

今週の話題：

<ポリメラーゼ連鎖反応法を用いた A 型インフルエンザ亜型検出の WHO 外部精度評価プロジェクト (2007-2008 年) >

* 緒言：

WHO 世界インフルエンザ監視ネットワークと WHO の世界インフルエンザ計画の中核は 50 年以上に渡って、各国の国立インフルエンザセンター (NICs) であった。NICs は標本を集め、初期分析を行い、ウイルス分離標本を WHO 共同センターに迅速に送る。これに用いられる試験は、主にウイルス分離と赤血球凝集抑制テスト (HI テスト) である。

2004 年初旬に鳥インフルエンザ A (H5N1 型) の継続的な存在によって、診断の正確性と効率性の向上のためにポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR 法) を分析手法として導入する必要性が高まった。PCR 法は H5 型の感染を特定するための基本的診断法であり、患者管理、集団発生の対応、インフルエンザ・パンデミーへの準備を容易にする。

NICs の多くは 2006 年以前に PCR 法を用い始めていたが、その精度や比較可能性を測定する国際的に調整した外部精度評価プログラムは存在しなかった。このプログラムは世界の研究所における鳥と各季節の両方のインフルエンザ診断能力を向上させ、PCR 法を用いた A 型インフルエンザ亜型診断の精度と標準を調査する目的で行われた。

WHO 本部の世界インフルエンザ計画の調整により、国立インフルエンザセンター、香港の Centre for Health Protection が WHO 共同センター、参照研究所、WHO 地域事務所と協力してプログラムを行った。

本報告は 2007-2008 年の 2 年間に 4 つの標本パネルを分析した結果を要約したものである。

* 標本パネルの準備：

A (H1N1) 型、A (H3N2) 型、A (H5N1) 型のインフルエンザウイルスから抽出し、真空乾燥した RNA 標本を各研究所に送った。発送前に標本パネルは香港の 7 つの研究所において標本の質と均一性を検査した。標本の保管と環境温度の影響を評価するために、簡易 PCR 試験とリアルタイム PCR 試験を行った後に、7 日間 37°C で保管した。標本サンプルは合成 RNA 標本を用いたリアルタイム PCR 法によって定量化した。

* 標本パネルの構成：

4 つの標本パネルは 5 つの異なるクレードの A (H5N1) 型、A (H1N1 型)、A (H3N2 型) ウイルスの RNA 配列標本、さらにウイルスが含まれていない標本も含まれていた (表 1 参照)。各研究所は検査前に、指示に従いバッファーとパネルを再融解するように指導された。さらに、質問紙に特定方法の詳細、標的遺伝子試験、プライマーとプローブシーケンスの詳細を記載させた。表 1：外部精度評価に対するインフルエンザ標本パネルの概要研究全体の分析結果、2007-2008 年 (WER 参照)

* 標本パネルの配布・返答の状況：

パネルの配布前に、各国の NICs や国立インフルエンザ研究所に調査への参加を呼びかけた。パネル 1 は 2007 年 2-3 月、パネル 2 は 2007 年 8-10 月、パネル 3 は 2008 年 1-2 月、パネル 4 は 2008 年 6-7 月にそれぞれ配布した。パネルは全て香港の Centre for Health Protection から WHO の 6 地域に冷蔵輸送した。

参加研究所はパネルの到着後、1 カ月以内に結果を報告するように指示された。各研究所はプログラム実施側のみが内容を知る参加者識別コードを割り当てられた。

パネル 1 の結果は、54 の国と地域の 64 研究所から得られた。パネル 2 は 66 の国と地域の 83 研究所から、パネル 3 は 77 の国と地域の 95 研究所から、パネル 4 は 83 の国と地域の 109 研究所から得られた。結果の詳細は表 2、3 に示す。1 週間以内に返答のあった研究所の割合は、パネル 1：81%、パネル 2：87%、パネル 3：86%、パネル 4：85% だった。4 つのパネル全てで、研究所の参加が最も多かったのはヨーロッパ地域で 47%、9% がアフリカ地域、15% がアメリカ地域、5% が東地中海地域、5% が東南アジア地域、19% が西太平洋地域であった。

表 2：インフルエンザウイルス検出の外部精度評価における研究への呼びかけと返答の結果、2007-2008 年、表 3：外部精度評価のインフルエンザウイルス標本パネルの診断精度の分析結果、2007-2008 年 (WER 参照)

* 結果：

各パネルの締切以前に返信されたすべての結果を解析し、各研究所の詳細なレポートを初期レポートの提出から 1 か月以内に返信した。

この評価には各標的遺伝子試験の定性的な結果 (陽性か陰性) が必要であった。定量的結果 (複製濃度、域値) は参考資料としてのみ用いた。各研究所の能力は、正確な結果の数の和によって算出した。研究所の結果を評価するには、以下の基準を用いた。

1. H5 標本の特定に失敗した、あるいは H5 亜型標本ではないものを報告したものを誤った回答とする。
2. H1 標本の特定に失敗した、あるいは H1 亜型標本ではないものを報告したものを誤った回答とする。
3. H3 標本の特定に失敗した、あるいは H3 亜型標本ではないものを報告したものを誤った回答とする。

4. H1/H3 亜型分類が実施されず、H1/H3 標本のインフルエンザ A 型試験の正しい結果報告に失敗した場合、誤った回答とする。
5. ウイルス性の RNA が不在の標本サンプルに対して陽性報告をしたものを誤った回答とする。
- * 各研究所の結果：
- ・パネル 1：

43 研究所が 10 サンプル全てにおいて正確な結果を報告した（表 3）。他の 6 研究所が 9 サンプル、9 研究所が 5-8 サンプル、6 研究所が 4 サンプル以下において正確な結果を得た。

2 つの陰性サンプル（2007-5、2007-10）に対しては、9 研究所が陽性と報告した。偽陽性率は、それぞれ 8%、6%だった（表 1）。

強陽性の H5 型サンプル 3 種（2007-1、2007-6、2007-3）に対して正確な結果を報告した研究所数はそれぞれ 56（88%）、58（91%）、57（89%）であった。あまり陽性の強くない H5 型サンプル 3 種（2007-7、2007-2、2007-9）に対しては正確な報告数がそれぞれ 53（83%）、55（86%）、53（83%）であった。

H1 型、H3 型サンプル 1 種ずつに対して正確な報告をした研究所数はともに 57（89%）であった。
 - ・パネル 2：

54 研究所が 14 サンプル全てにおいて正確な結果を報告した（表 3）。他の 14 研究所が 13 サンプル、12 研究所が 8-12 サンプル、3 研究所が 7 サンプル以下において正確な結果を得た。

4 つの陰性サンプル（2007-15、2007-18、2007-21、2007-24）に対しては、5 研究所が陽性と報告した。偽陽性率は、それぞれ 2%、4%、4%、1%であった（表 1）。

強陽性の H5 型サンプル 4 種（2007-11、2007-22、2007-23、2007-16）に対して正確な結果を報告した研究所数はそれぞれ 79（95%）、77（93%）、80（96%）、79（95%）であった。濃度の低い H5 型サンプル 4 種（2007-19、2007-12、2007-14、2007-20）に対して正確な報告をした研究所数はそれぞれ 76（92%）、76（92%）、77（93%）、75（90%）であった。

H1 型、H3 型サンプル 1 つずつに対して、正確な報告をした研究所数はそれぞれ 74（89%）、73（88%）であった。
 - ・パネル 3：

70 研究所が 10 サンプル全てにおいて正確な結果を報告した（表 3）。他の 10 研究所が 9 サンプル、11 研究所が 6-8 サンプル、4 研究所が 5 サンプル以下において正確な結果を得た。

2 つの陰性サンプル（2008-04、2008-08）に対しては、2 研究所が陽性と報告した。偽陽性率は、それぞれ 1%、2%だった（表 1）。

H5 型サンプル 4 種（2008-05、2008-01、2008-02、2008-03）に対して正確な結果を報告した研究所数はそれぞれ 85（89%）、88（93%）、90（95%）、89（94%）であった。複製の H5 型サンプル 2 つ（2008-07、2008-09）に対して正確な報告をした研究所数はともに 89（94%）であった。

H1 型、H3 型サンプル 1 種ずつに対して、正確な報告をした研究所数はそれぞれ 83（87%）、84（88%）であった。
 - ・パネル 4：

84 研究所が 10 サンプル全てにおいて正確な結果を報告した（表 3）。他に 11 研究所が 9 サンプル、10 研究所が 6-8 サンプル、4 研究所が 5 サンプル以下で正確な結果を得た。

2 つの陰性サンプル（2008-19、2008-20）に対しては、6 研究所が陽性と報告した。疑陽性率は、それぞれ 5%、2%だった（表 1）。強陽性の H5 型サンプル 4 種（2008-11、2008-13、2008-15、2008-17）に対して正確な結果を報告した研究所数はそれぞれ 104（95%）、105（96%）、104（95%）、105（96%）であった。クレード 2.3.2 の濃度の異なるサンプル（2008-16、2008-12）に対しては正確な報告をした研究所数はそれぞれ 104（95%）、103（94%）であった。

H1 型、H3 型サンプル 1 種ずつに対して正確な報告をした研究所数はそれぞれ 93（85%）、96（88%）であった。
- * 特定法
- A 型インフルエンザウイルスの診断に最も頻繁に使用された標的遺伝子は M 遺伝子であった。パネル 2、3、4 では、ほぼ全ての研究所が H5 亜型を使用した。A 型インフルエンザウイルス亜型の標的遺伝子には、8 割以上の研究所が H1 と H3 を使用した。H7 は 2-13%、H9 は 1-6%、N1 は 24-37%、N2 は 14-28%の研究所で使用された。
- パネル 2、3 では、A/M と H5 遺伝子に対して、リアルタイム PCR 法が最もよく使用され、H1 と H3 遺伝子に対しては従来の PCR 法が最もよく使用された。パネル 4 では、A/M、H5、H1、H3 遺伝子に対してリアルタイム PCR 法が最もよく使用された。
- * 全体の結果の比較：
- 2007 年から 2 年間に、正確な結果を報告した研究所の割合は、全体で 65%から 77%に増加し、H5 遺伝子亜型特定での誤報告率は、23%から 12%に減少し、偽陽性率は 14%から 6%に減少した（表 4）。

陰性サンプルに対する偽陽性率は、パネル 2 から 4 まで 10%以下に維持され、全体で 3.7%であった。偽陽性結果は、A 型インフルエンザウイルス H5 遺伝子亜型の特定の際に最もよく報告された (表 5)。

表 4：参加研究所の結果の誤報告率、インフルエンザサンプル分析外部精度評価 (2007-2008 年)、表 5：参加研究所の結果の偽陽性率、インフルエンザサンプル分析外部精度評価 (2007-2008 年) (WER 参照)

正確な報告が 90%以上の研究所を “good”、90%以下を “less good” と分類し、全体の結果を評価したところ、less good の割合は 23%から 13%に減少した (表 3)。

1 回以上 less good と分類された 44 研究所の中で、調査に 2 回以上参加した 36 研究所を、結果の成績によって 3 グループに分類した。その結果、22 研究所がパネルを通じて結果の改善 (less good から good) を示す “improved performer” に、12 研究所が正確性の低下 (good から less good) を示す “fluctuating performer” に、2 研究所がパネルを通じて (less good) で変化がない “persistently poor performer” に分類された。このことから less good の割合の減少は、初期のパネルで less good に分類された研究所の成績改善によるものと考えられた。

同濃度のサンプル結果を比較したとき、H5 遺伝子亜型特定における改善は明白であったが、H1 と H3 遺伝子亜型には、まだ改善の余地があった (表 1)。

4 つのパネル全てにおいて正確な結果を報告した研究所の割合は、ヨーロッパ地域で 70%以上であったが、アフリカと東地中海地域では 70%以下であった (図 1)。アメリカと東南アジア地域のパネル 2、アフリカ地域のパネル 3、4 で観察された結果の落ち込みは、初めて参加した研究所が多かったためである (表 6)。

図 1：正確な結果を報告した参加研究所の割合、インフルエンザサンプル分析外部精度評価 (2007-2008 年)

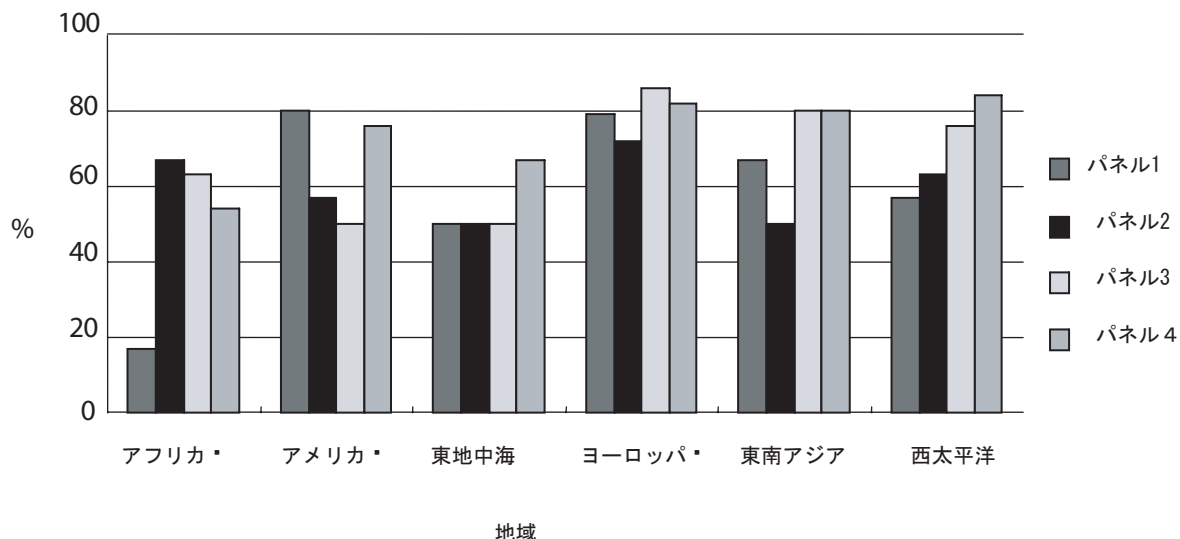


表 6：パネル 2、3、4 で初めてインフルエンザ標本分析に参加した研究所の数、2007-2008 年 (WER 参照)

* 結果に影響を及ぼす要因：

パネル 2、3 において、H5 遺伝子の特定にリアルタイム PCR 法を 1 回以上使用した研究所は、従来の PCR 法のみを行った研究所よりも全体の結果がよかった (パネル 2, $P=0.002$; パネル 3, $P=0.006$) (表 7)。表 7：H5 遺伝子特定の結果に影響を与える要因 (WER 参照)

* 考察：

外部精度評価は研究所の責任者と連絡をとりながら行われ、輸入許可を得て輸送問題を解決して行った (表 8)。評価期間内の一貫した研究所数の増加は、A 型インフルエンザの特定に PCR 法が適用され、全世界のインフルエンザ研究所の診断能力が改善したことを反映している。

表 8：研究所にパネルが受領されなかった理由、インフルエンザ分析外部精度評価 (2007-2008 年) (WER 参照)

パネル 1 の目的は、異なる濃度と型の H5 ウイルスの判別結果を評価することであった。パネル 1 では偽陽性増幅が問題として考えられたため、パネル 2 では 4 つの陰性サンプルを追加し、研究所での汚染の可能性を評価した。研究所からのフィードバックと偽陽性率の低下から、パネル 3 では陰性サンプル数を減らした。パネル 3 と 4 ではサンプルの構成と濃度を統一し、パネル間再現性を評価した。

使用方法による結果の違いでは、リアルタイム PCR 法の使用は、パネル 2、3 ではよい結果を示したが、パネル 4 では示さなかった。この違いの原因として、パネル 4 での東南アジアと西太平洋地域における従来の PCR 法による H5 亜型特定結果の改善が考えられる。

NICs や国立インフルエンザ研究所は、研究所の検査成績を継続的に監視するために、外部精度評価への参加を推奨している。参加を通じて、高いクオリティのインフルエンザ診断技術が世界的に確立さ

れ、維持・改善されることが期待される。

*編集ノート：

本研究の全データは、世界インフルエンザ監視ネットワークの活動計画とその必要性の評価基盤として活用される。本研究に参加した全てのNICsとインフルエンザ研究所にWHOから感謝の意を表す。

詳細な情報が必要な際の連絡先：WHO 世界インフルエンザ計画、ジュネーブ、スイス (e-mail: GISN@who.int)

流行ニュースの続報：

<インフルエンザ>

ヒトの鳥インフルエンザ感染に関する情報は、

http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/en/index.html で利用可能である。

第 41-42 週目の世界のインフルエンザの活動性は、南半球では引き続き低下し、他地域では低度のみであった。

香港：A(H3)型とA(H1)型の活動性の低下（H3型優勢）が報告され、一体のB/Victoria系統ウイルスも検出された。

第 41-42 週目に散発的な流行が以下の国で見られた：チリ(B)、ロシア連邦(H1、H3、B)、英国(H1、H3)、アメリカ合衆国(A、B)。

その他の国では流行は報告されていない。

(小松稔、牧浦大祐、平田総一郎、宇佐美眞)