

インフルエンザウイルス A, B 型を区別して検出可能な 迅速診断キットの臨床的検討

¹秦野赤十字病院小児科, ²伊勢原協同病院小児科, ³日本鋼管病院小児科,
⁴伊勢原協同病院検査室, ⁵神奈川県衛生研究所

山崎 雅彦¹⁾ 木村 和弘²⁾ 三田村敬子³⁾ 渡邊 寿美⁵⁾
込山 修²⁾ 山本 敬一²⁾ 市川 正孝²⁾ 橋本 洋子⁴⁾
萩原 紀子⁴⁾ 前沢 民子⁴⁾ 今井 光信⁵⁾ 菅谷 憲夫³⁾

(平成 12 年 9 月 18 日受付)

(平成 12 年 9 月 26 日受理)

Key words : influenza, rapid diagnosis, nasal aspirate, enzyme immunoassay

要 旨

インフルエンザの A 型, B 型が鑑別可能な迅速診断キット, Directigen™ Flu A + B (Becton Dickinson and Company, USA) を検討した。対象は, 2000 年 1 月から 3 月のインフルエンザ様疾患の患者 239 例で, 検体は鼻咽頭吸引液を用いた。このうちウイルス分離陽性は 128 検体で (AH1 : 77, AH3 : 51), 陰性は 111 検体であった。Directigen™ Flu A + B 陽性は 120 検体, 陰性は 119 検体で, ウイルス分離と比較すると, 感度 89.8%, 特異度 95.5% となった。本キットとディレクティジェン Flu A との比較では, 陽性と陰性の判定は 97.9% (234/239) が一致した。

B 型インフルエンザに関する検討は, 1999 年 2 月から 4 月に採取された, 鼻咽頭吸引液凍結保存検体 60 検体を用いて行った。本キットはウイルス分離と比較して, 感度 88.9%, 特異度 88.1% であった。インフルエンザ OIA® との比較では, 判定は 91.7% (55/60) が一致した。

Directigen™ Flu A + B は, 鼻咽頭吸引液では, 従来のキットと同等の感度, 特異度, 迅速性を示し, さらに, A 型と B 型のウイルスを区別して検出できることから, アマンタジンやノイラミニダーゼ阻害剤の抗インフルエンザ薬の投与に際しての判断基準などとして, より有用である。

[感染症誌 74 : 1032 ~ 1037, 2000]

序 文

インフルエンザは, 冬季の呼吸器感染症として重要な疾患であり, 乳幼児, 老人, 基礎疾患を持つハイリスク患者を中心に, 重症合併症¹⁾を引き起こすことが知られており, 特に最近ではインフルエンザ脳炎・脳症²⁾や, 施設内流行³⁾などの報告が相

次ぎ, 対策が望まれている。

インフルエンザの治療については, 1998 年からアマンタジンが A 型インフルエンザに対する適応を認められ, 治療薬として定着しつつある。また, 海外ではノイラミニダーゼ阻害剤¹⁰⁾¹¹⁾も発売となり, 抗ウイルス剤の投与を視野にいれた, 臨床におけるインフルエンザの迅速診断の必要性, 重要性は従来に増して高まっている。

これまでインフルエンザの診断は, ペア血清の

別刷請求先 : (〒257 0045) 神奈川県秦野市桜町 1

4 5

秦野赤十字病院小児科 山崎 雅彦

抗体価の上昇,あるいはウイルス分離やPCR (polymerase chain reaction) などでのウイルス検出によるもので,時間やコストの面で実際の診療に反映することは難しい面があった。しかし,1999年に発売されたA型インフルエンザ迅速診断キット^{5,6)}の登場により,リアルタイムの診断が可能となり,診療面にも大きな変化をもたらした。次いでA,B型インフルエンザウイルス検出キット⁷⁾⁻⁹⁾が発売されたが,A型,B型をまとめて検出するもので,区別することはできない。

今回,酵素抗体法 (enzyme immunoassay : EIA) を用い, A 型, B 型を区別して検出することができる,インフルエンザ迅速診断キット Directigen™ Flu A+B (Becton Dickinson & Company, USA) を,インフルエンザシーズンに使用し,ウイルス分離,PCR,他のインフルエンザ迅速診断キットとの比較検討を行った。

材料と方法

<対象>

2000年1月7日から3月27日の間に,伊勢原協同病院小児科(以下病院)をインフルエンザ様症状で受診した,外来および入院患者,計239例を対象に,鼻咽頭吸引液239検体を採取した。

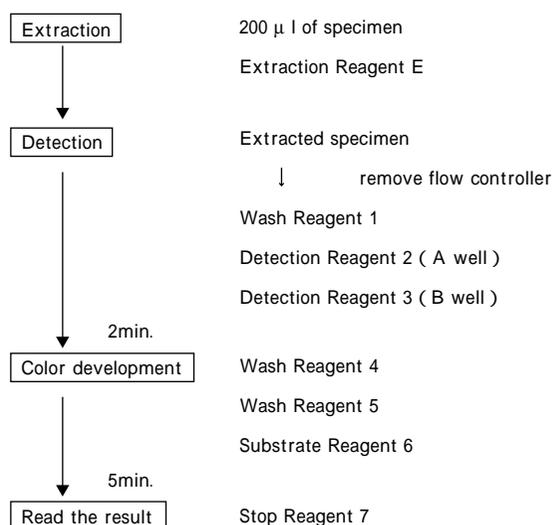
<材料と方法>

材料として用いた鼻咽頭吸引液は,テルモ社製P型吸引カテーテル(トラップ付)を使用して,これまでの報告⁷⁾と同様の方法で採取し,0.5%ゼラチン加リン酸緩衝液(phosphate buffered saline : PBS) 2mlで希釈して検体とした。採取した検体は迅速診断の後,残りを冷蔵のまま神奈川県衛生研究所(以下衛研)に輸送し,ウイルス分離の後-70℃にて保存した。

Directigen™ Flu A+Bによる結果判定は2施設で行い,病院では127検体を採取直後に判定した。残りの112検体を含む全239検体は,一度凍結融解した後に衛研で判定した。

今シーズン分離されたインフルエンザウイルスは,全てA型であったため,B型インフルエンザに対する検討は,1999年2月から4月に採取し,ウイルス分離と他の迅速診断を検査した後,1年間-70℃に冷凍保存されていた鼻咽頭吸引液60

Fig. 1 Directigen™ Flu A + B test procedure



検体を用いて行った。

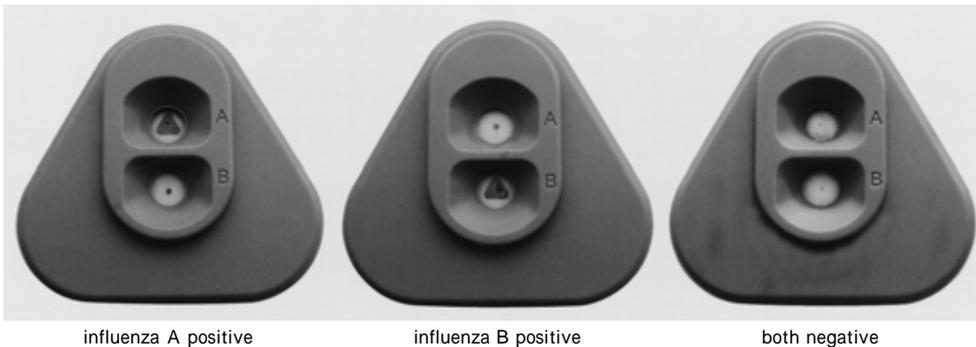
比較検査として,ウイルス分離,nested RT-PCR,および既に発売されているインフルエンザウイルス迅速診断キットを検査した。ウイルス分離は,MDCK (Madin-Darby canine kidney)細胞を用い,2代まで継代して細胞変性を確認し,特異血清により同定した。キットとウイルス分離の結果が不一致の検体は,nested RT-PCRによりインフルエンザHA (Hemagglutinin) 遺伝子の検出を行った。他のインフルエンザウイルス迅速診断キットとの比較は,A型インフルエンザについては,ディレクティジェンFlu A (日本ベクトン・ディッキンソン)と,B型インフルエンザについては,インフルエンザOIA® (第一化学薬品)と比較した。

<Directigen™ Flu A + B>

Directigen™ Flu A+Bは,ディレクティジェンFlu Aと同じ原理の,膜フィルターを用いたEIAによるインフルエンザ迅速診断キットで,A型,B型それぞれのインフルエンザウイルス核蛋白に対するモノクローナル抗体を用いて,2つの反応面で別々にA型,B型を検出する。

本キットは,カラーパックと呼ばれる反応ディスクと,8種類の試薬で構成されている。操作手順は,検体200μlに抽出液を加え攪拌した液をフィ

Fig. 2 Positive and negative reaction of Directigen™ Flu A + B



ルターで濾過し、カラーパックの2つの反応面 (well) にそれぞれ4滴ずつ分注する。フローコントローラーをはずし、洗浄後、上側のwellにA型、下側のwellにB型の検出試薬(モノクローナル抗体)をそれぞれ滴下し、2分間放置する。その後洗浄液2種類と基質を滴下し、5分後に停止液を加えて判定する。全手順は10分程度で行うことができる (Fig. 1)。陽性の場合には、反応面に紫色の三角形を認め、陰性の場合には、中心部にコントロールのドットのみとなる。弱陽性の場合には、薄い紫色の三角形とともに、中心のコントロールの点も観察される (Fig. 2)。

成績

迅速診断キットを、検体採取直後に凍結することなく判定した127検体(以下新鮮検体)と、一度凍結融解後判定した112検体(以下凍結検体)の合計239検体について、あわせて検討を行った。ウイルス分離陽性は128検体、ウイルス分離陰性は111検体であった。分離ウイルスは、全てA型インフルエンザウイルスで、Aソ連型が77株、香港型が51株であった。

Directigen™ Flu A + Bをウイルス分離と比較すると、感度89.8%(115/128)、特異度95.5%(106/111)、陽性反応的中率95.8%(115/120)、陰性反応的中率89.1%(106/119)となった (Table 1)。亜型別の感度は、Aソ連型が87.0%(67/77)、A香港型が94.1%(48/51)となり、有意差は認められなかった。

ウイルス分離陰性、本キット陽性の5検体は、

Table 1 Comparison of Directigen™ Flu A + B and isolation of influenza A virus in cell culture

	Culture			Sensitivity (95% CI : 84.6 - 95.0%)	
	(+)	(-)	total		
Directigen™ Flu A + B	115	5*	120	95.8%	
	(-)	13	106	89.1%	
	total	128	111	239	92.5%

PPV : Positive predictive value NPV : Negative predictive value

* All samples are PCR positive

CI : Confidence interval

Table 2 Comparison of Directigen™ Flu A + B and Directigen™ Flu A for detection of influenza A virus in nasopharyngeal aspirates

	Directigen™		Flu A	total
	(+)	(-)		
Directigen™ Flu A + B	119	1*1	120	120
	(-)	4*2	115	119
	total	123	116	239

* 1 : This sample is PCR positive.

* 2 : All samples are PCR negative.

PCRでは陽性となり、この結果で修正すると、感度90.2%(120/133)、特異度100%(106/106)、陽性反応的中率100%(120/120)、陰性反応的中率89.1%(106/119)となった。

同じ検体のディレクティジェン Flu A の成績は、感度92.2%(118/128)、特異度95.5%(106/111)であった。ウイルス分離陽性検体はディレクティ

Table 3 Comparison of Directigen™ Flu A + B and isolation of influenza B virus in cell culture

	Culture		total	Sensitivity 88.9% (95% CI : 74.4 - 100%)	Specificity 88.1% (95% CI : 78.3 - 97.9%)	PPV 76.2%	NPV 94.9%	Efficiency 88.3%
	(+)	(-)						
Directigen™ (+)	16	5*	21					
Flu A + B (-)	2	37	39					
total	18	42	60					

PPV : Positive predictive value NPV : Negative predictive value

* All samples are PCR positive

CI : Confidence interval

Table 4 Comparison of Directigen™ Flu A + B and FLU OIA® for detection of influenza B virus in nasopharyngeal aspirates

	FLU OIA®		total
	(+)	(-)	
Directigen™ (+)	19	2*1	21
Flu A + B (-)	3*2	36	39
total	22	38	60

* 1 : All samples are PCR positive.

* 2 : All samples are PCR negative.

ジェン Flu A の方が 3 例多く陽性を示したため感度は高い値となったが, 両キットの陽性と陰性の判定は 97.9% (234/239) が一致していた (Table 2).

新鮮検体 127 検体については, 衛研で凍結融解した後再度判定した. 2 施設における判定の不一致はウイルス分離陽性の 4 検体でみられ, 病院のみが陽性と判定した検体が 3 検体, 衛研のみが陽性と判定した検体が 1 検体で, 96.9% (123/127) の判定結果が一致した.

B 型インフルエンザについての検討を行った昨年の冷凍検体は, ウイルス分離で B 型インフルエンザウイルス陽性は 18 検体, 分離陰性は 42 検体であった. ウイルス分離陽性 18 検体中, 本キットも陽性は 16 検体で, 感度 88.9%, ウイルス分離陰性 42 検体中, 本キットも陰性だったのは 37 検体で, 特異度 88.1% であった (Table 3). ウイルス分離陰性, 本キット陽性の 5 検体は, PCR では陽性を示し, この結果で修正すると感度 90.2% (120

/133), 特異度 100% (106/106) となった.

同じ検体のインフルエンザ OIA® の成績は, ウイルス分離と比較して感度 83.3% (15/18), 特異度 83.3% (35/42) で, Directigen™ Flu A + B とは 91.7% (55/60) の結果が一致した (Table 4).

考 察

我が国でのインフルエンザの流行は, 1998/1999 シーズンの前半は A 香港型インフルエンザ, 後半は B 型インフルエンザが主に流行し, 1999/2000 シーズンは A 香港型と A ソ連型の混合流行であった. インフルエンザは, 年毎に流行型が変化するが, 最近は B 型インフルエンザが定期的に流行する傾向がみられている. 小児では, B 型インフルエンザも, A 香港型インフルエンザと同様に重要で, 入院となることも少なくないため^{12,13)}, A 型, B 型両方のインフルエンザが検出できる迅速検出キットの必要性はより高い. 昨シーズンの, インフルエンザ迅速検出キットの使用経験^{7,8)}からも, B 型インフルエンザも検出可能なキットの有用性が高いことは明らかであった. しかし現在使用されているキットは, A 型, B 型を同時にまとめて検出するもので区別することはできない. 年齢や基礎疾患などによって A 型と B 型の重要性は異なることから, 両者を区別して検出できるキットは, より有用性が高いと思われる.

現在, 国内では, インフルエンザ迅速診断キットとして, A 型インフルエンザに対するディレクティジェン Flu A と, A 型, B 型を同時にまとめて検出するインフルエンザ OIA® (第一化学薬品) が市販されている. 今回の成績では, ディレクティジェン Flu A 陽性でも, Directigen™ Flu A + B が陰性だったものが 239 検体中 5 検体みられたが 2 つのキットの一致率は 97.9% と高く, 両者の感度に有意差は認められなかった. また, インフルエンザ OIA® と Directigen™ Flu A + B の比較では, 感度, 特異度とも Directigen™ Flu A + B のほうが若干高い数値であったが, 検定の結果, 有意とはいえないものであった. 用いた検体は凍結融解後の, B 型インフルエンザのみであったため, インフルエンザ OIA® との比較については A 型インフルエンザも含む新鮮検体を用いた

再検討が必要である。

以上の結果から、Directigen™ Flu A + B は、鼻咽頭吸引液の使用では、感度、特異度とも高く、特に PCR を加えた結果では特異度 100% となることから、偽陽性が非常に少ないことが示された。また、各亜型の検討では、ウイルス分離と比較した感度は、A 香港型が 94.1%、A ソ連型が 87.0%、B 型が 88.9% で、鼻咽頭吸引液を用いれば、A 型、B 型いずれのインフルエンザに対する感度も同等であることから、流行型によらず、シーズンを通して一定の検査精度が期待できるものと思われる。

操作については、ディレクティジェン Flu A とほとんど手順は同じであるが、2 つの well にそれぞれ試薬を入れるのに多少面倒さがある。しかし 2 種類の試薬（洗浄液と基質）を減らし簡略化が図られており、検査に要する時間はほぼ変わらない。ただ、判定者からは、ディレクティジェン Flu A に比べて反応面がクリアでなく、判定が見にくい場合があるとの指摘があった。フィルターや反応面の大きさの違いと、試薬を減らしたためと推測される。しかし、鼻咽頭吸引液では、反応の強さが中～強陽性のことが多く（A 型では 96%、B 型では 71%）、判定不能になることは少ないと思われる。

今回の検討では、キットの準備の都合で、新鮮検体と凍結検体を 2 施設で判定することとなったが、同じ検体を両方で判定した 127 検体のうち、判定結果の不一致は 4 検体であった（一致率 96.9%）。不一致の 4 検体は弱陽性と陰性の微妙な差であり、判定者の違い、あるいは検体を一度凍結融解したことによる判定結果の影響も比較的小さいと思われる。

インフルエンザの治療については、既に許可されているアマンタジンに加えて、ノイラミニダーゼ阻害剤の治療も進められている。Directigen™ Flu A+B は型別の検出が可能のために、どちらの抗ウイルス剤の治療決定についても対応が可能で、アマンタジンが唯一の抗インフルエンザ薬である現状では、B 型に投与するなどの乱用を防ぎ、適正な投与が可能となるとと思われる。また今後期

待される Zanamivir や Oseltamivir 等のノイラミニダーゼ阻害剤は、A 型、B 型両方のインフルエンザに対して治療効果があるため、その臨床使用に際しての判断にも利用が期待される。

文 献

- 1) 武内可尚：インフルエンザの重症合併症。小児科 1998；39：125 138.
- 2) 富樫武弘，古田博文，松園嘉裕，武越靖郎，穴倉迪彌，長野奈緒子：インフルエンザ流行期に発症した小児急性脳炎・脳症。日児誌 1999；103：1202 1209.
- 3) 長坂祐二：精神病院におけるインフルエンザ集団感染について。臨床とウイルス 1999；27：387 405.
- 4) Sugaya N, Kusumoto N, Suzuki Y, Nerome R, Nerome K : Large sequential outbreaks caused by influenza A (H3N2) and B virus in an institution for mentally handicapped people. J Med Virol 1996；50：120 125.
- 5) 三田村敬子，菅谷憲夫，萑澤真理，高橋浩治，清水英明，平位芳江：小児科入院患者から見た A 香港型インフルエンザの流行と迅速診断。感染症誌 1998；72：883 889.
- 6) 清水英明，渡邊寿美，川上千春，他：ELISA を用いた A 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの検討。感染症誌 1998；72：827 833.
- 7) 山崎雅彦，木村和弘，渡邊寿美，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.
- 8) 三田村敬子，菅谷憲夫，清水英明，他：Optical Immunoassay による A，B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの臨床的検討。感染症誌 1999；73：1069 1073.
- 9) 渡邊寿美，清水英明，川上千春，今井光信：インフルエンザウイルス抗原迅速検出キットの検討。感染症誌 1999；73：1199 1204.
- 10) Hayden FG, Osterhaus ADME, Treanor JJ *et al.* : Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor Zanamivir. In the treatment of influenza-zavirus infection. N Engl J Med 1997；337：874 880.
- 11) Hayden FG, Atmar RL, Schilling M *et al.* : Use of the selective oral neuraminidase inhibitor Oseltamivir to prevent influenza. N Engl J Med 1999；341：1336 1343.
- 12) Sugaya N, Nerome K, Ishida M *et al.* : Impact of influenza virus infection as a cause of pediatric hospitalization. J Infect Dis 1992；165：373 375.
- 13) Sugaya N, Mitamura K, Nirasawa M, Takahashi K : The impact of epidemics of influenza and respiratory Syncytial virus on paediatric admissions to an urban general hospital. J Med Virol 2000；60：102 106.

Clinical Evaluation of Rapid Diagnostic Kit Detecting Separately
Influenza A and B Viruses

Masahiko YAMAZAKI¹⁾, Kazuhiro KIMURA²⁾, Keiko MITAMURA³⁾,
Sumi WATANABE⁵⁾, Osamu KOMIYAMA²⁾, Keiichi YAMAMOTO²⁾,
Masataka ICHIKAWA²⁾, Yoko HASHIMOTO⁴⁾, Noriko HAGIWARA⁴⁾,
Tamiko MAEZAWA⁴⁾, Mitsunobu IMAI⁵⁾ & Norio SUGAYA³⁾,

¹⁾Department of Pediatrics, Hatano Red Cross Hospital

²⁾Department of Pediatrics, Isehara Kyodo Hospital

³⁾Department of Pediatrics, Nippon Kokan Hospital

⁴⁾Department of Laboratory, Isehara Kyodo Hospital

⁵⁾Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

The Directigen™ Flu A + B kit, a rapid diagnostic device for influenza virus A and B was evaluated. The nasopharyngeal aspirates were obtained from 239 patients who visited our hospital, between January and March, 2000, presenting flu-like symptoms. Influenza virus AH1 : 77 and AH3 : 51 were isolated from 128 specimens and none from 111 specimens. Directigen™ Flu A + B showed 115 specimens positive and 106 specimens negative. The sensitivity and specificity of this kit were 89.8% (115/128) and 95.5% (106/111) compared with viral isolation. Agreement on positive and negative interpretations between Directigen™ Flu A and this kit was 97.9% (234/239)

In the evaluation of this kit for influenza B virus, 60 frozen nasopharyngeal aspirates collected from February to April, 1999 were used. The sensitivity and specificity of this kit were 88.9% (16/18) and 88.1% (37/42) compared with viral isolation. Agreement on positive and negative interpretations between FLU OIA® and this kit was 91.7% (55/60)

The Directigen™ A + B demonstrated sensitivity and specificity equivalent to the conventional kits in nasopharyngeal aspirates. This kit can also differentiate influenza A and B viruses, a feature which is useful for treatment using anti-viral agents such as amantadine and neuraminidase inhibitor. To date, the kit is the most effective tool for the rapid diagnosis of influenza.