9) は、申請があればインドネシア、イラン、モンゴル、ミャンマー、ベトナムの NIC に提供される。インフルエンザ B 遺伝子型決定パネルは現在利用可能であり、また、ヨーロッパ型 HPAI H5N1 インフルエンザを検出するためには、解析の反応性を改善する必要があり、そのために最新版のアジア系インフルエンザ AH5 亜型パネルが用意されている。

米国疾病管理予防センター (CDC) から提供された RT-PCR キットと陽性対照の有効性と、インフルエンザサーベイランスのための CDC 検査室支援ウェブサイトが議論されている。このウェブサイトから研究室は多数の分析方法が入手可能となり、登録した研究所とのコミュニケーションを容易にし、分析法の更新を即座に行うことができるようになる。

**\* 複合的な分析の潜在的有用性と GISRS の次世代シーケンス :**

複合的な分析は、一つの反応で複数の項目を確認することでコストを抑え得る方法として注目されている。

GISRS での次世代シーケンスと、その潜在的有用性が議論されている。現在、この技術は主に研究のために用いられているが、診断にも用いることが可能になるかもしれない。次世代シーケンスでは多くの情報を得ることができる。また、特定のプライマーを必要としないので、新しいインフルエンザウイルスを特定することにも役立つと考えられている。要約すると、次世代シーケンスは有望な技術であるが、ネットワーク上で利用することができるようになる前に、さらに議論を重ね、発展させる必要がある。

**\* 結論 :**

分子技術はインフルエンザウイルス分離、検出において第一選択の方法となっている。しかし、シーケンスによるウイルス分離株の抗原性の認識には種選別が必要である。ウイルス分離技術の衰退に関する懸念は、NIC 調査から結果を分析した後、対処される。

GISRS のおかげで、より良いインフルエンザのサーベイランスデータを得ることができ、他の病原体のサーベイランスの助けとなると考えられる。「PCR 機能に基づいて、GISRS にガイダンスを供給する」という PCR 専門調査委員会の主な役割は未だに残っている。委員会はアドバイスとガイダンスを提供し続け、新しい方法が十分に発展していくかどうか判断するために、これら进行评估し続ける。

GISRS ネットワークの RSV サーベイランスを含めたこれからの役割は、さらなる議論を必要とするので、GISRS は、毎年会合を開き、必要に応じて他の分野からも専門家を招聘して、よりよい技術を開発・発展させることである。

(川本剛士、三木明德、宇賀昭二)