

今週の話題：

<WHO 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 RS ウイルス (RSV) のサーベイランスに関する WHO の非公式会議、スイス、ジュネーブ、2015. 3. 25-27>

*** 要旨：**

RS ウイルス (RSV) は乳幼児の急性下気道感染の原因の第 1 位である。いくつかの新規ワクチンは臨床試験において有望な結果を示している。それゆえに、特に RSV 関連死亡率の一番高い低所得及び中所得国における RSV 疫学及び疾患負担を理解することが重要である。WHO 協力的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) は、季節性および新型のインフルエンザウイルスの抗原性、遺伝学的特性と同様に、インフルエンザウイルスの地球規模の疫学を絶え間なく監視している。多くの GISRS 研究室は既にサーベイランスプログラムにおいて RSV と他の呼吸器病原体の研究を行っている。

協力戦略を計画するために、系統的で地球規模の RSV サーベイランスと WHO 地球規模のインフルエンザプログラムはスイスのジュネーブで 2015 年 3 月 25 日から 27 日まで学術公衆衛生からの代表者たちと非公式会議を開催した。この会議は感染の臨床症状、RSV 疫学、疾患の負担、発展中及び臨床試験のワクチンといくつかの国で設置されている RSV サーベイランスについての専門家の発表を含めた。作業グループは可能的な症例定義、サンプリング戦略、検査室試験の技術方面とサーベイランスデータの報告と分析を検討した。

RSV サーベイランスの主な目的は世界各地の RSV 疫学の季節性について情報を提供し、地理上の区域と人口集団の RSV 感染により引き起こされた疾患負担を明らかにすることである。生後一年間、RSV は最も日常的で重症急性呼吸器疾患の一つを引き起こす。そして、生後 6 週間、重症 RSV 感染の 1/3 までは発見される。多くの重症感染の発生時の若い年齢は多くの監視用インフルエンザサーベイランスシステムの潜在的な利用を制限する。インフルエンザ疾患の発生が生活の中で一般的に遅いので、若い子供達はこのシステムの中で実際より少なく示されている。

半数以上の RSV 感染の子供は発熱を示さないため、インフルエンザサーベイランスに利用されるインフルエンザ様疾患の症例定義は多くの RSV 感染を逃す可能性がある。従って、発熱を必要としない症例定義はさらに多くの RSV 感染幼児を検出できるだろう。

インフルエンザウイルスの検出のために収集された臨床サンプルは RSV の検出にも適する。鼻咽頭吸引物と鼻腔洗浄は若い子供たちにとって、一番望ましい検体であろう。多くの GISRS 検査室はインフルエンザウイルスの検出のための実時間ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術を使用する。そして、このような検定プロトコルは RSV にも適用可能である。若い子供のサンプルを検査する時、免疫蛍光の技術による RSV の検出も十分な感受性を提供する。しかし、年上の子供、青年と成人たちにとって、この技術は PCR より明らかに劣っている。

WHO 地球規模のインフルエンザプログラムにより整備された FluNet インフルエンザ報告システムは容易に RSV データを結合するのに適応できる。

以下の結論は会議で達成された。

(1) 標準化の RSV サーベイランスシステムを構築するのは可能であり、現在のインフルエンザサーベイランスシステムは一番実践的なプラットフォームである。このサーベイランスは各地域的地域の RSV 感染症の季節性に有用な情報と相関のウイルス学的な情報を提供する。

(2) RSV に引き起こされた疾患負担を深く理解するために、日常サーベイランス以外の特別な研究は要求される。標準サンプリングと検査プロトコルは評価されて RSV サーベイランスに参加できる検査室と機関に利用できる。

(3) RSV 診断とサーベイランスでの豊富な経験を持っている機関は RSV のために参考の検査室として役立つ。理想的に、これらの機関は RSV サーベイランスに参加する検査室に検定プロトコル、試薬や検査キットを提供する能力を持つべきである。

(4) WHO 地球規模のインフルエンザプログラムは RSV サーベイランスの様々な方面と推定の疾患負担に関するアドバイスを提供する一群の専門家を集める。

<ポリメラーゼ連鎖反応による A 型インフルエンザウイルスの亜型の検出：WHO 外部質的評価プログラムの要約の分析、2015 年>

*** 緒言：**

地球規模のインフルエンザサーベイランスは半世紀以上にわたり GISRS により行われてきた。現在、WHO に国立インフルエンザセンター (NICs) として認められた 113WHO 加盟国には 143 機関がある。検査室のネットワークも 6 つの WHO 協力センター、4 つの必須規制検査室、そして出現した特定の問題に対処するために設立された臨時のグループから構成される。

非季節性インフルエンザウイルスの継続的進化と流行の潜在性により、適時なサーベイランスと強固な研究診断は必要不可欠である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により A 型インフルエンザウイルスの亜型の検出のための WHO 外部品質評価プログラム（EQAP）は定期的分子診断とサーベイランスに参加する検査室のパフォーマンスの品質と比較可能性を監視することを目的として 2007 年に開始された。EQAP は A 型インフルエンザ（H5N1）から季節性 A 型インフルエンザ、B 型インフルエンザとヒトへの感染が報告されているその他の非季節性 A 型インフルエンザウイルスまで範囲が拡大された。パネル 1 から 13（2007～2014 年）にかけて参加した検査室における評価結果の要約は疫学週報（WER）にて報告されている。

2015 年においては、WHO 地球規模インフルエンザプログラムの協力のもとで、そのプロジェクトは継続した。なおこのプロジェクトは、WHO H5 基準検査室と中国の香港特別行政区（SAR）の健康保護センター保健学部門にある国立インフルエンザセンターにより、WHO 地域オフィスの支援の下実施されたものである。

このプログラムでは現在、年に 1 回検査のためにサンプルを送送している。このレポートは 2015 年に参加検査室に送付されたパネル 14 の検査結果を要約したものである。任意の基準に基づいて、A 型インフルエンザ 09 ウイルスを検出するため、表現型／遺伝型ノイラミニダーゼ抑制剤（NAI）感受性テストも行われた。

*** パネル 14 の準備：**

真空乾燥させた Triton X-100 により不活性化したインフルエンザウイルスを参加した検査室に送付した。ウイルスは Madin-Darby canine kidney（MDCK）の細胞中で増殖され、Triton X-100 により不活性化され、その後以前 WER にて示した方法にて準備を行った。

*** パネル 14 の構成：**

パネル 14 は、異なるインフルエンザウイルス濃度を持つ、記号化された 10 個のサンプルからなり、それらには遺伝的クレード 2.2.1 と 2.3.2.1 の A 型インフルエンザ（H5N1）、A 型インフルエンザ（H1N1）pdm09 野生型ウイルスとノイラミニダーゼの中で H275Y アミノ酸置換を有するウイルス、A 型インフルエンザ（H3N2）ウイルス、A 型インフルエンザ（H7N9）ウイルス、B 型インフルエンザウイルス（ビクトリア系統）がある。インフルエンザウイルスを有さないサンプルもこのパネルには含まれている。表現型／遺伝型ノイラミニダーゼ抑制剤（NAI）感受性テストのために指定された 2 つの A 型インフルエンザ（H1N1）pdm09 サンプルは要求に応じて含められた。詳細なパネルの構成は表 1a と表 1b に示した。参加検査室は、それぞれのサンプルを検査のために PCR 用精製水にて溶解するように指示される。EQAP サンプルに用いる検出方法や標的遺伝子が書かれた質問紙も含まれている。

表 1a: インフルエンザウイルスを検出するための WHO 外部品質評価プログラムのパネルの構成とパネル 14 の評価結果（WER 参照）

表 1b: 任意の表現型／遺伝型ノイラミニダーゼ抑制剤（NAI）感受性テストのための A 型インフルエンザ（H1N1）pdm09 サンプルの詳細（WER 参照）

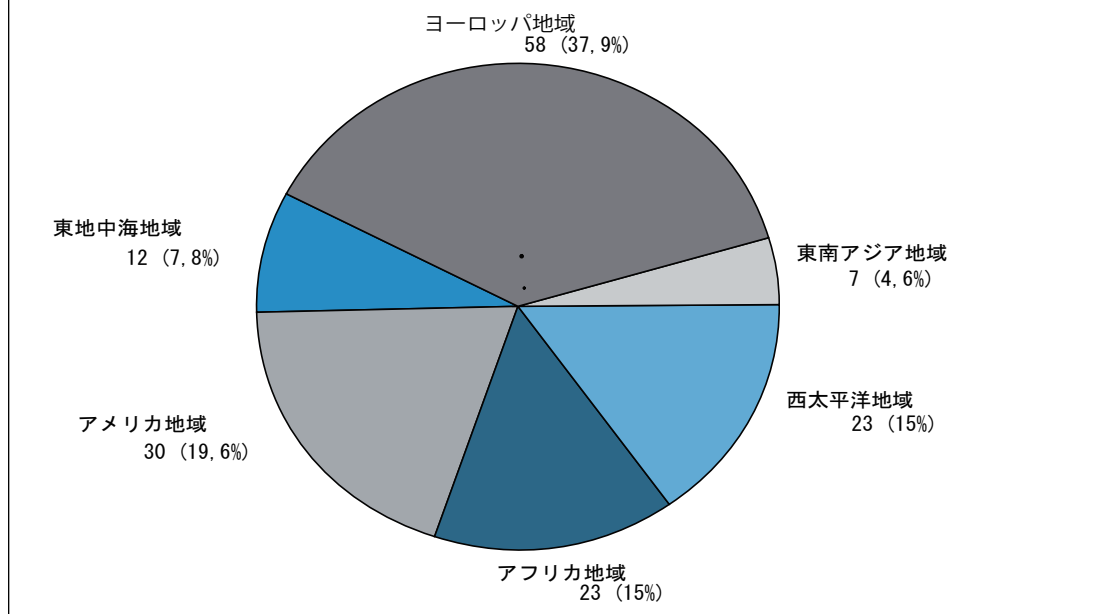
*** パネルの配布と参加検査室の反応：**

NICs と他の国立インフルエンザ検査室は、パネルが送付される前に参加申請を受ける。パネル 14 は 2015 年 4 月～6 月の間に、香港 SAR から、以前 WER で報告した 6 つの WHO 地域の 137 カ国にある 174 の参加検査室へ、宅急便により常温で配達された。参加検査室は、サンプルを受けた日から 4 週間以内に検査結果を報告するように要求された。パネルを受け取った 174 の参加検査室の中で、123/174 (70.7%) の検査室が発送後 1 週間以内にサンプルを受け取り、153/174 (87.9%) の検査室が期限内に評価結果を報告した。WHO 地域ごとのパネル 14 を受け取った検査室数は図 1 に示した。

*** 検出方法：**

以前の WER で示したパネルにおいては、インフルエンザウイルス {A 型、B 型、A 型（H1N1）pdm09、A 型（H3）、A 型（H5）、A 型（H7）} を検出するために様々な PCR のプロトコルとテスト戦略が参加検査室により用いられてきた。半数以上の参加検査室が米国疾病管理予防センター（CDC）の方法を用いていた。異なる PCR プロトコルを用いた検査をしても、明確な違いは生じない。検査に用いた標的遺伝子、検出方法、プライマー／プローブと酵素のソースの詳細は要約報告に含まれており、それらはすべての参加検査室に配布された。

図1：A型及びB型インフルエンザウイルス検出のためのWHO外部質的評価プログラムに検査結果を報告した異なるWHO地域ごとの参加検査室数パネル14（2015）



*** 検査室の成績：**

指定された期限内に返答のあった 153 の検査室からの検査結果のみを解析に含めた。パネル 1-13 と同じ評価基準に基づき、125/153 (81.7%) の参加検査室が 10 個全てのサンプルに対し正しい検査結果で返答しており、136 (88.9%) の検査室が 4 つ全ての A 型 (H5) インフルエンザを正しく見極めていた。

2 つの異なる A 型 (H5N1) インフルエンザウイルスが含まれた。一つ目は、トリ A 型 (H5) インフルエンザウイルスクレード 2.2.1 (V03-2015 と V09-2015 で濃度が異なる) である。正確な検出率はそれぞれ、150/153 (98.0%) と 149/153 (97.4%) であった。二つ目は、ヒト A 型 (H5) インフルエンザウイルスクレード 2.3.2.1 (V02-2015 と V05-2015 で濃度が異なる) である。正確な検出率はそれぞれ、144/153 (94.1%) と 149/153 (97.4%) であった。

A 型 (H1N1) pdm インフルエンザサンプルに関して、V01-2015 と V07-2015 の正確な検出率は、それぞれ、151/153 (98.7%) と 148/153 (96.7%) であった。A 型 (H3N2) インフルエンザサンプル (V08-2015) と B 型インフルエンザビクトリア系統のサンプル (V06-2015) に関して、148/156 (96.7%) と 150/153 (98.0%) の検査室が正しい結果を示した。

A 型 (H7N9) インフルエンザサンプル (V10-2015) の正確な検出率は 141/153 (92.2%) であった。このサンプルは正確に A 型 (H7) (n=107) インフルエンザ、A 型 (H7N9) (n=20) インフルエンザや分類不可能な A 型インフルエンザ (n=14) と報告された。3 つの参加検査室は陰性のサンプル (V04-2015) に対し、陽性の結果を示している。偽陽性率は 2.0% であった (表 1a)。

このパネルの中で、28/153 (18.3%) の参加検査室は不正確な結果を示した。15/153 (9.8%) の参加検査室は 1 つの不正確な結果を、13/153 (8.5%) の参加検査室は 1 つ以上の不正確な結果を返答してきた (表 2)。その詳細は表 3 に示した。

表 2：外部質的評価プログラムにおけるパネル 14 (2015) での参加検査室の成績 (WER 参照)

表 3：外部質的評価プログラムにおけるパネル 14 (2015) での参加検査室により報告した不正確な評価結果の詳細 (WER 参照)

*** 表現型/遺伝型ノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) の感受性試験：**

NAI01-2015 (オセルタミビルによるノイラミニダーゼ阻害の減少と関連がある) と NAI02-2015 (野生タイプ) とそれぞれ呼ばれる A 型 (H1N1) pdm09 インフルエンザサンプルは NAI 感受性試験に含まれた。38/153 (24.8%) の参加検査室は NAI 結果を報告した。この中では、33 と 24 の参加検査室はそれぞれ遺伝型と表現型試験の評価結果を返答し、19 の参加検査室はこの 2 つの試験を評価した。

遺伝型試験では、33 の参加検査室は H275Y アミノ酸置換と関連のある NA 遺伝子におけるヌクレオチドの変化 (G823T) をもつオセルタミビルによるノイラミニダーゼ阻害の減少と関連のある NAI01-2015 を報告した。3 つの参加検査室もペラミビルによる阻害剤の減少を報告した。NAI02-2015 に対し、31/33 (93.9%) の参加検査室は野生型の A 型 (H1N1) インフルエンザ pdm09 を報告しており、そのうち 2 つ (6.1%) の参加検査室はオセルタミビルによるノイラミニダーゼ阻害の減少をもつ野生型ウイルス

と突然変異のウイルスを混合したものを報告した。

これらの 33 の参加検査室において、様々な方法は用いられており、一般的な方法論はリアルタイム RT-PCR による対立遺伝子の識別 (21, 63.6%)、サンガー配列決定技法 (12, 36.4%)、パイロシーケンス法 (4, 12.1%)、そして融解曲線分析 (1, 3.0%) を含んでいた。サンガー配列決定法を用いている 5 つの参加検査室は、1 つ以上の方法を用いていると報告した。

表現型試験では、24 の参加検査室は正確な評価結果を報告した。NAI01-2015 に対し、23 の参加検査室はオセルタミビルによる阻害の減少を報告しており、残りの 1 つの参加検査室は阻害剤の減少を報告した。NAI02-2015 に対し、24 の参加検査室は正確にオセルタミビルによる通常の阻害を報告した。全てのサンプルはザナミビルによる通常の阻害を示した。24 の参加検査室の中では、19 の参加検査室もザナミビルの結果を報告しており、そして、全ての結果は正確であった。主な 2 つの方法論は表現型試験のために用いられた。それは化学発光に基づいた NA-Star 分析と蛍光に基づいた MUNANA 分析であった。この 2 つの方法により獲得された IC50 評価は表 4 に要約されている。

表 4 : 表現型ノイラミニダーゼ阻害剤の感受性試験により獲得された IC50 評価 (WER 参照)

* 考察 :

EQAP に参加している検査室の数は、2010 年のパネル 8 以来かなり安定している (図 2)。これらのパネルにおいて、スコアを見ると、全てのサンプル及び A 型 (H5) インフルエンザの平均正答率はそれぞれ 80% と 88% であり、比較するとパネル 14 においては 82% と 89% であった。

図 2 : A 型及び B 型インフルエンザウイルス検出のための WHO 外部質的評価プログラム参加検査室数
パネル 1-14, 2007-2015 (WER 参照)

このパネルにおいて A 型 (H5N1) インフルエンザ遺伝的クレード 2.2.1 (299/306=97.7%) と 2.3.2.1 (286/306=93.5%) の亜型成績は良かった。異なる参加検査室は同じな亜型 H5 の Ct 評価に基づいた異なる解釈 (A (H5) インフルエンザ或は分類不可能な A 型インフルエンザ) を報告したと指摘された。これは、解釈のための異なるカットオフ Ct 評価の採用であったし、このパネルにおいて 2 つの参加検査室は H5 の偽陰性の結果を報告したことなのであった。カットオフに接近する高い Ct 評価のサンプルについての重複な試験や代替的確認試験は考慮されるべきである。

季節性インフルエンザウイルスの検出正答率に比べると、A 型 (H7N9) インフルエンザサンプルの検出正答率はパネル 13 の 135/156 (86.5%) からパネル 14 の 141/153 (92.2%) に増加した。H7 試験を操作する参加検査室の数もパネル 14 の 136/153 (88.9%) からパネル 13 の 114/156 (73.1%) に増加した。この改善は A 型 (H7) インフルエンザウイルスの検出のためのもっと良い準備を反映した。これはヒト感染において継続して報告された。H7 試験を操作しているにもかかわらず、陰性の結果を報告した 6 つの参加検査室に対して、明らかな原因は認識されていなかった。そのうち、2 つの参加検査室は連続してサンプルを試験するのが 2 回であったと報告した。そして、重複な高い Ct 評価の獲得にもかかわらず、1 つの参加検査室は一つの陰性結果を報告した。

パネル 13 の 3.8% (6/156) に比べると、パネル 14 の偽陽性率は 2.0% (3/153) に下がった。しかしながら、サンプル交換、転写エラーとコントロールの非連続利用は良い検査室の実践の重要性を強調していたと指摘された。その上、ウイルスの継続的進化という観点でみると、検査方法の感受性を保証するための定期的な評価、更なる特徴づけのために WHO CC に送った分類不可能な A 型インフルエンザサンプル/分離株は強く推奨される。

パネル 14 において、表現型と遺伝型 NAI 感受性試験は任意の基準に基づいて行われた。オセルタミビル (NAI01-2015) によるノイラミニダーゼ阻害の減少と関連のある NA H275Y 置換をもつ A 型 (H1N1) インフルエンザ pdm09 サンプルと野生型ウイルス (NAI02-2015) は含められた。通常、この成績は良かった。2 つの参加検査室の報告した遺伝型試験による野生型と NA H275Y 突然変異のウイルスを混合した NAI02-2015 に対して、サンガー配列決定技法とリアルタイム RT-PCR による対立遺伝子の識別の利用は報告された。高いウイルス負荷をもつサンプルにより、この不正確な結果となった。サンガー配列決定技法を用いたもう 2 つの参加検査室は NAI02-2015 のための遺伝子型の結果を提供していなかった。これは不活性化サンプルのための易感染性の分析感度に関連しているかもしれない。短い単位複製配列を持つ代替的プロトコルは成功的であるかもしれない。

表現型の解釈についての報告は全てが正確であった。参加検査室の中で、オセルタミビルの NAI01-2015 のための IC50 評価は基質とプロトコルの試験での違いにより変化した。しかしながら、感受性の低下 (NAI01-2015) のウイルスと感受性のウイルス (NAI02-2015) の間の IC50 評価に比べると、すべての参加検査室のための観察された評価の差異は 100 倍以上であった。これは WHO 基準に適して、NAI01-2015 はオセルタミビルによる阻害の減少と関連があると示した。オセルタミビルによる阻害の減少をもつ NAI01-2015 を報告した参加検査室はこの採用された解釈基準を報告しなかった。

パネル 12 とパネル 13 と同様に、25% の参加検査室はパネル 14 における NAI 感受性の結果を報告した。NAI サンプルを要求しなかった 3 つの参加検査室は A 型 (H1N1) インフルエンザ pdm09 サンプル

V01-2015 と V07-2015 における正確な遺伝子 NAI 結果を報告した。試験結果が成績分析に含められることを保証するために、参加検査室は将来の感受性試験への参加の確認と適切なサンプルへの要求が求められている。一方では、約 15%の参加検査室はパネル 14 で開始された NAI 感受性試験の結果を返答した。この中には、順位をつけると、まず、ヨーロッパ地域 (n=15)、西太平洋地域 (n=4)、アメリカ地域 (n=3)、次は、東南アジア地域 (n=2) であった。この範囲と良い結果は方法論がある検査室でよく設立されたと示した。抗ウイルス感受性サーベイランスの重要性の観点を見ると、更なる地球規模的基準の能力への増強は有利になろう。WHO EQAP はこのプログラムを発展させることを継続して、スコアシステムを実行することと考えている。

(耿小萍、中山貴美子、入子英幸)