

今週の話題：

<ポリメラーゼ連鎖反応を用いて A 型インフルエンザウイルスの亜型を検出する WHO 外部精度評価プロジェクト (2009) >

* 緒言：

各国のインフルエンザセンター (NICs) は 50 年以上にわたって、WHO 世界インフルエンザ監視ネットワークを支えてきた。NICs は検体を集め、初期分析して、代表的な分離ウイルスを WHO 共同センターへ遅れることなく送り、来期の季節性インフルエンザワクチン組成の勧告をサポートする。また、世界的流行の危険性があるウイルスを検出し、集団発生や世界的流行に対応しやすくしている。

ここ 10 年間、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、2004 年の鳥インフルエンザ A (H5N1) ウイルスやパンデミックインフルエンザ A (H1N1) 2009 ウイルスのような新興ウイルスを検出するための主要な実験室内検査法となってきた。

研究所における季節性インフルエンザ・鳥インフルエンザ A (H5N1) の診断精度を比較するため、2007 年に WHO 外部精度評価プロジェクトが始まった。すでに、最初の 4 つのインフルエンザ検体パネル (2007-2008 に送付された) の検査に参加した研究所の成績は集約され、公表された。

同プロジェクトは 2009 年も引き続いて、WHO 世界インフルエンザ計画のもと、香港特別行政区の健康保護センター (Centre for Health Protection) にある H5 参照研究所や国立インフルエンザセンターにおいて、インフルエンザ共同センターや他の H5 参照研究所及び地域事務所の協力のもとに行われた。

パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスが 2009 年 3 月下旬にメキシコで発生したため、2007-2009 年に送付された最初の 5 つのパネルに加え、パンデミックウイルスを含むパネル 6 を設けた。このパネルに含まれる他のウイルスは、A (H1N1)、A (H3N2) 及び A (H5N1) であった。季節性インフルエンザ A (H1N1) ウイルスと区別するために、パンデミックウイルスはパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスと称した。この報告では、2009 年 1 月から 2 月及び 6 月から 8 月に送付された、それぞれパネル 5、6 に対する精度評価の結果を要約する。

* パネルの準備：

研究所に送付されたパネルは、インフルエンザ A (H1N1、H3N2、H5N1) ウイルス及びパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスから抽出し真空乾燥した RNA 検体から構成された。作製法は以前と同様である。

* パネルの構成：

パネル 1-4 と同様に、パネル 5 と 6 も、5 種類のウイルスから抽出された異なる濃度の RNA から構成された (詳細は表 1)。調査表で、使用した検出方法や標的遺伝子、さらにプライマーやプローブの塩基配列に関する情報を得た。

表 1: A 型インフルエンザウイルスの亜型を検出した研究所の外部精度評価 (2009 年) の結果 (WER 参照)

* パネルの配布と参加者の回答：

各国の NICs や他の登録された国立インフルエンザ研究所に評価プロジェクトへの参加を要請した後、パネル 5 及び 6 は、周囲温度で (冷蔵や冷凍することなく)、香港の健康保護センターにある H5 型参照研究所と国立インフルエンザセンターから全 WHO 6 地域の参加研究所に送られた。

参加研究所は、パネルを受領したことをすぐに通知し、1 カ月以内に検査結果を報告した。

パネル 5 は、90 の国・地域・領土の 114 研究所から、パネル 6 は 102 の国・地域・領土の 129 研究所から報告された (詳細は表 2)。パネル 6 に関する 1 箇所の参加研究所からの結果は、送付に長時間を要したために除外した。多くの研究所には 1 週間以内にパネルが届いた (パネル 5 は 82%; パネル 6 は 86%)。パネル 5、6 を報告した研究所のうち、40%がヨーロッパ地域、19%がアメリカ地域、15%がアフリカ地域、15%が西太平洋地域、7%が東地中海地域、5%が東南アジア地域であった。

表 2: パネル 5 およびパネル 6 に関する A 型インフルエンザウイルスの亜型を検出する外部精度評価 (2009 年) への WHO からの参加要請に対する各研究所の回答 (WER 参照)

* 結果：

パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスに対して以下の基準を使用したこと以外は、評価基準は以前のパネル 1-4 の時と同様である：

①パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスの検出に失敗、あるいはパンデミック (H1N1) 2009 ウイルスではない亜型と報告したもの、またはその両方、を誤りとする。

②パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスに対する検査が行われず、パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスを H1 や H3 でないと報告できなかったものは誤りとする。

③米国疾病管理予防センター (CDC) のリアルタイム RT-PCR 豚 H1 プロトコールを使用した場合、H5 検体を“パンデミック (H1N1) 2009 ウイルスと H5”と報告したものは正答とする (詳細は考察を参照)。

* 各研究所の成績：

* パネル 5：

87 研究所が、全 10 検体に対して正答した。そして、12 研究所が 9 検体、14 研究所が 5-8 検体、1 研

研究所が4検体以下で正答した(表3)。1研究所のみが1つの陰性検体(2009-03)を陽性と判定した(偽陽性率1%) (表1)。高濃度のH5検体については、97%の研究所が2009-07検体に、96%が2009-08検体に正答した。また、低濃度のH5検体については、93%が2009-02検体に、89%が2009-06検体に正答した。一方、同程度の濃度であるH5の2検体については、94%が2009-04検体に、93%が2009-09検体に正答した。さらに、同程度の濃度であるH1の2検体については、92%が2009-10検体に、95%が2009-01検体に正答した。H3検体(2009-05)には、94%が正答した。

表3: A型インフルエンザの亜型を検出する外部精度評価(2009年)に参加した研究所の成績(WER参照)

* パネル6:

101研究所が、全10検体に対して正答した。そして、12研究所が9検体、13研究所が5-8検体、2研究所が4検体以下で正答した(表3)。H5の4検体について、2009-15検体には98%、2009-11検体には91%、2009-19検体には93%、2009-17検体には89%の研究所が正答した。高濃度のH5検体(2009-15、2009-11)に対する全256検査には95%が正答し、低濃度のH5検体(2009-17、2009-15)に対しては91%が正答した。また、高濃度のH5クレード2.2株(2009-20)に対しては95%、低濃度のクレード2.2株(2009-14)に対しては93%が正答した。H1検体(2009-13)には99%が、H3検体(2009-18)には94%が正答した。パンデミック(H1N1)2009ウイルス検体の2009-12検体には98%が、2009-16検体には100%が正答した。

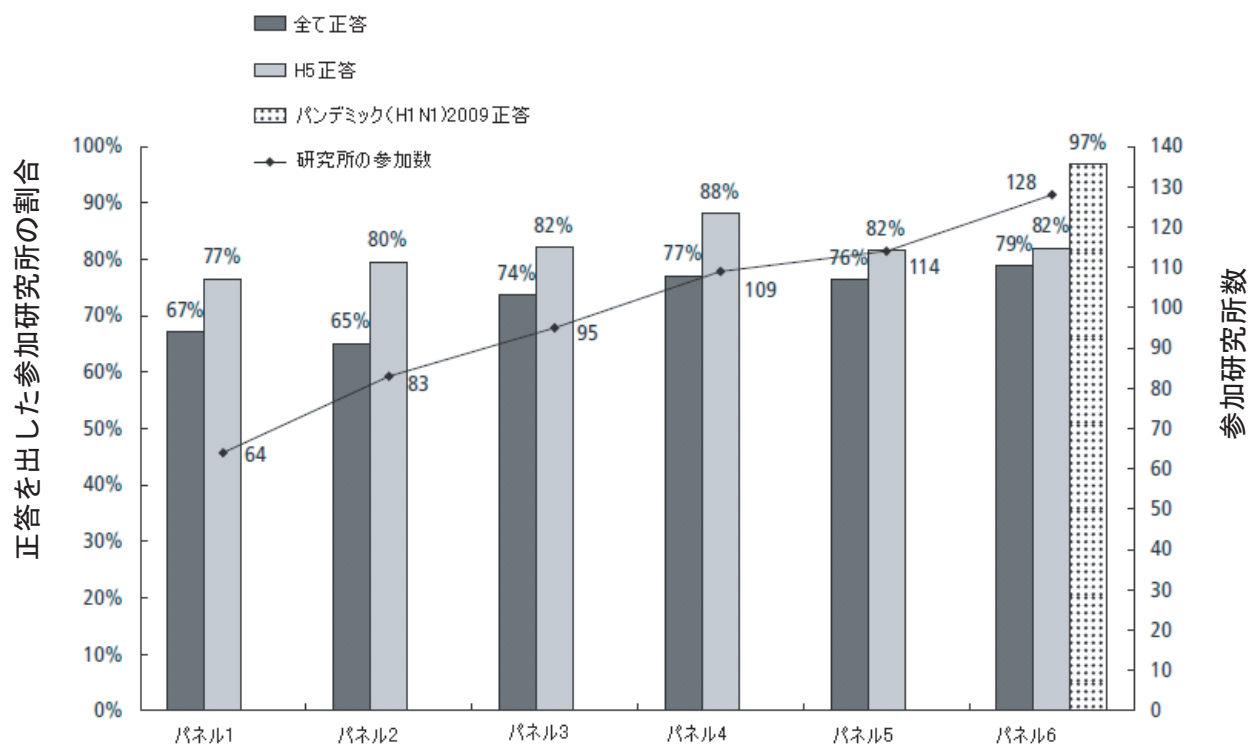
* 検出法:

H1、H3、H5亜型に対するPCRプロトコールは様々であったが、結果に大きな影響は及ぼさなかった。豚インフルエンザA型ウイルス検出に、18%の研究所が核蛋白質遺伝子を標的にするプライマーを使用した。パンデミック(H1N1)2009ウイルスの特異的検出には、少なくとも22の参考文献が引用され、71%の研究所がCDCプロトコールを用いた。

* 全パネルに対する研究所の成績比較:

外部精度評価(2007-2009)に参加・報告した研究所の数は64から128に増加した(図1)。全正答率も67%から79%に増加した。H5ウイルス正答率は77%から81%の範囲であった。パンデミック(H1N1)2009ウイルス正答率は97%であった。

図1: パネル別にみたインフルエンザA型ウイルスの亜型を検出する外部精度評価の参加研究所の数および成績



* 成績に影響を及ぼす要因:

パネル5、6については、H5遺伝子検出のためにリアルタイムRT-PCRにより1回以上検査した場合、従来のPCRのみに比べ、常に良い成績を示した($p < 0.05$)。市販キットの使用は、成績に有意の影響を及ぼさなかった($p > 0.05$)。

* 考察:

季節性 H1N1 及び H3N2 ウイルスの検出能力の向上は、以前の 4 パネル（85-89%）と比較して、パネル 5、6 における正答率が高いこと（92-99%）から明らかである。H5N1 ウイルス検出については、ウイルス量と大きく関連した。パネル 5、6 に含まれた異なる 2 つのウイルス RNA 濃度の H5 亜型の 3 クレードに関して、高濃度検体には 93-98% の研究所が、低濃度検体には 89-93% が正答した。

パンデミック（H1N1）2009 ウイルスは以前、インフルエンザ A 型ウイルス陽性とインフルエンザ亜型 H1N1、H3N2、H5N1 陰性により検出された。2009 年 4 月 28 日、初のパンデミック（H1N1）2009 ウイルス株 California/04/2009 全遺伝子配列が the United States' National Institutes for Health's GenBank sequence database で手に入るようになった。パンデミック（H1N1）2009 ウイルス検出のリアルタイム RT-PCR プロトコルが米国 CDC より提供され、WHO ウェブサイトで入手できるようになった。このプロトコルは、豚インフルエンザ検出のために 3 つの標的遺伝子を提供する：(i) A 型インフルエンザウイルスの一般的検出に用いられるマトリックス M 遺伝子、(ii) パンデミック（H1N1）2009 ウイルスを含む豚インフルエンザ A 型ウイルスを検出するための核蛋白質 A/NP パンデミック遺伝子、(iii) パンデミック（H1N1）2009 ウイルス検出のための赤血球凝集素 A/H1 パンデミック遺伝子。A/NP パンデミック遺伝子はパンデミック（H1N1）2009 ウイルスと H5 の両方を検出する可能性があるため、H5 をパンデミック（H1N1）2009 ウイルスと報告した参加研究所は正答とした。

パンデミック（H1N1）2009 ウイルスに、97% が正答した理由として、(i) パンデミック（H1N1）2009 ウイルスの各分節遺伝子に高い同一性配列が存在すること、(ii) RT-PCR 解析が発達し、配列が公表されたこと、(iii) 多くの研究所が CDC プロトコルを使用したこと、が挙げられる。

今回、研究所の A 型インフルエンザ診断能力の向上が示された。

今後、外部精度評価プロジェクトは、NICs や NICs 以外の国立インフルエンザ研究所から連続した報告を得て、高いインフルエンザ診断精度を世界的に達成、維持する一助になることが期待される。

* 編集ノート：

プロジェクトの全データは、行動の必要性や計画を評価するために、世界インフルエンザ監視ネットワークに使用されるであろう。本プロジェクトに参加して質問に回答し、解析のための情報を提供した全 NICs とインフルエンザ研究所に、WHO は感謝の意を述べたい。

詳細な情報は、WHO 世界インフルエンザプログラム (GISN@who.int) まで。

<急性弛緩性麻痺（AFP）のサーベイランスとポリオの発生率、2009 年（WHO 本部、2009 年 11 月 10 日現在）> （WER 参照）

（高木領、三木明德、小西英二）