

今週の話題：

<PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) を用いた A 型インフルエンザウイルス検出の WHO 外部精度評価、2010>

各国のインフルエンザセンター (NICs) は、50 年以上、WHO 世界インフルエンザ監視ネットワークの中核である。NICs は、WHO 共同センターに検体を集め、初期分析し、代表的な分離ウイルスを迅速に送り、来期の季節性インフルエンザワクチンの組成の勧告と世界的流行の危険性のあるウイルスの検出に重要な役割を果たしている。そして集団発生への対応や世界的流行への準備を促進する。こうしたことは、インフルエンザ A (H1N1) 2009 ウイルスパンデミックの期間に特に明らかであった。

PCR は、鳥インフルエンザ A (H5N1) を含むインフルエンザウイルスの通常の診断と監視の両方に主要な方法として使用されることが多くなったため、インフルエンザウイルスの迅速な検出について各研究所の成績を見るために WHO 外部精度評価プロジェクトが 2007 年に着手された (2007-2009 年の結果：6 パネルの分析は WER 参照)。

WHO Reference Laboratory for Diagnosis of Influenza A/H5 Infection と香港特別行政区の健康管理センターにある国立インフルエンザセンターは参加研究所にパネルを送った。WHO 共同センターと他の H5 のレファレンスラボラトリーや WHO の地域事務所により追加的支援された。2010 年に送付されたパネルで範囲はインフルエンザ B にまで拡大された。本調査では 2010 年 1~3 月および 6~8 月に送付された、パネル 7、8 に対する精度評価の結果を要約する。

* 方法：

・パネルの準備：

参加研究所はインフルエンザ A (H1N1、H3N2、H5N1) ウイルス、パンデミック A (H1N1) 2009 ウイルス及びインフルエンザ B ウイルスから抽出し真空乾燥した RNA 検体を検査した。検体は上述したとおり準備された。

・パネルの構成：

パネル 7、8 は異なる濃度の異なる遺伝子分類のインフルエンザウイルス A (H1N1、H3N2、H5N1) ウイルス、パンデミック A (H1N1) 2009 ウイルス及び B ウイルスの RNA を含むコード化された 10 検体からそれぞれ構成された。ウイルスが含まれていない検体が両方のパネルに含まれていた。研究所ごとの検出方法や標的遺伝子の調査表も示された。

表 1：A 型インフルエンザ及び B 型インフルエンザ (パネル 7、8) を検出できたナショナル・インフルエンザセンター及び他の研究所の外部精度評価 (2010 年) の結果

| インフルエンザ ウイルス | 株または クレード | Panel 7 | | | Panel 8 | | |
|----------------------|--------------------------|---------|-------------------------|-----------------------------------|---------|-------------------------|-----------------------------------|
| | | 検体数 | コピー数 | 正確に 検体を 確認した 検査室数 (%) | 検体数 | コピー数 | 正確に 検体を 確認した 検査室数 (%) |
| H5N1 | 1 | - | - | - | 2010-15 | 1.180 x 10 ³ | 149 (94) |
| H5N1 | 1 | - | - | - | 2010-18 | 6.120 x 10 ² | 147 (93) |
| H5N1 | 2.2 | 2010-02 | 4.310 x 10 ² | 131 (94) | - | - | - |
| H5N1 | 2.2 | 2010-06 | 2.243 x 10 ² | 131 (94) | - | - | - |
| H5N1 | 2.3.2 | - | - | - | 2010-13 | 9.883 x 10 ² | 146 (92) |
| H5N1 | 2.3.2 | - | - | - | 2010-19 | 1.192 x 10 ³ | 146 (92) |
| H5N1 | 2.3.4 | 2010-04 | 3.440 x 10 ³ | 132 (95) | - | - | - |
| H5N1 | 2.3.4 | 2010-08 | 1.945 x 10 ³ | 133 (96) | - | - | - |
| H1N1 | A/Brisbane/59/2007-like | 2010-01 | 1.013 x 10 ³ | 129 (93) | 2010-17 | 2.728 x 10 ³ | 154 (98) |
| H3N2 | A/Brisbane/10/2007-like | 2010-03 | 1.876 x 10 ³ | 136 (98) | - | - | - |
| H3N2 | A/Perth/16/2009-like | - | - | - | 2010-14 | 1.167 x 10 ³ | 154 (98) |
| Pandemic (H1N1) 2009 | A/California/4/2009-like | 2010-05 | 3.000 x 10 ³ | 137 (99) | 2010-12 | 3.873 x 10 ³ | 154 (98) |
| Pandemic (H1N1) | A/California/4/2009-like | 2010-10 | 9.998 x 10 ² | 136 (98) | 2010-20 | 1.938 x 10 ³ | 154 (98) |
| Influenza B | B/Victoria/02/1987-like | 2010-07 | 2.683 x 10 ⁴ | 139 (100) | 2010-11 | 2.002 x 10 ³ | 152 (96) |
| 陰性 | NA-SO | 2010-09 | NA-SO | 137 (99) | 2010-16 | NA-SO | 156 (99) |

パネル 7 :

陰性の1検体、クレード2.2 H5の同濃度の2検体 (2010-02、2010-06)、クレード2.3.4 H5の同濃度の2検体 (2010-04、2010-08)、パンデミックA (H1N1) 2009ウイルスの同濃度の2検体 (2009-05、2009-10)、H1検体 (2010-01)、H3検体 (2010-03)、インフルエンザB検体 (2010-07) の合計10検体。

パネル 8 :

陰性の1検体、クレード2.3.2 H5の異なる濃度の2検体 (2010-13、2010-19)、クレード1 H5の異なる濃度の2検体 (2010-15、2010-18)、パンデミックA (H1N1) 2009ウイルスの異なる濃度の2検体 (2010-12、2010-20)、H1検体 (2010-17)、H3検体 (2010-14)、インフルエンザB検体 (2010-11) の合計10検体。

* パネルの配布と参加者の回答 :

パネルが送られる前に、NICs と他の国家登録されたインフルエンザ研究所は参加を呼びかけられた。パネル 7 の評価には 157 の研究所、パネル 8 の評価には 167 の研究所が参加を要請された。2 つのパネルは WH06 地域の全ての研究所に国際宅配便で常温で配布された。参加研究所はパネルを受け取るとすぐに、ファックスまたは電子メールで届け出をし、一ヶ月以内に結果を返送することが要求された。それぞれのパネルの返送締め切り後間もなく、集計結果の仮報告書が参加研究所に送られた。

パネル 7 の結果は 111 の国と地域、(領域) の 140 研究所から報告された。一つの研究所は発送時期が遅れたことで解析から除外されたので報告数は 139 となった。パネル 8 の結果は 125 の国と地域、(領土) の 158 研究所から報告された (図 1)。ほとんどの参加研究所は一週間以内にパネルを受け取った (パネル 7 は 86%、パネル 8 は 83%)。パネル 7 と 8 の解析をした研究所は、37%がヨーロッパ地域、20%がアメリカ地域、15%が西太平洋地域、14%がアフリカ地域、8%が東地中海地域、5%が東南アジア地域であった。

* 結果 :

パネル 7、8 の評価結果の解析に使用された基準は、パネル 1-6 の基準と同様である。これに加えて、インフルエンザ B を含む検体の評価結果の基準は以下のとおりである。

- (i) インフルエンザ B の検出に失敗、またはインフルエンザ A と報告したもの、あるいはその両方を不適当な返答とする。
- (ii) インフルエンザ B に対する検査を行わず、インフルエンザ A が陰性であるという報告した場合不適当な返答とする。

図 1 : WHO 地域別のパネル 1-8 (2007-2010) における A 型及び B 型インフルエンザを検出する外部精度評価の参加を要請された研究所数及び回答数 (WER 参照)

* 各研究所の成績 :

<パネル 7>

85%の研究所が全 10 検体に、そして 5%の研究所が 9 検体、10%の研究所が 5-8 検体に対して適切な結果を出した。(表 2)。2 つの研究所が陰性検体 (2010-09) を陽性と誤って報告した。(表 1) 偽陽性率は 1%であった。クレード 2.2 H5 の同濃度の 2 検体 (2010-02、2010-06) に対して 94%、クレード 2.3.4 H5 の同濃度の 2 検体では 2010-04 が 95%、2010-08 が 96%、パンデミック A (H1N1) 2009 ウイルスの同濃度の 2 検体に対しては、2009-05 が 99%、2009-10 が 98%、H1 検体 (2010-01) では 93%が、H3 検体 (2010-03) では 98%が適切な返答をした。インフルエンザ B 検体 (2010-07) では参加研究所の全てが適切な結果を出した。

<パネル 8>

86%の研究所が全 10 検体に、そして 5%の研究所が 9 検体、6%の研究所が 5-8 検体、3%の研究所が 5 検体未満に対して適切な結果を出した (表 2)。2 つの研究所が陰性検体 (2010-16) を陽性と誤って報告した (表 1)。偽陽性率は 1%であった。クレード 2.3.2 H5 の異なる濃度の 2 検体 (2010-13、2010-19) に対して 92%、クレード 1 H5 の異なる濃度の 2 検体では 2010-15 に 94%が、2010-18 に 93%が、パンデミック A (H1N1) 2009 ウイルスの異なる濃度の 2 検体に対しては、(2010-12、2010-20) が両方とも 98%が、H1 検体 (2010-17) と H3 検体 (2010-14) ではともに 98%が、インフルエンザ B 検体 (2010-11) に対して 96%が適切な結果を出した。

表 2 : パネル 7 とパネル 8 (2010) のインフルエンザ A 及び B 型ウイルス検出の WHO 外部精度評価における参加研究所の成績 (WER 参照)

* 検出方法 :

検査方法と PCR プロトコールは様々な差があった。インフルエンザ A ウイルスでは、パネル 7 で 99%、パネル 8 で 99%の研究所で M 遺伝子検出が行われた。しかしながら、大多数の研究所では、インフルエンザ B ウイルスの検出に使用した、標的遺伝子を明記していない。(パネル 7 で 66%、パネル 8 で 73%)。H5 ウイルスの検出のために、CDC のプロトコールは、パネル 7 で 68 研究所、パネル 8 で 80 研究所に採用された。パンデミック A (H1N1) 2009 ウイルス検出では、パネル 7 で 96 研究所、パネル 8 で 109 研究所に CDC プロトコールが採用された。異なる研究所による、異なる PCR プロトコールにも関わらず、

検査結果の差はほとんどなかった。

* 全パネルに対する研究所の成績比較：

2007～2010年まで外部精度評価への参加研究所数と報告数はパネル1では64、パネル7では139、パネル8では158と増加している。すべてのパネルにおいて適切な評価をした研究所の数は、パネル1では67%、パネル7では85%、パネル8では86%と増加している。H5ウイルス検出の適切な評価をした研究所の割合も、パネル1では77%、パネル7では90%、パネル8では91%と増加している。パンデミックA (H1N1) 2009ウイルス検出は、パネル7では95%、パネル8では96%と良い成果が出続けている。

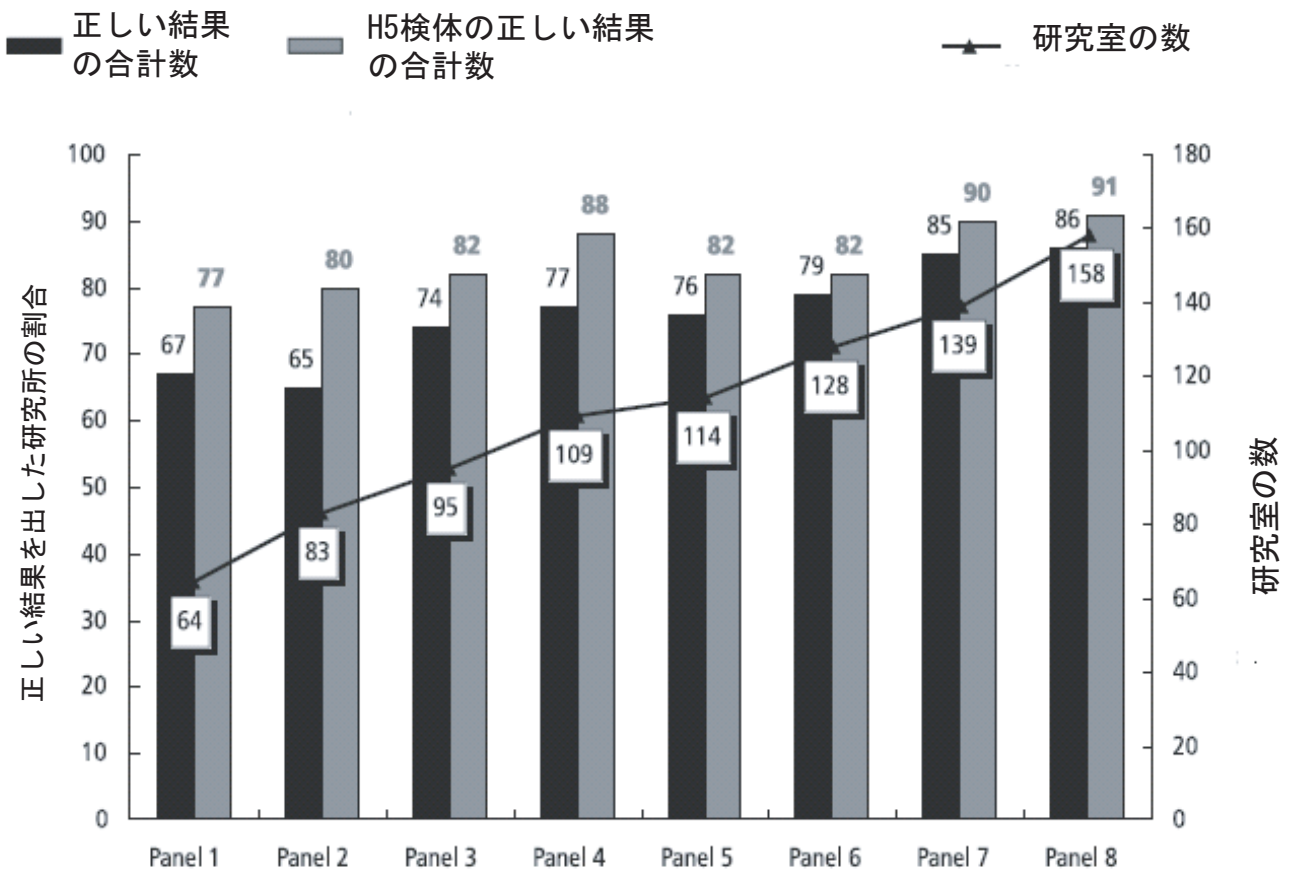
* 成果に影響した要因：

パネル7の結果の分析は、H5遺伝子のためのリアルタイムPCRの使用が従来のPCR単独使用よりも有意に良い成果をあげている。商業キットの使用は研究所間の結果に有意な影響をおよぼしていなかった ($P=0.507$)。

* 考察：

外部精度評価への参加数は開始から全6地域で安定して増加している(図1)。全期間で正答率も着実に増加している(図2)。H5ウイルスの検出も改善している(図2)。パネル7と8でH5ウイルスの検体で誤った結果を報告した17研究所のうち、9研究所(53%)は以前にもH5ウイルスの検体について誤った結果を出していた。これらの欠陥を明らかにすることで改善が期待される。2系統のインフルエンザB (B/Victoria/2/87とB/Yamagata/16/88)は世界中で感染を引き起こしているために、インフルエンザBに関しては2010年に始めて外部精度評価が行われた。パネル7では100%正答されたが、パネル8では11研究所がテストを行わず、147研究所中141研究所(96%)が正答した。今回の結果から、各研究所のインフルエンザ診断能力を追跡監視することの意義が示され、参加数の増加がすべての検体の正しい同定を可能にすることが示された。NICsとNICs以外の指定された国立インフルエンザ研究所は、本プロジェクトに参加し続けることを奨励される。このプロジェクトは世界規模でインフルエンザ診断基準と質を向上させる一助となることが期待される。

図2：パネル1-8(2007-2010)のインフルエンザAとインフルエンザBの検出のWHO外部精度評価における参加研究所の成績(WER参照)



(内藤紘一、山本直美、宇佐美眞)