

今週の話題：

<WHO 外部質的評価プログラムの概要の分析 2014：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による A 型インフルエンザウイルスの亜型の検出>

* 序論：

地球規模でのインフルエンザサーベイランスは 60 年以上にわたり WHO により総括されてきた。それらは 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) を介して行われており、現在は 112 カ国の 142 機関が、WHO によって国立インフルエンザセンター (NICs) として承認されている。検査室のネットワークも 6 つの WHO 協力センター、4 つの必須規制検査室、そして出現した特定の問題に対処するために設立された臨時的グループから構成される。

一部の季節性でないインフルエンザウイルスにおける連続変異とパンデミック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信頼性のある検査室における診断が不可欠である。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による、A 型インフルエンザウイルスの亜型のための 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成績の比較を監視することを目的として 2007 年に開始された。A 型 (H5N1) インフルエンザと季節性インフルエンザに加え、B 型インフルエンザとヒトへの感染が報告されているその他の非季節性の A 型インフルエンザを含むために EQAP の範囲は拡大してきている。パネル 1 から 12 (2007~2013 年) にかけて参加した検査室における評価結果の概要は、WER にて報告されている (2008~2014 年 参照)。

2014 年においては、WHO 地球規模インフルエンザプログラムによる調整のもと、そのプロジェクトは継続した。なおこのプログラムは、WHO H5 基準検査室と中国の香港特別行政区 (SAR) の健康保護センター保健学部門にある国立インフルエンザセンターによって、WHO 地域オフィスの支援の下実施されたものである。

近年そのプログラムでは、年に 1 回検査のためにサンプルを送送している。この報告は、2014 年 4 月~6 月の間で、参加検査室に送られたパネル 13 の検査結果を要約したものである。任意の基準に基づいて、A 型 (H1N1) インフルエンザを検出するため、遺伝子型のノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) 感受性テストも行われた。

* パネルの準備：

真空乾燥させた Triton X - 100 により不活化したインフルエンザウイルスを参加した検査室に送付した。ウイルスは Madin-Darby canine kidney (MDCK) の細胞中で増殖させ、Triton X - 100 により不活化し、その後以前 WER (2008~2014 年 参照) にて示した方法にて準備を行った

* パネルの構成：

パネル 13 は、異なるインフルエンザウイルス濃度を持つ、記号化された 10 個のサンプルから成り、それらには A 型 (H5N1) インフルエンザ遺伝的クレード 2.2 と 2.3.2.1、A 型 (H3N2)、H275Y 置換を有する A 型 (H1N1) pdm09 と NA 275H/Y 混合を有する A 型 (H1N1) pdm09、A 型 (H7N9) そしてインフルエンザ B 型 (山形系統) がある。インフルエンザウイルスを有さないサンプルもこのパネルには含まれている。詳細なパネルの構成は表 1 に示した。参加検査室は、それぞれのサンプルを検査のために PCR 用精製水にて溶解するように指示される。EQAP サンプルに用いる検出方法や標的遺伝子が書かれた質問紙も含まれている。

* パネルの配布と参加検査室の反応：

NICs と他の国立インフルエンザ検査室は、パネルが発送される前に参加申請を受ける。H5 基準検査室と香港特別行政区 (SAR) の国立インフルエンザセンターから、パネル 13 は 2014 年 4 月~6 月の間に、以前 WER で報告した 6 つの WHO 地域の 138 カ国にある 176 の参加検査室へ、宅配便により常温で配達された。参加検査室は、サンプルを受けた日から 4 週間以内に検査結果を報告するように要求された。パネルを受け取った 175 の参加検査室の中で、128/175 (73.1%) の検査室が発送後 1 週間以内にサンプルを受け取り、156/175 (89.1%) の検査室が期限内に評価結果を報告した。WHO 地域ごとのパネル 13 を受け取った検査室数は図 1 に示した。

図 1：A 型および B 型インフルエンザウイルス検出のための WHO 外部質的評価プログラムに検査結果を報告した異なる WHO 地域ごとの参加検査室数パネル 13 (2014) (WER 参照)

* 検出方法：

以前の WER で示したパネルにおいては、インフルエンザウイルス {A 型、B 型、A 型 (H1) pdm09、A 型 (H3)、A 型 (H5)、A 型 (H7)} を検出するために様々な PCR のプロトコールとテスト戦略が参加検査室により用いられてきた。半数以上の参加検査室が米国疾病管理予防センターの方法を用いていた。異なる PCR プロトコールを用いた検査をしても、明確な違いは生じない。検査に用いた標的遺伝子、検出方法、プライマー/プローブと酵素のソースの詳細は概要報告に含まれており、それらはすべての参加検査室に配布された。

* 検査室の成績：

指定された締切日内に返答のあった 156 の検査室からの検査結果のみを解析に含めた。パネル 1-12 と同じ評価基準に基づいて、94/156 (60.3%) の参加検査室が 10 個全てのサンプルに対し正しい検査結果で返答しており、107 (68.6%) の検査室が 4 つ全ての A 型 (H5) インフルエンザを正しく見極めていた。

2 つの異なる A 型 (H5N1) インフルエンザウイルスが含まれた。1 つ目は、ヒト A 型 (H5) インフルエンザウイルス遺伝的クレード 2.2 (V01 - 2014 と V07 - 2014 で濃度が異なる) である。正確な検出率はそれぞれ、116/156 (74.4%) と 140/156 (89.7%) であった。2 つ目は、トリ A 型 (H5) インフルエンザウイルス遺伝的クレード 2.3.2.1 (V09 - 2014 が V10 - 2014 サンプルを 10 倍希釈した程度で現れる) である。正確な検出率はそれぞれ 138/156 (88.5%) と 147/156 (94.2%) であった。

A 型 (H1) pdm09 インフルエンザサンプルに関して、V02 - 2014 と V04 - 2014 の正確な検出率は、それぞれ 155/156 (99.4%) と 146/156 (93.6%) であった。A 型 (H3N2) インフルエンザサンプル (V08 - 2014) と B 型インフルエンザ山形系統のサンプル (V03 - 2014) に関して、146/156 (93.6%) と 152/156 (97.4%) の検査室が正しい結果を示した。

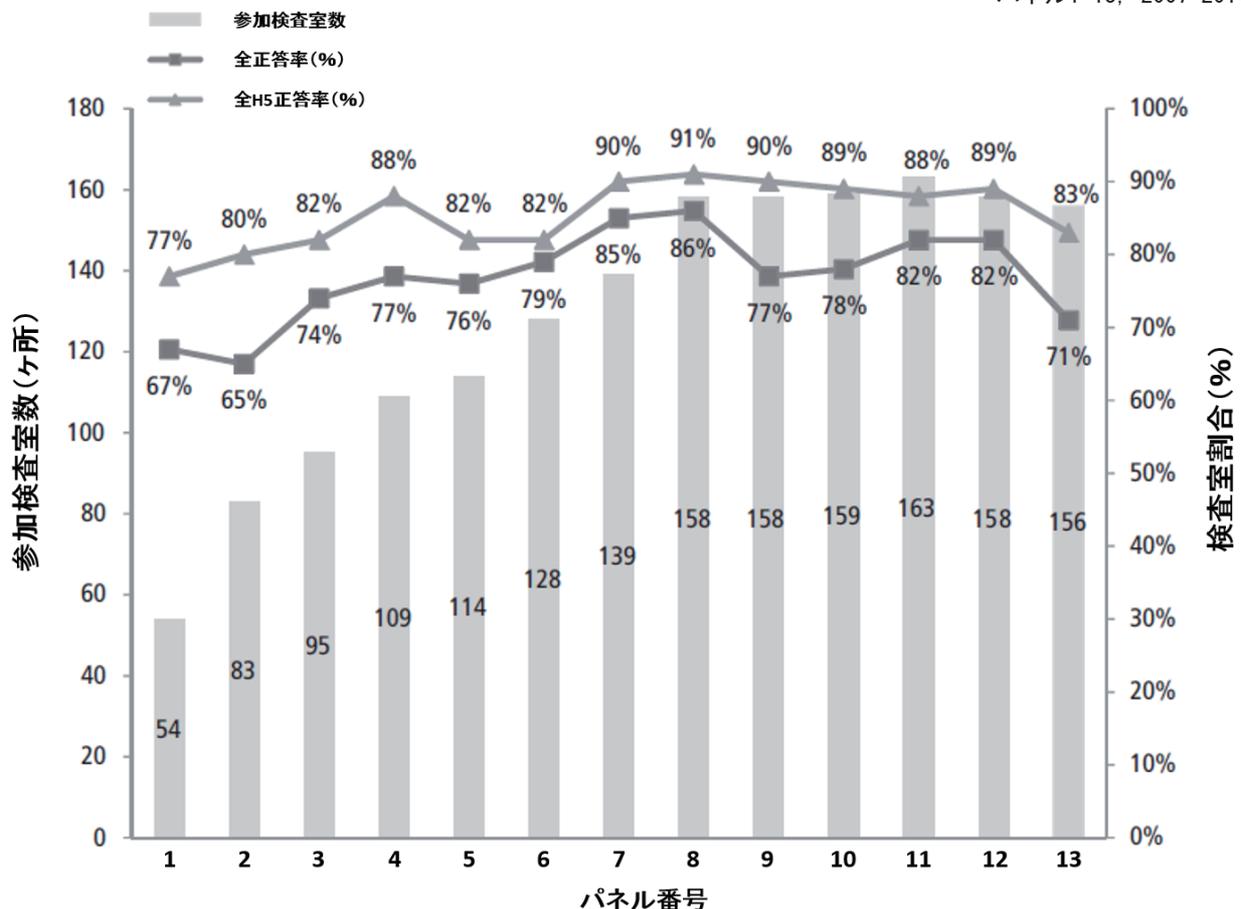
あまり一般的に認識されていない A 型 (H7N9) インフルエンザウイルス (V06 - 2014) は、105/156 (67.3%) と 30/156 (19.2%) の参加検査室が正確に検出しており、それぞれを A 型 (H7) インフルエンザとタイプ分けできない A 型インフルエンザとした。全体を通しての正確な検出率は、135/156 (86.5%) であった。6 つの参加検査室が陰性のサンプル (V05 - 2014) に対し陽性の結果を示している。偽陽性率は 3.8% であった (表 1)。

表 1 : A 型および B 型インフルエンザ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パネル構成と検査結果パネル 13 (2014) (WER 参照)

低濃度 (V01 - 2014 2.83×10^1 copies/ μ l) のヒトインフルエンザ A (H5) サンプルは、挑戦的なサンプルであったために、パネル 13 のスコアには含まれていない。パネル 13 において 9 つのスコア化されたサンプルがすべて正しい結果を返送してきた検査室の成績は 71.2% (111/156) であったが、82.7% (129/156) の検査室が 3 つのスコア化されたインフルエンザ A (H5) のサンプルがすべて正しい結果を返送してきた。全てのパネルにおける検査室の成績の比較は図 2 に示した。

図2 A型およびB型インフルエンザウイルス検出のためのWHO外部質的評価プログラム 参加検査室数

パネル1-13, 2007-2014



間違った検査結果は 62/156 (39.7%) の参加検査室によって報告され、31/156 (19.9%) は 1 つの間違いであり、31/156 (19.9%) は 1 つ以上の間違いがある検査結果を返答してきた (表 2)。

表 2 : 外部質的評価プログラムにおけるパネル 13 (2014) でのサンプルとは無関係の結果に基づいた参加検査室の成績 (WER 参照)

詳細は表 3 に示した。

表 3 : 外部質的評価プログラムにおけるパネル 13 (2014) での誤った評価結果の詳細 (WER 参照)

* 遺伝子型ノイラミニターゼ阻害薬 (NAI) の感受性試験 :

オセルタミビルによるノイラミニターゼ阻害の減少と関連のある 2 つの A 型 (H1) pdm09 インフルエンザのサンプルである V02 - 2014 と V04 - 2014 は、任意の基準に基づいて試験に含まれた。検査結果を返答してきた検査室数はどちらも 38/156 (24.4%) であった。これらの 38 の参加検査室において、様々な分析評価が用いられており、一般的な方法論はリアルタイム RT-PCR による対立遺伝子の識別 (21、55.3%)、サンガー配列決定技法 (16、42.1%)、パイロシーケンス法 (6、15.8%) そして融解曲線分析 (1、2.6%) を含んでいた。6 つの参加検査室が、検査結果の確認のためにサンガー配列決定法を含む 1 つ以上の方法を用いて報告した。

38 の V02 - 2014 の検査結果報告に関して、21 (55.3%) の参加検査室により野生型で NA 遺伝子における H275Y (H274Y N2 NA numbering) アミノ酸配列として表現されるヌクレオチドの変化 (C823T) を持つ混合型ウイルスが報告されたが、オセルタミビルによるノイラミニターゼ阻害の減少と関連のある NA H275Y アミノ酸置換については 13 (34.2%) だった。残りの 4 つ (10.5%) の参加検査室は、通常のノイラミニターゼ阻害を報告しており、そのうち 3 つの参加検査室が野生型の NA 275H を報告した。

V04 - 2014 において、32 の参加検査室が結果を報告しており、その中で 27 (84.4%) が正確に NA H275Y アミノ酸配列を報告しており、1 (3.1%) の検査室がノイラミニターゼ阻害の減少と関連のある NA 275H/Y 混合を有する A 型 (H1N1) pdm09 型を報告した。残りの 4 つ (12.5%) の参加検査室は、通常のノイラミニターゼ阻害剤を報告しており、そのうち 2 つの参加検査室が野生型の NA 275H を報告した。V02 - 2014 の検査結果を返答してきた 6 つの参加検査室は V04 - 2014 の感受性の検査結果は報告してこなかった。

* 考察 :

EQAP に参加している検査室の数は、2010 年のパネル 8 以来かなり安定している。これらのパネルにおいて、スコアを見ると、全てのサンプル及び A 型 (H5) インフルエンザの平均正答率はそれぞれ 79% と 88% であり、比較するとパネル 13 においては 71% と 83% であった。

このパネルにおいて比較的低い正答率なのは、いろいろな亜型分類成績であった A 型 (H5N1) インフルエンザ遺伝的クレード 2.2 (V01、V07 - 2014) に関連しており、(256/312=82.1%) である全体の正答率は遺伝的クレード 2.3.2.1 ウイルス (V09 - 2014 と V10 - 2014、285/312=91.3%) と比較して低かった ($P < 0.05$)。マトリックス遺伝子と血球凝集素遺伝子の遺伝的クレード 2.2 ウイルスは、明らかに (10 サイクル以上) 異なっていると一部の参加検査室から特筆されており、かなりの数の参加検査室がこれらのサンプルの結果からインフルエンザ A を分類できなかったと報告している (表 3)。低濃度の挑戦的なサンプル (V01 - 2014 2.83×10^1 copies/μl) は、解析から除外している。インフルエンザウイルスの大きな変異と遺伝的クレードの異なる場所への循環により、解析の感受性を維持するために通常検査と検査環境/方法の最適化をすることはいい練習となる。

あまり流行していないインフルエンザウイルスである A 型 (H7N9) インフルエンザウイルスサンプル V06 - 2014 が初めて含まれた。A 型 (H7) インフルエンザ亜型分類テストを実施する参加検査室の数は、パネル 12 における 17.7% (28/158) からパネル 13 では 73.1% (114/156) に有意に増加した。この増加は、WHO から示された A 型 (H7) インフルエンザ亜型分類法のタイムリーな有用性が貢献しているのではないと思われる。これらの 114 の参加検査室において、105 施設で正しい A 型 (H7) インフルエンザ亜型分類結果が報告されているが、9 施設は A 型インフルエンザを分類できていなかった。全体の正答率 86.5% (135/156) は季節性のウイルスの正答率 (93.5% 以上) と比較すると比較的少ないが、パネル 11 において初めて含まれた A 型 (H9) インフルエンザ (正答率 81.6%) よりも良かった。V06 - 2014 のために、21 の参加検査室も A 型 (H9) インフルエンザ亜型分類を確認で行っている。継続する新しいインフルエンザ危機という観点でみると、検査方法の定期的な評価と更なる特徴づけのために WHO CCs とは隔離した場所への亜型分類したサンプルの提出が強く推奨される。

このパネルにおける偽陽性率が 3.8% (6/156) だったことは、検査中起こりうる汚染かサンプリングの失敗の存在を示唆している。6 つの検査室の全てが、このパネルにおいて正しい検査結果が 5 未満だった 10 の検査室に含まれていた。参加検査室は、試薬と検査環境の質の保証に用心深くあり続けるべきである。

パネル 12 と同様に、検査室のおよそ 1/4 が遺伝子型のノイラミニターゼ阻害剤 (NAI) 感受性テストの検査結果を報告した。パネル 13 においては A 型 (H1N1) pdm09 インフルエンザサンプル (V02 - 2014)

と野生型のウイルスを混合したものと、その他は NA H275Y (45%/55%) を混合したものが含まれていた。正しい検査結果は 21 の参加検査室より報告され、そのうち 6 つの検査室は 275Y の割合 (50-70% の範囲) も報告してきており、うち 4 つがパイロシーケンス法を用いていた。NA 275Y におけるノイラミニダーゼ阻害の減少を報告してきた 13 の参加検査室と NA 275H における正常なノイラミニダーゼ阻害を報告してきた 4 つの参加検査室において、リアルタイム RT-PCR あるいはサンガー配列決定技法が用いられており、275H と 275Y の混合物の検出するための能力の差が反映されていた。

H275Y アミノ酸配列置換をもつ A 型 (H1N1) pdm09 インフルエンザウイルス (V04-2014) も含まれており、パネル 12 における同じサンプルと比較すると 28/32 (87.5%) の高い正答率を示していた。V02-2014 の検査結果を報告した 6 つの参加検査室が、このサンプルにおけるノイラミニダーゼ阻害剤 (NAI) 感受性テストの検査結果を報告しなかったのは、おそらくウイルス濃度が低いこの不活化したサンプルにおいては分析の感受性が低くなることと関連している。両サンプルにおける RT-PCR を用いて通常のノイラミニダーゼ阻害を報告した 2 つの参加検査室においては、検査環境とあるいは一連のプライマー・プローブの最適化が推奨されている。一般に、6 つ全ての検査室が一つ以上の遺伝的方法を用いて正しい結果を報告していたように、確証的な検査が有用である。抗ウイルス性の感受性サーベイランスの重要性が増大しているという観点から、WHO WQAP は任意の基準に基づいた感受性テストを含んで継続していこう。

(前沢寿亨、中山貴美子、上杉裕子)