

**今週の話題：**

＜ポリメラーゼ連鎖反応によるインフルエンザウイルスサブタイプAの検出：WHO外部品質評価プログラム要約分析、2016＞

**\* 導入：**

WHOの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）を通じて、半世紀以上にわたり、世界的なインフルエンザウイルスのサーベイランスが実施されている。現在、WHOが国立インフルエンザセンター（NICs）として認定している113のWHO加盟国に143の機関がある。研究ネットワークは、特定の新興問題に対処するために設立された6つのWHO共同研究センター（CC）、4つの必須規制研究機関、特別グループで構成されている。

インフルエンザウイルスは継続的に進化しており、また非季節性インフルエンザウイルスのパンデミックの可能性があるため、確固とした検査室診断と適時サーベイランスが不可欠である。2007年にアジアでA型インフルエンザ（H5N1）が発生した後、パンデミックの脅威となるインフルエンザA（H5）ウイルスを検出するNICの能力を評価するために、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いたインフルエンザウイルスA型検出のためのWHOの外部品質評価プログラム（EQAP）が開始された。EQAPは、季節性インフルエンザA、インフルエンザBおよびヒト感染症で報告された非季節性インフルエンザA型ウイルスにまで拡大して、参加している研究機関の成績の質と比較可能性を監視することで、長年にわたって発展してきた。*Weekly Epidemiological Record* では、パネル1～14（2007～2015）の研究機関の成績の概要が報告されている。

2016年には、このプロジェクトがWHOのグローバル・インフルエンザ・プログラムの調整の下、WHO地域事務所の支援を得て、香港特別行政区健康保健センターのH5関連実験室と国立インフルエンザセンターで実施された。

このプログラムでは現在、1年に1回の試験のために試料を発送している。このレポートは、2016年に参加した研究機関に配布された試験試料：パネル15の分析結果をまとめたものである。インフルエンザA（H1N1）pdm09ウイルスの表現型/遺伝子型ノイラミニダーゼ阻害剤（NAI）感受性試験も任意選択で含まれている。

**\* パネル 15 の準備：**

真空乾燥した不活性化インフルエンザウイルスを参加している研究機関に発送した。ウイルスをMadin-Darbyイヌ腎臓（MDCK）細胞で増殖させ、トリトンX-100によって不活性化した。以前のパネルのように、10個の無作為標本について、配布前の均質性および安定性の試験をそれぞれ行った。

**\* パネル 15 の構成：**

パネル 15 は、10 のコード化された試料（異なる濃度のインフルエンザウイルス）により構成されている：遺伝子クレード 2.3.2.1 のインフルエンザ A（H5N1）；遺伝的クレード 2.3.4.4 のインフルエンザ A（H5N6）；インフルエンザ A（H1N1）pdm09；インフルエンザ A（H3N2）；インフルエンザ A（H9N2）；インフルエンザ B（Yamagata lineage）；およびウイルスを含まない陰性コントロール試料。インフルエンザ A（H1N1）pdm09 は、NAI 感受性の表現型/遺伝子型検査のため 2 種類のサンプルが含まれている。パネルの組成の詳細を表 1a および 1b に示す。試験に先立ち、参加した研究機関は PCR グレードの水で各試料を再構成するよう指示された。EQAP 標本に使用された検査方法および遺伝子標的に関するアンケートも含まれていた。

**\* パネルの分布と研究機関の回答：**

NICs およびその他の国のインフルエンザ研究機関は、パネルが発送される前に参加に招待された。パネル 15 は、2016 年 4 月から 2016 年 6 月の間に、以前のパネルと同様に、138 の国の 174 の参加した研究機関に宅配便を用いて常温で発送された。参加した研究機関では、試料を受け取った日から 4 週間以内に結果を報告するよう求められた。パネルを受け取った 174 の研究機関のうち、151 の研究機関（86.8%）が終了日前に結果を報告した。パネル 15 の分析のために時間通りに結果を報告した WHO 加盟地域別の研究機関の数は以下の通りである。アフリカ地域（AFR）、n = 23、アメリカ地域（AMR）、n = 27、東地中海地域（EMR）、n = 12；ヨーロッパ地域（EUR）、n = 60；東南アジア地域（SEAR）、n = 5、西太平洋地域（WPR）、n = 24。

**\* 検出方法：**

調査に参加した研究機関では、様々な PCR プロトコールおよび試験方法により、インフルエンザ A 型および B 型ウイルスの検出およびインフルエンザ A 型ウイルスのサブタイプの同定が行われた。参加した研究機関の半数以上は、米国疾病対策予防センターのプロトコールを使用していた。異なる PCR プロトコールを使用しても、性能の明らかな差は得られなかった。標的遺伝子、検出方法および使用されたプライマー/プローブおよび酵素の供給源に関する詳細は、各研究機関に配布された報告書に記載された。

**\* 研究機関のパフォーマンス：**

指定された終了日に151の研究機関から返された結果のみが分析に含まれた。パネル1-14の同じ評価基準に基づいて、151研究機関のうち132 (87.4%) がすべての10検体について正しい結果を返し、141研究機関 (93.4%) が4つのA型インフルエンザ (H5) 試料すべてを正しく同定した。

2つの異なるインフルエンザA (H5) ウイルスが含まれていた。最初のもは、クレード2.3.2.1 (異なる濃度のV01-2016およびV08-2016) のヒトインフルエンザA (H5N1) ウイルスであった。正しい検出率は、それぞれ145/151研究機関 (96.0%) および150/151研究機関 (99.3%) であった。2番目はクレード2.3.4.4の鳥インフルエンザA (H5N6) ウイルス (異なる濃度のV06-2016およびV10-2016) であった。正しい検出率はそれぞれ147/151研究機関 (97.4%) および148/151研究機関 (98.0%) であった。

インフルエンザA (H1N1) pdm09試料では、V04-2016およびV07-2016の正確な検出率はそれぞれ147/151 (97.4%) および151/151研究機関 (100.0%) であった。インフルエンザA (H3N2) 試料 (V03-2016) とインフルエンザB Yamagata lineage (V02-2016) について、それぞれ146/151研究機関 (96.7%) および148/151研究機関 (98.0%) が正しい結果を報告した。

インフルエンザA (H9N2) 試料 (V09-2016) の正確な検出率は140/151施設 (92.7%) であった。試料はH9試験を実施しなかった研究機関のA型インフルエンザ (H9) (n = 42)、A型インフルエンザ (H9N2) (n = 4)、A型インフルエンザA型 (n = 93) として正確に報告された。この研究機関は、インフルエンザA検出のためにH9特異的検査を含まないインフルエンザA亜型特異的検査のみを行ったので、この試料の陰性結果を報告する追加の研究機関も正しいと評価された。ひとつの参加研究室所が、陰性検体 (V05-2016) に関して肯定的結果を報告した。偽陽性率は0.7%であった (表1a)。

このパネルでは、19/151研究機関 (12.6%) が間違った結果を報告した。合計12/151 (7.9%) の参加研究機関が誤った結果を返し、7/151研究機関 (4.6%) が2つ以上の誤った結果を返した (表2)。詳細は表3に示す。

表 1a : パネルの構成とパネル 15 (2016) の外部品質評価プログラムの結果 (WER 参照)

表 1b : オプションのノイラミニダーゼ阻害剤感受性試験のためのインフルエンザ A (H1N1) pdm09 試料の詳細 (WER 参照)

表 2 : パネル 15 (2016 年) の外部品質評価プログラムに参与する研究機関のパフォーマンス (WER 参照)

表 3 : パネル 15 (2016) の外部品質評価プログラムにおける参加した研究室で報告された不正確な結果の詳細 (WER 参照)

\* 表現型/遺伝子型ノイラミニダーゼ阻害剤感受性試験 (NAI) :

NAI 感受性試験には、2種類のインフルエンザ A (H1N1) pdm09 試料 : NAI 01-2016 (オセルタミビルによるノイラミニダーゼ阻害が著しく低下) および NAI 02-2016 (野生型) が用いられ、151 の参加研究機関のうち 47 機関 (31.1%) が NAI の結果を報告 (遺伝子型検査の結果 43、表現型検査の結果 28) した。24 の研究機関は、両方の試験を行った。

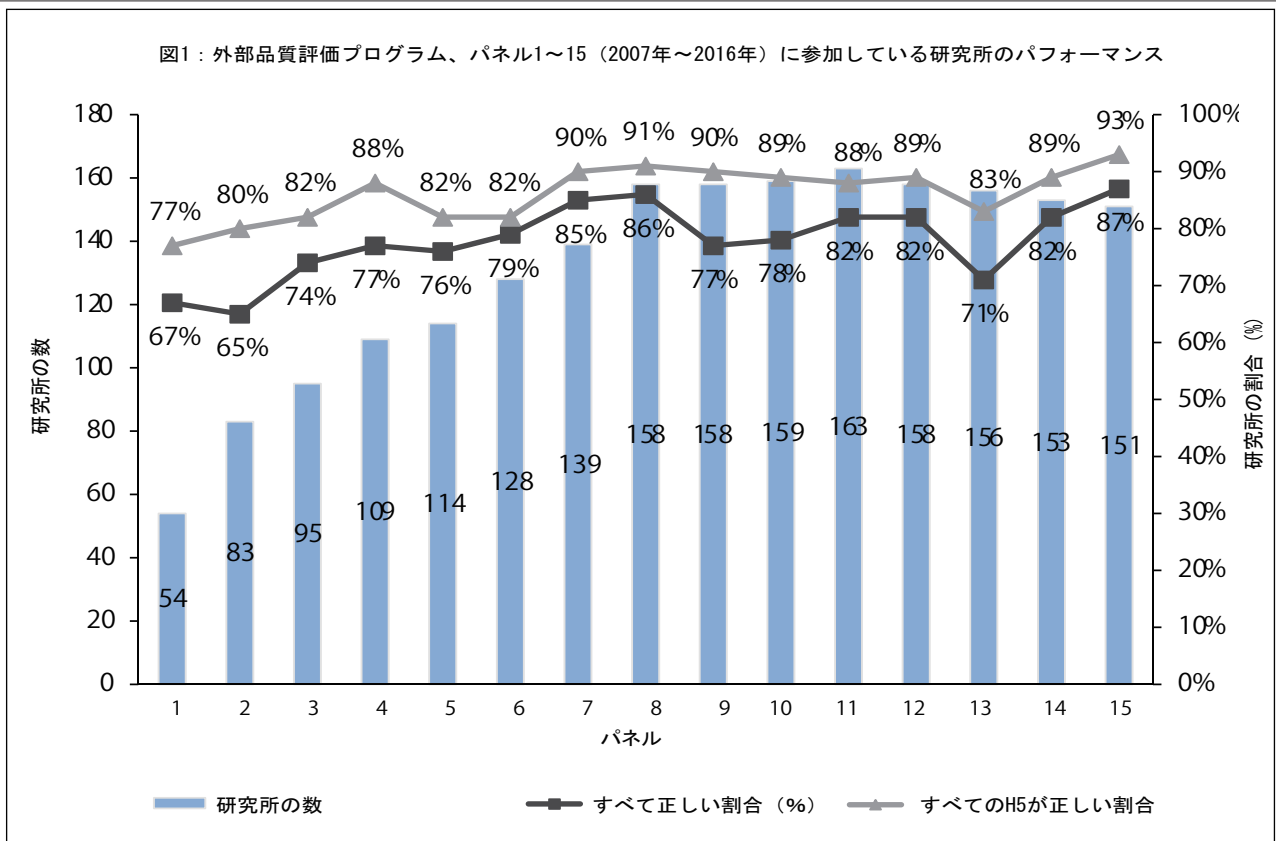
遺伝子型検査の結果、43 の研究機関が NAI01-2016 の結果を報告し、42 の研究機関が NAI02-2016 の結果を報告した。NAI01-2016 に関して、42/43 の研究機関は NA 遺伝子の塩基置換 (C823T : H275Y アミノ酸変異に対応) に起因してオセルタミビルのノイラミニダーゼ阻害効果が著しく抑制したことを報告した。6 の研究機関は、ペラミビルによるノイラミニダーゼ阻害効果も著しく減少させることを報告した。NAI02-2016 に関して、41/42 (97.6%) の研究機関が野生型インフルエンザ A (H1N1) pdm09 を報告した。1 つの研究機関は、2 つの試料について逆の結果を報告した。43 箇所の研究機関では、リアルタイム RT-PCR (25 箇所、58.1%)、サンガー法による塩基配列の決定 (15 箇所、34.9%)、パイロシーケンシング (5 箇所、11.6%)、massive parallel sequencing (ハイスループット DNA シーケンシング) (1 箇所、3.0%) による試験が行われていた。また、3 箇所では、リアルタイム RT-PCR とサンガー法による塩基配列の決定の両方が使用されていた。

表現型試験では、28 研究機関の全てが正しい結果を報告した。NAI01-2016 については、27 研究機関がオセルタミビルによる阻害効果の著しい低下を報告し、1 研究機関がオセルタミビルによる阻害効果の低下を報告した。NAI02-2016 については、28 施設すべてがオセルタミビルによる標準的な阻害を正確に報告した。両方の試料とも、ザナミビルによる標準的な阻害を示した。28 研究機関のうち、22 研究機関がザナミビルについての結果も報告し、すべてが正しかった。化学発光ベースの NA-Star / NA-XTD 分析 (n = 6) および蛍光ベースの MUNANA 分析 (n = 22) の 2 つの主要な方法論を表現型試験に使用した。両方の方法により得られた IC50 値を表 4 に要約する。

表 4 : 表現型ノイラミニダーゼ阻害剤感受性試験によって得られた IC 50 値 (WER 参照)

\* 考察 :

EQAP に参加している研究機関の数は、2010 年のパネル 8 以降かなり安定している (図 1)。これらのパネルの中で、全試料およびインフルエンザ A (H5) 試料の平均正確率は、パネル 15 の 88.9% および 93.4% と比較して、それぞれ 80.6% および 89.0% であった。



インフルエンザ A (H5N1) 遺伝的クレード 2.3.2.1 およびインフルエンザ A (H5N6) 遺伝的クレード 2.3.4.4 の両方の試料のサブタイプの性能は良好であり、このパネルで同じ正しい組み合わせ率 ( $295/302 = 97.7\%$ ) を示した。インフルエンザ A (H5) 試料の正答率は、ウイルス濃度と逆相関した。最も高い濃度のインフルエンザ A (H5N1) 試料 (V08-2016) は、1 つの誤ったサブタイプの結果のみあり、これは比較的高濃度のインフルエンザ A (H1) pdm09 試料中の隣接菌による汚染に起因する可能性が高い。インフルエンザ A (H5) 試料の 14 件の誤った結果のうち、ウイルス濃度が最も低い検体 (V01-2016) については 6 件が報告され、インフルエンザの分類不能または陰性の結果が 5 件報告された。これは、プライマー/プローブ配列におけるミスマッチを伴う分析を用いる 1 研究機関、従来の PCR を実施する 2 研究機関、および全てのパネル試料について一般的に高い Ct 値 ( $> 30$ ) を報告する 2 施設の結果に基づくと、分析感度に関連する可能性がある。別の原因の特定されたエラーは、パネル内での入れ替わりだった。他のいくつかのケースでは、誤った結果について明らかな理由が特定できなかった。

パネル 14 の中で、インフルエンザ A (H9N2) 試料では、検出の正確率は  $140/151$  ( $92.7\%$ ) であり、他の非季節性インフルエンザウイルスである A 型インフルエンザ (H7) と同様  $141/153$  ( $92.2\%$ ) だった。11 の不正確な結果のうち、6 研究機関について、1 研究機関ではプライマーマスマッチを伴う従来の PCR 分析、1 研究機関では市販のマイクロアレイ分析、4 研究機関では明白な理由が同定され得ないものを含む特定の H9 試験を実施していることを示した。H9 サブタイプ検査を実施しなかった残りの 5 研究機関については 2 研究機関が V09-2016 を他のインフルエンザ A サブタイプとして報告し、3 研究機関が陰性と報告した。インフルエンザ A 検出検査をしない非 H9 サブタイプ検査のみを行った 1 研究機関は V09-2016 を陰性と報告し、正確であると考えられた。しかし、新型やあまり流行しないインフルエンザ A 型ウイルスのサブタイプを検出するための研究機関の検査能力を維持するためには、検査アルゴリズムにおける日常的な検査法の使用が推奨される。一方、パネル 14 の中で H9 サブタイプ検査 ( $52/151$ ,  $34.4\%$ ) を行った研究機関の数は、インフルエンザ A (H7) ( $136/153$  機関,  $88.9\%$ ) よりもはるかに低かった。インフルエンザ A (H9) ウイルスの継続的な流行とパンデミックの可能性を考慮して、参加者は定期的にサブタイプ分析を採用し、検討することが奨励される。

偽陽性率は、パネル 14 の  $2.0\%$  ( $3/153$  研究機関) と比較して、パネル 15 では  $0.7\%$  ( $1/151$  研究機関) に低下した。しかし、サンプル入れ替わりの疑い ( $n=3$ ) および転写エラー ( $n=1$ ) が認められ、良好な実験室での実践の重要性が強調された。

パネル 15 では、表現型および遺伝子型 NAI 感受性試験は、引き続きオプションとして含まれていた。試験期間中の試薬の入手可能性の問題を示す研究機関はほとんどなく、全体として、分析のオンタイム収益率は、パネル 14 の  $38/153$  ( $24.8\%$ ) からパネル 15 の  $47/151$  ( $31.1\%$ ) に増加した。オセルタミビル (NAI 01-2016) によって高度に (ヌクレオチド変化の) 阻害を減少させている事に関連する NA H275Y 置換を有するインフルエンザ A (H1N1) pdm09 と野生型ウイルス (NAI 02-2016) の試料が含まれていた。



遺伝学的検査におけるパフォーマンスは概して良好であり、1 研究機関を除いて（試料の入れ替わりの可能性あり）43 施設全てが正しい結果を報告した。大規模な並列配列決定を使用して報告した1施設は、おそらく不十分な分析感度のために、NAI02-2016 の遺伝子型決定結果を提供しなかった。

28 研究機関全てが正しい表現型の解釈を報告した。2 つの試料間のノイラミニダーゼ阻害について観察された倍数差の値は、すべての研究機関について 100 以上であった。これは、NAI 01-2016 がオセルタミビルによって高度に抑制された阻害に関連する WHO の基準と一致する。初めて NAI 感受性試験の結果を返した研究機関は、NAI01-2016 がオセルタミビルによって「阻害の減少」を有すると報告したが、解釈基準を示さなかった。ザナミビルでの試験を行った全 22 の研究室は、両方の試料について正常な抑制を正確に報告した。

NAI 感受性試験の 47 の研究室のうち、大半がヨーロッパ地域（ $n = 27$ ）であり、次いで西太平洋地域（ $n = 8$ ）、アメリカ地域（ $n = 5$ ）、アフリカ地域（ $n = 3$ ）、東地中海地域（ $n = 3$ ）および東南アジア地域（ $n = 1$ ）であった。グローバルテスト能力と継続的な EQAP サポートの開発を反映した参加パターンは、特に NAI 感受性試験を最近開始した研究機関にとって有益であろう。

（北垣和史、石井豊恵、入子英幸）