

## A 型インフルエンザウイルス検出 EIA 試薬キットの評価

川崎市立川崎病院小児科<sup>1)</sup>, 川崎市衛生研究所<sup>2)</sup>

武内 可尚<sup>1)</sup> 清水 英明<sup>2)</sup>

(平成 12 年 7 月 4 日受付)

(平成 12 年 7 月 28 日受理)

---

Key words : influenza A virus, enzyme immunoassay, rapid diagnosis

---

### 要 旨

A 型インフルエンザウイルス検出 Enzyme Immunoassay 試薬キット(インフル A-AD「生研」)を咽頭拭い液を用いて, ウイルス分離法及び RT-PCR 法と比較した.

1) A 型インフルエンザウイルスが分離された 13 検体のうち, インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものは 12, RT-PCR で陽性と判定されたものは 9 であった.

2) B 型インフルエンザウイルスが分離された 7 検体のうち, インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものはなく, RT-PCR で陽性と判定されたものは 1 であった.

3) アデノウイルスが分離された 2 検体のうち, インフル A-AD「生研」及び RT-PCR で陽性と判定されたものはなかった.

4) ウイルスが分離されなかった 28 検体のうち, インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものは 6, RT-PCR で陽性と判定されたものは 8 であった.

今回検討したキットはウイルス分離と比較し, 感度 92.3%, 特異性 83.8% と優れており, 多数の検体を検査する施設では A 型インフルエンザウイルス感染の診断に有用であると思われる.

[ 感染症誌 74 : 841 ~ 845, 2000 ]

### 序 文

インフルエンザは, 悪寒, 戦慄, 全身倦怠, 筋肉痛, 関節炎, 頭痛, 咽頭痛などを伴った発熱を特徴とするインフルエンザウイルスに起因する呼吸器感染症である. インフルエンザウイルスは A 型, B 型及び C 型<sup>1)</sup>に分けられ, この中で, A 型と B 型は毎年, 広範囲に爆発的な流行を引き起こすことから社会的, 経済的問題になっている. さらにインフルエンザウイルスは, 高齢者, 小児, 妊婦, 呼吸器疾患患者に時として重篤な合併症を引き起こし<sup>2)</sup>, その進行が極めて早いことから, 迅速

な診断と治療が求められる. なかでも高齢者や幼小児ではインフルエンザは全身感染症のおそれさえある. 特に A 型インフルエンザウイルスに対しては抗ウイルス薬のアマンタジン<sup>3)</sup>が使用できるようになった今, インフルエンザの迅速診断の意義は極めて大きい.

これまで A 型インフルエンザウイルスの検査法として, ウイルス分離法が主に用いられていたが, 煩雑な無菌操作が必要で, 結果が得られるまでには長期間を要する. また, A 型インフルエンザウイルス特異的 RNA を検出する Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法は高感度で迅速診断法として有用だが, 遺伝子を取り扱う施設が必要なことと, 手技が煩雑なこ

---

別刷請求先 : (〒210-0013) 神奈川県川崎市川崎区新川通 12-1

川崎市立川崎病院小児科 武田 可尚

平成12年10月20日

とから，一般検査室のルーチン検査に導入することは難しい．

今回我々は，これらの問題を解決するために開発された A 型インフルエンザウイルス検出試薬：インフル A-AD<sup>®</sup> 生研（デンカ生研製）を使用する機会を得，ウイルス分離と RT-PCR 法と比較しながら検討を行ったのでその有用性について報告する．

## 材料と方法

### 1) 検体

1998 年から 1999 年のインフルエンザシーズンに川崎市立川崎病院小児科を訪れインフルエンザ様症状を呈した患者の中で，A 型インフルエンザウイルスが分離された 13 例（すべて H3N2 が分離された），B 型インフルエンザウイルスが分離された 7 例，アデノウイルスが分離された 2 例，ウイルスが分離されなかった 28 例，計 50 例の咽頭拭い液を検体とした．咽頭拭い液は -80℃ に保存されているものを使用した．

### 2) ウイルス分離

患者から綿棒で採取した検体を 2mL の 0.5% 牛血清アルブミン添加リン酸緩衝液で浮遊し（咽頭拭い液），3,000 回転 20 分間遠心後，上清を Mardin-Darby canine kidney（MDCK）細胞に接種し 34℃ で 1 週間培養後細胞変性効果を確認した後，フェレット感染血清を用いた交差 Hemagglutination Inhibition（HI）試験により分離ウイルスを同定した．

### 3) RT-PCR<sup>4)</sup>

検体 200μl を材料として，RNA を抽出し，逆転酵素で cDNA を作製後，nested PCR にて増幅し，アガロースゲル電気泳動で A 型インフルエンザウイルス（H3N2）RNA の特異的バンドを確認した．

### 4) 検出用キット

A 型インフルエンザウイルス検出用としてインフル A-AD<sup>®</sup> 生研（デンカ生研製）を用いた．原理はマイクロプレートを用いた抗原検出サンドイッチ法による Enzyme Immunoassay（EIA）試薬で，その概要を Fig. 1 に示した．なお，2) ウイルス分離で記載した咽頭拭い液をそのまま 100μl

Fig. 1 Assay flowchart for Influenza A-AD<sup>®</sup> "Seiken"

|                                                                   |                       |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Pre-diluted specimens                                             | 100 μl                |
| ( Add to anti-influenzavirus type A coated well )                 |                       |
| ↓                                                                 |                       |
| Incubation                                                        | 1 hour at 15 ~ 25     |
| ↓                                                                 |                       |
| Wash                                                              | Repeat 3 times        |
| ↓                                                                 |                       |
| Peroxydase labeled anti-influenzavirus type A monoclonal antibody | 100 μl                |
| ↓                                                                 |                       |
| Incubation                                                        | 1 hour at 15 ~ 25     |
| ↓                                                                 |                       |
| Wash                                                              | Repeat 5 times        |
| ↓                                                                 |                       |
| TMB and hydrogen peroxide                                         | 100 μl                |
| ↓                                                                 |                       |
| Incubation                                                        | 30 minutes at 15 ~ 25 |
| ↓                                                                 |                       |
| 0.6 N sulfuric acid                                               | 100 μl                |
| ↓                                                                 |                       |
| Measurement                                                       | Wavelength 450 nm     |

|                                      |          |
|--------------------------------------|----------|
| Interpretation of test results       |          |
| When OD of each specimen is          |          |
| Higher than OD of Positive control ; | positive |
| Lower than OD of Positive control ;  | negative |

プレートに反応させた．

キット添付の陰性コントロールは PBS に 0.5% ゼラチンを加えた液であり，陽性コントロールは陰性コントロールに A 型インフルエンザウイルスが検出限界（約 10<sup>3</sup> pfu/mL）となるよう調製されたものである．また本キットは，添付の取扱説明書によれば A 型インフルエンザウイルス 23 種類（うち H1N1 : 8 種類，H2N2 : 3 種類，H3N2 : 12 種類）と反応が認められており，B 型インフルエンザウイルス 19 種類をはじめとする，各種ウイルス，クラミジア，マイコプラズマ，細菌とは反応性が認められていない．

## 成績

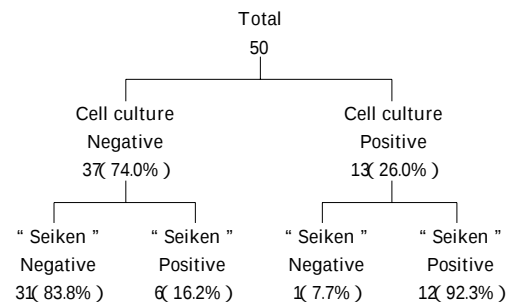
結果を Table 1 及び Fig. 2 に示した．

A 型インフルエンザウイルスが分離された 13 検体のうち，インフル A-AD<sup>®</sup> 生研<sup>®</sup> で陽性と判定されたものは 12 陰性と判定されたものは 1（感度 92.3%）であった．またその中で RT-PCR で陽性と判定されたものは 9 検体であったが，そのすべて

Table 1

| Specimen number  | Influ A-AD<br>" Seiken " |        | RT-PCR | Cell culture            |
|------------------|--------------------------|--------|--------|-------------------------|
|                  | OD                       | result |        |                         |
| 1                | 2.420                    | +      | +      | Influenza type A (H3N2) |
| 2                | 2.270                    | +      | +      | "                       |
| 3                | 1.600                    | +      | +      | "                       |
| 4                | 1.552                    | +      | +      | "                       |
| 5                | 1.355                    | +      | +      | "                       |
| 6                | 0.868                    | +      | +      | "                       |
| 7                | 0.400                    | +      | +      | "                       |
| 8                | 0.250                    | +      | +      | "                       |
| 9                | 0.153                    | +      | +      | "                       |
| 10               | 0.234                    | +      | -      | "                       |
| 11               | 0.152                    | +      | -      | "                       |
| 12               | 0.112                    | +      | -      | "                       |
| 13               | 0.067                    | -      | -      | "                       |
| 14               | 0.049                    | -      | +      | Influenza type B        |
| 15               | 0.065                    | -      | -      | "                       |
| 16               | 0.052                    | -      | -      | "                       |
| 17               | 0.045                    | -      | -      | "                       |
| 18               | 0.040                    | -      | -      | "                       |
| 19               | 0.037                    | -      | -      | "                       |
| 20               | 0.032                    | -      | -      | "                       |
| 21               | 0.090                    | -      | -      | Adeno Type 1            |
| 22               | 0.051                    | -      | -      | Adeno Type 2            |
| 23               | 2.559                    | +      | +      | not isolated            |
| 24               | 1.412                    | +      | +      | "                       |
| 25               | 0.513                    | +      | +      | "                       |
| 26               | 0.117                    | +      | +      | "                       |
| 27               | 0.117                    | +      | +      | "                       |
| 28               | 0.072                    | -      | +      | "                       |
| 29               | 0.038                    | -      | +      | "                       |
| 30               | 0.033                    | -      | +      | "                       |
| 31               | 0.819                    | +      | -      | "                       |
| 32               | 0.097                    | -      | -      | "                       |
| 33               | 0.075                    | -      | -      | "                       |
| 34               | 0.068                    | -      | -      | "                       |
| 35               | 0.057                    | -      | -      | "                       |
| 36               | 0.055                    | -      | -      | "                       |
| 37               | 0.053                    | -      | -      | "                       |
| 38               | 0.047                    | -      | -      | "                       |
| 39               | 0.046                    | -      | -      | "                       |
| 40               | 0.045                    | -      | -      | "                       |
| 41               | 0.044                    | -      | -      | "                       |
| 42               | 0.042                    | -      | -      | "                       |
| 43               | 0.041                    | -      | -      | "                       |
| 44               | 0.040                    | -      | -      | "                       |
| 45               | 0.040                    | -      | -      | "                       |
| 46               | 0.039                    | -      | -      | "                       |
| 47               | 0.039                    | -      | -      | "                       |
| 48               | 0.036                    | -      | -      | "                       |
| 49               | 0.032                    | -      | -      | "                       |
| 50               | 0.031                    | -      | -      | "                       |
| Negative control | 0.041                    |        |        |                         |
| Positive control | 0.105                    |        |        |                         |

Fig. 2



がインフル A-AD「生研」で陽性と判定された。

B 型インフルエンザウイルスが分離された 7 検体のなかで、インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものではなく、RT-PCR で陽性と判定されたものが 1 検体存在した。

アデノウイルスが分離された 2 検体のなかで、インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものではなく、RT-PCR で陽性と判定されたものも存在しなかった。

ウイルスが分離されなかった 28 検体のうち、インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものは 6 検体と判定されたものは 22 であった。インフル A-AD「生研」で陽性と判定された 6 検体のうち 5 検体が RT-PCR でも陽性も判定された。さらにインフル A-AD「生研」で陰性と判定された 22 検体のうち 3 検体は RT-PCR で陽性と判定された。

### 考 察

今回我々は、最近開発された A 型インフルエンザウイルス検出試薬、インフル A-AD「生研」の評価をウイルス分離・RT-PCR と比較することで検討した。

本キットは、原理がマイクロプレートを用いた抗原検出サンドイッチ法によるためか、全反応時間が 2 時間半、各反応ステップの間に 3 回と 5 回の洗浄操作があり、医師がベッドサイドで使用するのには不適當である。しかしながら、検体が多数集まるような病院の中央検査部や外部の検査センターで使用するのであれば操作性から便利な点も多い。

性能的には A 型インフルエンザウイルスが分

離された13検体のうち、インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものが12と極めて良好な結果が得られた。RT-PCR<sup>4)</sup>では A 型インフルエンザウイルスが分離された13検体のうち陽性と判定されたものは9、陰性と判定されたものは4であった。陰性と判定された4検体については -80℃ の凍結保存検体を用いたため凍結融解等によりインフルエンザウイルスの RNA が分解し検出できなかったものと思われる。

B 型インフルエンザウイルスやアデノウイルスが分離された検体のなかでは、インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものはなかった。これは本キットの特異性が優れていることを示している。

しかしながらウイルスが分離されなかった28例のうち、インフル A-AD「生研」で陽性と判定されたものが6例存在した。そのうち5例が RT-PCR で特異 RNA が認められていることから、綿棒で採取した A 型インフルエンザウイルスの感染性が何らかの理由で失活したためウイルスが分離できなかったものと思われる。また A 型インフルエンザウイルスが分離されず、RT-PCR でも特異 RNA が検出されていないのにも関わらず、インフル A-AD「生研」で陽性と判定された例が1例存在し(検体番号31)、OD も0.819と高値であった。この理由はよくわからないが、今後検体数を増やしデータを蓄積していきながら検討したい。

本キットは咽頭拭い液のみを検体としている。日本では、インフルエンザウイルスを検出するための検体はほとんどが咽頭拭い液であるが、乳幼児の場合鼻咽頭吸引液も利用できる。インフルエンザウイルスの検出率は、咽頭拭い液を検体とし

た場合より、鼻咽頭吸引液を検体としたときの方が良いとされており<sup>5)</sup>、今後鼻咽頭吸引液で使用可能なキットを要望したい。

さらに、現在 A 型インフルエンザウイルスの治療及び予防薬として、アマンタジン<sup>3)</sup>が認可されているが、最近 A 型及び B 型インフルエンザウイルスに効果のある治療薬(ノイラミダーゼ阻害剤<sup>9)</sup>)もオーストラリアや欧米で認可された。従って B 型インフルエンザウイルスの検出に対しても診断の重要性は高まることが予想され、A 型同様 B 型に対しても感度の良い検出試薬を期待したい。

今回検討したキットはウイルス分離と比較して感度 92.3%、特異性 83.8% と良好であり、B 型インフルエンザウイルスが分離された例及びアデノウイルスが分離された例において交差反応を全く示さず、今後の A 型インフルエンザウイルス感染の診断に有用であると思われる。

#### 文 献

- 1) 加地正郎：インフルエンザとかぜ症候群。南山堂，1998；10。
- 2) 山腰雅宏，鈴木幹三，山本俊信，他：特別養護老人ホームで流行した高齢者インフルエンザ A (H3N2) の検討。感染症誌 1996；70：449-455。
- 3) 菅谷憲夫：インフルエンザ対策—ワクチンとアマンタジン。日本医事新報 1999；3900：37-43。
- 4) 清水英明，渡辺寿美，今井光信：Nested-PCR 法によるインフルエンザウイルスの検出。感染症誌 1997；71：522-526。
- 5) 山崎雅彦，木村和弘，渡辺寿美，他：鼻咽頭吸引液を検体とした Optical Immunoassay 法によるインフルエンザ迅速診断。感染症誌 1999；73：1064-1068。
- 6) Hayden FG, Osterhaus A, Treanor JJ *et al.* : Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. N Engl J Med 1997；337：874-880。

## Evaluation of Influenza Virus Type A Detection Kit

Yoshinao TAKEUCHI<sup>1)</sup> & Hideaki SHIMIZU<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Pediatrics, Kawasaki Municipal Hospital<sup>2)</sup>Kawasaki City Institute of Public Health

We evaluated a new Influenza Virus Type A Detection Kit( Influa-AD “ Seiken ” )and compared it to virus isolation and RT-PCR using throat swab specimens. Our results were as follows : 1 ) From 13 specimens in which Influenza virus type A was isolated, Influa-AD “ Seiken ” detected 12 while RT-PCR detected 9.

2 ) From 7 specimens in which Influenza virus type B was isolated, Influa-AD “ Seiken ” detected 0 while RT-PCR detected 1.

3 ) From 2 specimens in which Adeno virus was isolated, Influa-AD “ Seiken ” detected 0 and RT-PCR detected 0.

4 ) From 28 specimens in which no virus was isolated, Influa-AD “ Seiken ” detected 6 while RT-PCR detected 8.

Influa-AD “ Seiken ” showed a sensitivity of 92.3% and specificity of 83.8% when compared to virus isolation. We conclude that the new test will be useful for the diagnosis of Influenza virus type A infection particularly in big commercial laboratories.