

今週の話題：

<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亜型を検出する WHO 外部精度評価プロジェクト (2011) >

* 緒言：

インフルエンザの世界的ウイルス学的監視は、50 年以上前から世界インフルエンザ監視ネットワーク (GISN) として WHO の世界インフルエンザ監視および応答システム (GISRS) を通じて行なわれてきた。106 カ国の 136 の機関が WHO によって GISRS のバックボーンをなす各国のインフルエンザセンター (NICs) と認められている。GISRS はインフルエンザウイルスの変異を監視し、研究室の診断、ワクチンの構造、抗ウイルス薬の感受性およびリスクアセスメントを含む分野の勧告に関する情報を提供する。GISRS 研究所ネットワークは、インフルエンザパンデミック出現に対する世界的勧告体系としての役目を担っている。

NICs の多くは季節性インフルエンザと鳥インフルエンザ A (H5N1) およびパンデミック A (H1N1) 2009 の診断と監視の両方の主要な方法としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を採択した。WHO は参加研究所の質を比較するため、2007 年に外部精度評価プロジェクトを創設し、2007~2010 年までの結果は WER で報告された。

2011 年も引き続き同プロジェクトが WHO の下で継続され、香港特別行政区 (SAR) 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と H5 レファレンスラボトリーによって実行された。この報告書では、2011 年に送付されたパネル 9、10 の精度評価を要約する。

* パネルの準備：

インフルエンザ A、インフルエンザ B および γ 線により不活化されたインフルエンザ A ウイルスの真空乾燥された RNA 検体は、参加研究所に送られ前述されたように調製された。

* パネルの構成：

パネル 9、10 は、異なる遺伝子クレード (系統群) の A (H5N1) と A (H1N1)、A (H3N2)、パンデミック A (H1N1) 2009、インフルエンザ B、ならびに γ 線で不活化された 2 種類の A (H3N2) と A (H1N1) ウイルスから抽出された異なる濃度の RNA を含むコード化された 10 検体より構成された。ウイルスを含んでいない検体も両方のパネルに含まれた。パネル構成の詳細は表 1 に示す。研究所ごとの検出方法や標的遺伝子の調査票も同時に送付された。

* パネルの分配および参加者の反応：

NICs と他の国立インフルエンザ研究所は、パネルが送られる前に参加を依頼された。2011 年の 1~3 月にパネル 9 が、6~7 月にパネル 10 が送られた。両方のパネルは、香港特別行政区 (SAR) 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および H5 レファレンスラボトリーから国際郵便で常温で送られ、多くは、送付後 1 週以内にパネルを受け取った (パネル 9 : 129/158[81.6%]、パネル 10 : 130/159[81.8%])。パネル 9 は 123 の国と地域の 158 研究所、パネル 10 は 126 の国と地域の 159 研究所から報告された。

* 結果：

パネル 9、10 の参加研究所の評価基準は、パネル 1~8 に使用したものと同様のものを用いた。

* 研究所の評価：

・ パネル 9：

158 研究所のうち 122 研究所 (77.2%) は 12 検体すべて正答、7 研究所 (4.4%) は 1 つ、29 研究所 (18.4%) は 2 つ以上不正答であった (表 2 参照)。8 研究所が陰性検体を陽性と報告し、偽陽性率は 5.1% であった (表 1 参照)。クレード 2.3.2 A (H5N1) の同濃度の 2 検体 (2011-01、2011-07) は 143 研究所 (90.5%)、クレード 2.2 H5 ウイルスの異なる濃度の 2 検体のうち 2011-06 は 150 研究所 (94.9%)、2011-10 は 151 研究所 (95.6%)、A (H3N2) 2011-09 とインフルエンザ B 2011-08 は 152 研究所 (96.2%) が適切な結果を報告した。パンデミック A (H1N1) 2009 の同濃度の 2 検体 (2011-04、2011-05) は 145 研究所 (94.3%) が、 γ 線で不活化された A (H1N1) (V01-2011) と A (H3N2) (V02-2011) の 2 検体は、146 研究所 (92.4%) が 2 検体ともに適切な結果を報告した。

・ パネル 10：

159 研究所のうち 124 研究所 (78.0%) は 12 検体すべて正答、12 研究所 (7.5%) は 1 つ、23 研究所 (14.5%) は 2 つ以上不正答であった (表 2 参照)。3 研究所が陰性検体を陽性と報告し、偽陽性率は 1.9% であった (表 1 参照)。クレード 2.3.2 A (H5N1) 同濃度の 2 検体 (2011-12、2011-18) は、147 研究所 (92.5%) が、クレード 2.3.4 H5 の異なる濃度の 2 検体のうち 2011-14 は 147 研究所 (92.5%) が、2011-16 は 150 研究所 (94.3%) が適切な結果を報告した。パンデミック A (H1N1) 2009 同濃度の

2 検体 (2011-17、2011-20) は 156 研究所 (98.1%) が、インフルエンザ B (2011-11、2011-13) の 2 検体は 155 研究所 (97.5%) が、 γ 線で不活化された A (H3N2) (V03-2011、V04-2011) の 2 検体は 140 研究所 (88.1%) が、2 検体ともに適切な結果を報告した。A (H3N2) (2011-15) 検体は、155 研究所 (97.5%) が適切な結果を報告した。

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 9、10) 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 (2011 年) の結果

インフルエンザウイルス	株またはクレード (系統群)	Panel 9 (n=158)			Panel 10 (n=159)		
		検体ナンバー	コピー数	正確に検体を確認した検査室数 (%)	検体ナンバー	コピー数	正確に検体を確認した検査室数 (%)
真空乾燥 RNA 検体							
A (H5N1)	2.2	2011-06	4.123x 10 ²	150 (94.9)	—	—	—
A (H5N1)	2.2	2011-10	1.358 x 10 ³	151 (95.6)	—	—	—
A (H5N1)	2.3.2	2011-01	7.972 x 10 ²	144 (91.1)	2011-12	1.149 x 10 ³	148 (93.1)
A (H5N1)	2.3.2	2011-07	8.323 x 10 ²	145 (91.8)	2011-18	9.142 x 10 ²	149 (93.7)
A (H5N1)	2.3.4	—	—	—	2011-14	2.462 x 10 ²	147 (92.5)
A (H5N1)	2.3.4	—	—	—	2011-16	4.107 x 10 ³	150 (94.3)
A (H3N2)	A/Perth/16/2009-like	2011-09	1.346 x 10 ³	152 (96.2)	2011-15	7.180 x 10 ²	155 (97.5)
A (H1N1) pdm09	A/California/4/2009-like	2011-04	6.892 x 10 ²	149 (94.3)	2011-17	4.948 x 10 ²	158 (99.4)
A (H1N1) pdm09	A/California/4/2009-like	2011-05	8.110 x 10 ²	150 (94.9)	2011-20	3.407 x 10 ²	156 (98.1)
Influenza B	B/Brisbane/60/2008-like (Victoria lineage)	2011-08	7.623 x 10 ¹	152 (96.2)	2011-13	1.990 x 10 ³	158 (99.4)
Influenza B	B/Florida/4/2006-like (Yamagata lineage)	—	—	—	2011-11	5.670 x 10 ²	155 (97.5)
陰性	NA SO	2011-02	NA SO	155 (98.1)	2011-19	NA SO	156 (98.1)
陰性	NA SO	2011-03	NA SO	150 (94.9)	—	—	—
γ 線により不活化された検体							
A (H1N1)	A/Brisbane/59/2007-like	V01-2011	3.237 x 10 ²	148 (93.7)	—	—	—
A (H3N2)	A/Perth/16/2009-like	V02-2011	1.041 x 10 ²	151 (95.6)	V03-2011	1.310 x 10 ²	148 (93.1)
A (H3N2)	A/Perth/16/2009-like	—	—	—	V04-2011	8.310 x 10 ¹	143 (89.9)

表 2 : 参加研究所の外部精度評価の正答割合 (パネル 9、10 2011)

評価	研究所の数	研究所の数	
		パネル 9 (n=158)	パネル 10 (n=159)
12 samples correct	2 chantillons bons	122 (77.2)	124 (78.0)
11 samples correct	1 chantillons bons	7 (4.4)	12 (7.5)
8-10 samples correct	8-10 chantillons bons	27 (17.1)	19 (11.9)
<8 samples correct	8 chantillons bons	2 (1.3)	4 (2.5)

* 検出方法 :

インフルエンザ A 型、B 型ウイルスおよび亜型 H1、H3、H5 ウイルスの検出のために使用される検査方法と PCR プロトコルは研究所によって相当な違いがあった。参加者の半数以上は、CDC のプロトコルを

使用した。異なる PCR プロトコルの使用にもかかわらず結果に違いはほとんどなかった。標的遺伝子、検出方法、手引きと使用される酵素の出所の詳細は、すべての研究所に配布された実験の報告内容に含まれていた。

* 成績に影響を及ぼした要因：

パネル 9、10 の分析結果、①H5 遺伝子検出にリアルタイム PCR の 1 回以上の使用②市販の診断キットの使用③別の H5 遺伝子の分析法の使用は、研究所の成績に重大な影響を及ぼさなかった。

* 考察：

5 年が経過し、外部精度評価に参加する研究所の数はパネル 8 ウイルスの PCR 検査まで安定している。A (H5N1) 検出成績において改善が認められた。異なるクレード (2.2、2.3.2、2.3.4) の A (H5N1) ウイルスはパネル 9、10 とも含まれていたにもかかわらず、A (H5N1) ウイルスを含む検体をすべて正答した研究所の割合は、パネル 9 で 90%、パネル 10 で 89%と高いまだだった (図 1 参照)。しかしながら、パネル 9、10 において抽出した RNA の付加段階に必要な γ 線により不活化されたウイルス検体を含むすべてを正答した研究所の数は、パネル 8 の 86%からそれぞれパネル 9 が 77%、パネル 10 が 78%と減少した。

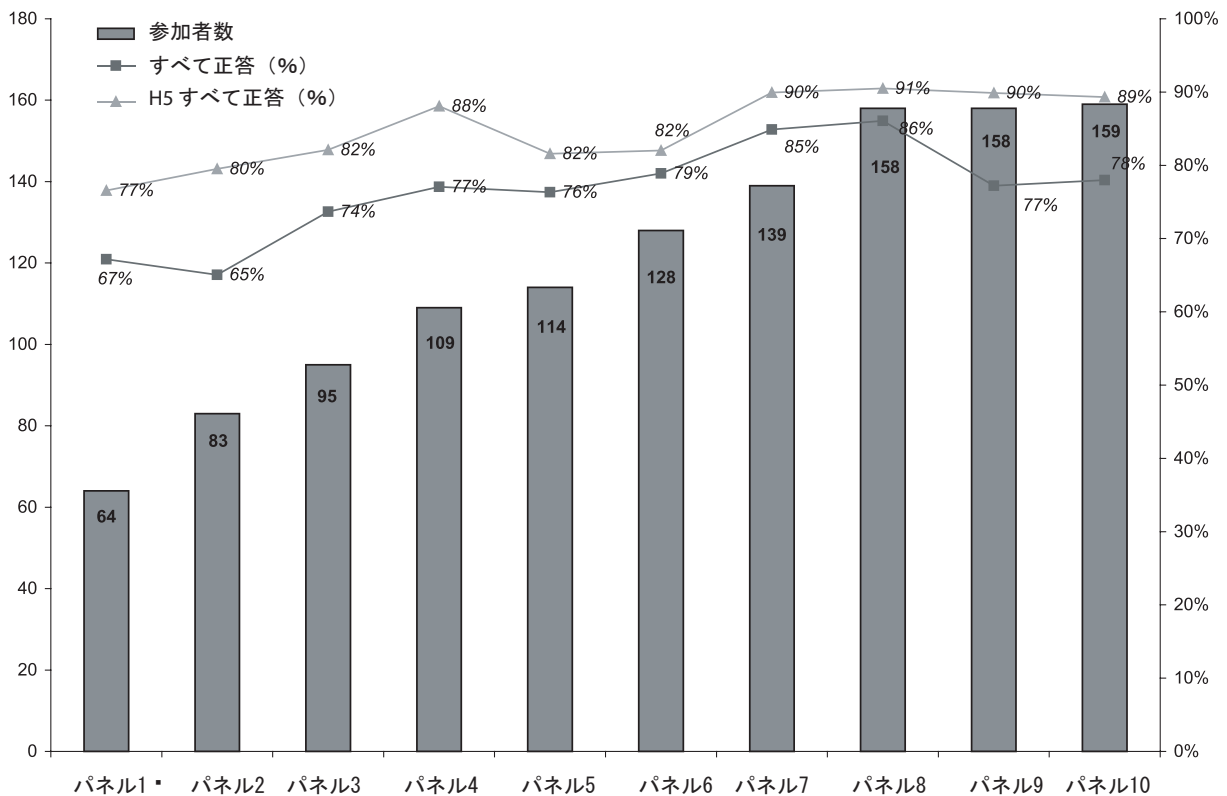
外部精度評価の範囲は 2007 年～2011 年の間に拡大した。パネル 1～5 は、A (H1N1)、A (H3N2) A (H5N1) ウイルスの RNA を含んでいる。2009 年 3 月のパンデミック A (H1N1) 2009 ウイルスの出現で、外部精度評価はパネル 6 にパンデミック A (H1N1) 2009 ウイルスを含めた。2010 年、NICs の要求を満たすために初めてパネル 7 にインフルエンザ B 型ウイルスが含まれた。2011 年、RNA の抽出の成果を評価するために γ 線で不活化されたウイルス検体が初めてパネル 9 に含まれた。パネル 11 では RNA 検体を γ 線で不活化されたウイルス検体に置き換えることが計画されている。NICs と NICs 以外の指定された国立インフルエンザ研究所は、プロトコルの最適化、情報交換、成果の観察から利益を得るために外部精度評価プロジェクトへ継続して参加することが推奨される。

このプロジェクトが、インフルエンザウイルスを迅速診断する世界の診断能力を上げ続けることが期待される。

図 1：インフルエンザ A、B 型ウイルス検出の WHO 外部精度評価参加研究所の成績 (パネル 1～10 2007～2011)

検査室数

検査室の割合



(保山智子、橋本健志、塩谷英之)