

今週の話題：

<WHO 外部質的評価プログラムの概要分析 2013：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるインフルエンザウイルスサブタイプ A の検出>

## \* 序論：

地球規模のインフルエンザウイルス学的サーベイランスは 60 年以上にわたり、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）を介して行われている。現在 111 カ国の 141 機関が WHO によって国立インフルエンザセンター（NIC）として承認されている。

継続的に進化するインフルエンザウイルスの性質とパンデミックとなる可能性のあるヒト感染を引き起こす能力を考えると、タイムリーなサーベイランスとしっかりとした検査診断が不可欠である。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によるインフルエンザウイルスサブタイプ A のための WHO 外部質的評価プログラム（EQAP）は、ルーティンの分子診断とサーベイランスに関わる参加検査室の質と遂行状況の比較を監視することを目的として 2007 年に開始された。

2013 年、このプロジェクトは WHO の地球規模のインフルエンザプログラムの調整のもと継続され、WHO H5 リファレンス研究所、ならびに中国の香港特別行政区（香港 SAR）の衛生防護センターにある国立インフルエンザセンターによって実施された。

この報告は、2013 年 4 月～6 月の間で、参加検査室に発送されたパネル 12 の評価結果を要約したものである。ノイラミニダーゼが（NA）-H275Y に置換することになり、オセルタミビル阻害効果を非常に減少させたインフルエンザ A（H1N1）の連続的な検出の観点から、試験的に遺伝子型の NA 阻害剤の感受性テストも含まれていた。

## \* パネルの準備：

真空乾燥した  $\beta$ -プロピオラクトン不活化インフルエンザウイルスは、Madin-Darby canine kidney（MDCK）の細胞中で増殖させ、 $\beta$ -プロピオラクトンにより不活性化した。

## \* パネル構成：

パネル 12 はインフルエンザ A（H5N1）遺伝的クレード 2.3.2.1、A（H3N2）、H275Y 置換を有する A（H1N1）pdm09、A（H9N2）、そしてインフルエンザ B（ビクトリア、山形系統）を含むインフルエンザウイルスの異なる濃度で表される符号化された 10 ある標本から成る。

## \* パネルの配布と参加検査室の対応：

NIC と他の国立インフルエンザ研究所は、パネル発送前に参加を要請された。パネル 21 は国立インフルエンザセンターから WHO の 6 地域の 140 カ国 179 の参加検査室に、宅急便により常温で 2013 年 4 月～6 月の間に発送された。パネルを受け取った 126/175（72%）の参加検査室は発送後 1 週間以内に標本を受け取った。

パネル 12 を受け取った参加検査室は標本取得後 4 週以内（前回は標本取得後 36 日以内）に結果を報告するよう求められた。締切日までに結果を報告した参加検査室数は、パネル 12 が 158/175（90.3%）、パネル 11 が 163/170（95.9%）であった。

表 1：インフルエンザ A および B 型ウイルスを検出するための国立インフルエンザセンターおよび他の参加検査室の WHO 外部品質評価プログラムによるパネル構成と結果、パネル 12（2013）（WER 参照）

## \* 検出方法：

インフルエンザ A 型および B 型ウイルス、サブタイプの A（H1）pdm09、A（H3）、A（H5）そして A（H9）ウイルスを選別するために参加検査室で使われるテスト戦略や PCR 計画でかなりのばらつきが見られた。参加検査室の半数以上は、CDC アトランタ計画を使用し、異なる PCR 計画の使用にも関わらず、テスト結果にはほとんど差がなかった。

## \* 分析結果：

パネル 1-11 に同じ評価基準に基づいて、130/158（82.3%）の参加検査室はすべての 10 の標本について正確な結果を返した。インフルエンザ A（H5）4 つすべての標本は 140（88.6%）の参加検査室によって正確に同定された。WHO 地域ごとの参加検査室の性能を図 1 に示し、すべてのパネルの参加検査室の性能の比較を図 2 に示す。

3 つの異なるインフルエンザ A（H5N1）ウイルスが含まれた。最初の（V01-2013）はヒトウイルスだった。正確な検出率は 145/158（91.8%）であった。第 2 の（V05-2013）は 10 倍に希釈した標本を含んでいる鳥ウイルスだった。正確な検出率はそれぞれ 153/158（96.8%）と 144/158（91.1%）であった。第 3 の（V10-2013）は正確な検出率が 152/158（96.2%）であったために、別の鳥ウイルスだった。

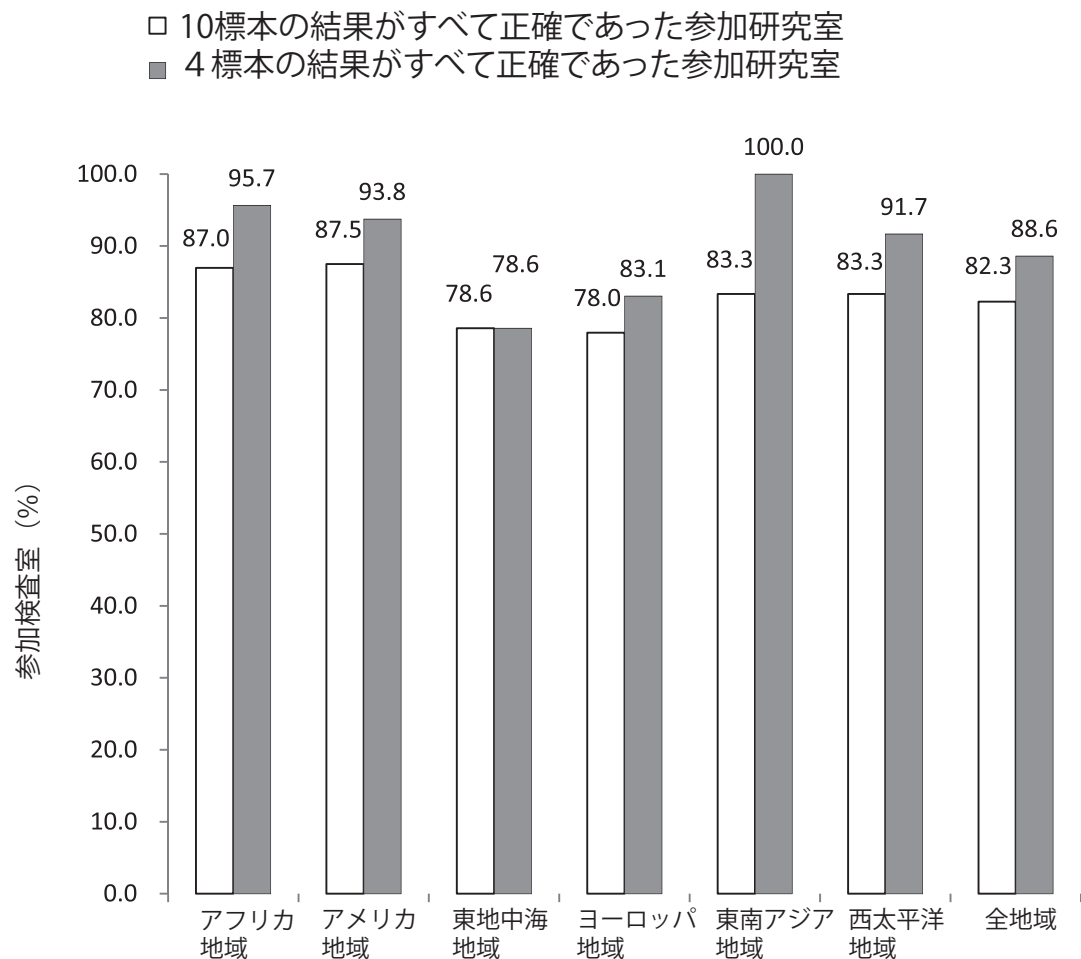
インフルエンザ A（H1N1）pdm09 の標本（V09-2013）と A（H3N2）の標本（V07-2013）は、154/158（97.5%）と 155/158（98.1%）の参加検査室がそれぞれ正確な結果を報告した。インフルエンザ B 標本については、ビクトリア系統ウイルス（V02-2013）と山形系統ウイルス（V08-2013）の正確な検出率はそれぞれ 153/158（96.8%）と 151/158（95.6%）となった。

一般的に認識されていないインフルエンザ A（H9N2）ウイルス（V06-2013）では、インフルエンザ A

(H9) と型別不能のインフルエンザ A の検出率は、それぞれ 47/158 (29.7%) と 105/158 (66.5%)、正確な報告の全割合は 152/158 (96.2%) であった。4 つの参加検査室が陰性標本 (V03 -2013) の肯定的な結果を返し、偽陽性率は 2.5% (表 1) であった。

このパネルでは 28/158 (17.7%) の参加検査室は不正確な結果を返した。要するに 7/158 (4.4%) の参加検査室が 1 つの不正確な結果を返し、21/158 (13.3%) が 2 つ以上の不正確な結果を返した (表 2)。詳細は表 3 に示す。

図 1: WHO 地域ごとの外部質的評価プログラムパネル 12 (2013) に参加する研究検査室の性能



#### 検査室の数

10標本すべて正確に報告	20	28	11	46	5	20	130
インフルエンザA (H5) の4標本すべて正確に報告	22	30	11	49	6	22	140
EQAPパネル12に参加	23	32	14	59	6	24	158

図 2: インフルエンザ A および B ウイルス検出のための WHO 外部質的評価プログラムにおける参加検査室の性能、パネル 1~12、2007~2013 年 (WER 参照)

表 2 : 外部質的評価プログラムパネル 12 (2013) における参加検査室の性能

性能	検査室の数 (n=158)
10 標本が正確	130(82.3)
9 標本が正確	7 (4.4)
6~8 標本が正確	19(12.0)
<6 標本が正確	2 (1.3)

表 3 : WHO 外部質的評価プログラムパネル 12 (2013) における参加検査室による不正確な報告結果の詳細 (WER 参照)

\* 遺伝子型ノイラミダーゼ阻害薬 (NAI) の感受性試験 :

NAI の感受性試験の予備実験では、44 (27.8%) の参加検査室が任意の基準に基づいて A (H1) pdm09 標本 (v09-2013) の遺伝子型感受性試験を行った。最も一般的な 3 つの方法はサンガー法、リアルタイム RT-PCR による対立遺伝子の識別、およびパイロシーケンス法があり、いくつかの参加検査室は 2 つ以上の方法を用いて報告した。44 の参加検査室中 43 は、H275Y アミノ酸置換をおこす、ノイラミダーゼ遺伝子中のヌクレオチドの変化として結果を正確に報告した。そしてこれは、オセルタミビルによってノイラミダーゼ阻害が大幅に減少することと関連している。

\* 考察 :

EQAP に参加している検査室の数は 2010 年のパネル 8 以降、約 158 とかなり安定している。全て正確であった率は、抽出段階でガンマ線不活化ウイルスが初めて導入されたパネル 9 の 77% から、すべてのウイルス標本をベータプロピオラクトンによって不活化させたパネル 12 の 82% までに増加した。インフルエンザ A 型 (H5) の検出については、全て正確であった率は最近の 6 パネルで約 89% と安定していた。

パネル 12 において、H5 サブタイプ結果を報告している 156 の参加検査室に関しては、リアルタイム RT-PCR を使用している 150 の検査室のうち 139 で正確な H5 の結果を報告していた。対照的に、従来の PCR のみを使用している 6 つの検査室のうち 5 つでは、1 つ以上の H5 標本に対して種別できないインフルエンザ A 型について報告していた。結果の違いは統計学的に有意であった。感受性の減少には、準最適なプライマーアニーリングが部分的に関与している可能性があった。3' 末端におけるプライマーの不一致は、従来の PCR を用いた H5 のうち 3 つにおいて確認された。同様に、3' 末端のミスマッチでリアルタイム RT-PCR を使用した 2 カ所の検査室において、種別できない結果を報告していた。このことは再調査の重要性およびプロトコルの修正の重要性を強調している。他の H5 分岐群からのウイルスの選定は、試験プロトコルの感受性および特異性を測定するために、将来のパネルでの選定において考慮される。

このパネルからサブタイプ分類されたインフルエンザ A 型 (H9) の結果は、一般にあまり流行しないインフルエンザウイルスの特定に関する習熟度の向上を反映していた。H9 のサブタイプ分類に関する不正確な結果の割合は、パネル 11 での 18.4% から、今回の 3.8% まで減少した。ヒトにおける鳥インフルエンザ A 型 (H7N9) の感染発生の報告と同時に、パネル 12 でインフルエンザ A 型 (H7) をサブタイプ分類した参加検査室の数は、パネル 11 での 8.0% と比較して 17.7% にまで有意に増加した。一方、H7 試験の増加にはインフルエンザ A 型 (H5)、V04-2013、インフルエンザ A 型 (H3)、V07-2013、インフルエンザ A 型 (H7)、およびインフルエンザ A 型 (H7) との同時感染のサブタイプ分類に関する不正確な報告によるところもある。最近のパネルでは、一般にあまり流行していないまたはサブタイプ分類できないインフルエンザウイルスの特定に関して、ノイラミダーゼのサブタイプ分類またはシーケンシングの同時使用について言及している。このパネルの調査質問の 1 つに対する返答で明らかにされているように、サブタイプ分類できないインフルエンザ A 型ウイルスは解析のために直ちに WHO 協力センター (CC) へ報告すべきであることを 94 の参加検査室が示していた。

遺伝子型 NAI の感受性試験の予備実験において、参加検査室 158 カ所中 44 カ所が結果を報告しており、44 中 43 がオセルタミビルによる抑制が大幅に減少することと関連している NA-H275Y 置換について正確に報告していた。5 カ所の参加検査室は M2-S31N 置換についても報告していた。参加検査室の大多数は WHO の GISRS が推奨している 3 つの遺伝子型手法の 1 つを使用していた。サンガーシーケンス法またはパイロシーケンス法を使用している参加検査室は、追加の置換位置および置換率に関する情報について報告していた。抗ウイルス感受性調査の重要性が増加している観点からは、WHO の EQAP は NAI の感受性試験で使用された分子法の習熟度を評価するために、継続した標本選定について研究するであろう。

インフルエンザウイルスの診断および調査における全体的な能力の質および尺度を継続して高めるために、NICs やその他の国立インフルエンザ検査室は WHO のインフルエンザ EQAP への参加を継続するように奨励されている。

(遠藤通哉、杉本達也、野田和恵、中西泰弘、白川利朗、堀裕一)