

A 型・B 型を鑑別できるインフルエンザウイルス 迅速診断キットの感度と特異性

川崎市衛生研究所¹⁾, 神奈川県衛生研究所²⁾, 横浜市衛生研究所³⁾, 日本鋼管病院小児科⁴⁾

清水 英明¹⁾ 渡邊 寿美²⁾ 川上 千春³⁾ 平位 芳江¹⁾

三田村敬子⁴⁾ 菅谷 憲夫⁴⁾ 今井 光信²⁾

(平成 12 年 9 月 18 日受付)

(平成 12 年 9 月 26 日受理)

Key words : influenza virus, rapid diagnosis, enzyme immunoassay

要 旨

A 型および B 型インフルエンザウイルスを検出する迅速診断キットである Directigen™ Flu A+B についての評価を目的として、感度と特異性の検討を行った。

ヒトのインフルエンザウイルス分離株 A (H1N1, H3N2) 型 13 株, B 型 10 株の合計 23 株についての反応性をみたところ、すべてのインフルエンザウイルス分離株で陽性の反応が確認され、抗原の変異、亜型間での差はみられなかった。また、A 型・B 型インフルエンザウイルス以外の呼吸器系ウイルスとは反応しなかった。

A 型・B 型インフルエンザウイルスの代表株について、検出限界を測定したところ、AH1N1 (A/Beijing/262/95) で 7.8×10^3 pfu/ml, AH3N2 (A/Kitakyusu/159/93) で 4.7×10^4 pfu/ml, B 型 (B/Guangdong/05/94) で 3.1×10^4 pfu/ml まで検出することが可能であった。

Directigen™ Flu A+B は簡便かつ迅速な検出が可能であり、他のインフルエンザ診断キットと同等の感度と特異性を有し、A 型と B 型インフルエンザウイルスを鑑別することができることから医療現場において有用であると考えられる。

[感染症誌 74 : 1038 ~ 1043, 2000]

序 文

インフルエンザウイルスは核蛋白の抗原性の違いによって、A, B, C の 3 型に分類されている。そのうちヒトでは A 型の亜型である AH1N1, AH3N2 と B 型が交互に、あるいは混合して流行を繰り返している。本邦においてインフルエンザは冬期に流行が集中し、院内感染や老人福祉施設等での流行を引き起こし、疫学的に重要な感染症である。最近では、インフルエンザウイルスの感

染による重篤な症例の報告が増加しており、早期診断が求められている。

インフルエンザウイルスの検査法としては、MDCK 細胞等によるウイルスの分離や感染初期と回復期のペア血清を用いた血清診断が一般的な検査として用いられている。しかし、それらの結果判定には早くても数日を要し、すべてが診断・治療に結びつくわけではなかった。近年、インフルエンザウイルスの迅速診断キットとして、ディレクティジェン Flu A (日本ベクトン・ディッキンソン), インフルエンザ OIA (第一化学薬品) が

別刷請求先 : (〒210-0834) 川崎市川崎区大島 5-13-10
川崎市衛生研究所 清水 英明

Table 1 Directigen™ Flu A + B test procedure

Specimen extraction	Dispense 8 drops Extraction buffer into a Dispense Tube.
	Pipet 200 ul of specimen into the Dispense Tube.
Color Development	Dispense the extracted specimen dropwise, alternating single drops between the A and B test wells until 4 drops have been added to each well.
	Remove the Flow Controller.
Read the results.	Wash Buffer-Add 2 drop to each well.
	Anti-influenza A monoclonal antibody-Add 2 drop to the A well only.
	Anti-influenza B monoclonal antibody-Add 2 drop to the B well only.
	Allow to stand 2 minutes.
	Wash buffer-Add 3 drops to each well.
	Wash buffer-Add 3 drops to each well.
	Substrate(Nitro blue tetrazolium)Add 3 drops to each well.
	Allow to stand 5 minutes.
	Stop solution(Citric acid)Add 2 drops to each well.

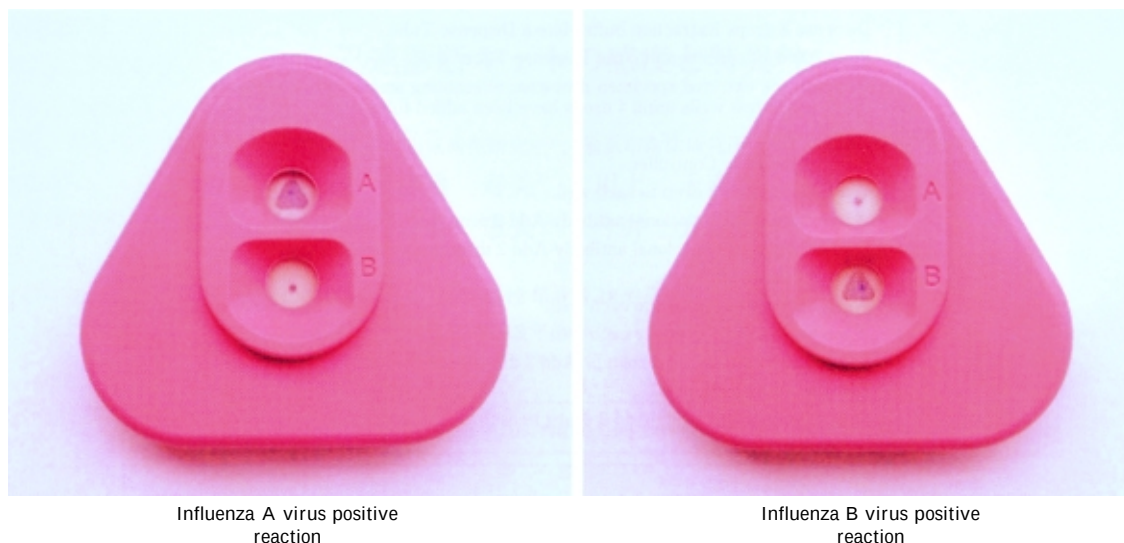
Table 2 Reactivity of Directigen™ Flu A + B with isolated virus

Positive	Influenza A/NJ/8/79(H1N1)	Influenza B/Ibaraki/2/85
	Influenza A/Bangkok/10/83(H1N1)	Influenza B/Victoria/2/87
	Influenza A/Yamagata/120/89(H1N1)	Influenza B/Aichi/5/88
	Influenza A/Yamagata/32/89(H1N1)	Influenza B/Yamagata/16/88
	Influenza A/Beijing/262/95(H1N1)	Influenza B/Hong Kong/22/89
	Influenza A/Aichi/2/69(H3N2)	Influenza B/Bangkok/163/90
	Influenza A/Philippines/2/82(H3N2)	Influenza B/Mie/1/93
	Influenza A/Sichuan/2/87(H3N2)	Influenza B/Guangdong/05/94
	Influenza A/Beijing/352/89(H3N2)	Influenza B/Shangdong/07/97
	Influenza A/Kitakyusyu/159/93(H3N2)	Influenza B/Yamanashi/116/98
	Influenza A/Akita/1/94(H3N2)	
	Influenza A/Wuhan/359/95(H3N2)	
	Influenza A/Sydney/05/97(H3N2)	
Negative	Parainfluenza virus type 1	Echovirus type 3
	Parainfluenza virus type 2	Echovirus type 9
	Parainfluenza virus type 3	Echovirus type 11
	Respiratory syncytial virus	Echovirus type 25
	Adenovirus type 1	Echovirus type 30
	Adenovirus type 2	Coxsackievirus type A16
	Adenovirus type 3	Coxsackievirus type B1
	Adenovirus type 4	Coxsackievirus type B2
	Adenovirus type 5	Coxsackievirus type B3
	Adenovirus type 6	Coxsackievirus type B4
	Adenovirus type 7	Coxsackievirus type B5
	Poliovirus type 1	Enterovirus type 71
	Poliovirus type 2	Mumps virus
	Poliovirus type 3	Herpes simplex virus type 1

市販された^{1)~5)}が、前者は A 型インフルエンザウイルスのみを検出、後者は A 型と B 型を検出するが、その判別はできないもので、現在までに A

型と B 型を別々に同定できる診断キットは検討されていない。今回、A 型と B 型が鑑別できる Directigen™ Flu A + B (Becton Dickinson and Com-

Fig. 1 Directigen Flu A + B device showing positive reaction with influenza A and B virus



pany, USA)を用いて各種試験を行い、インフルエンザの診断への有用性を検討した。

材料と方法

1. 使用ウイルス株

ヒト由来の A 型インフルエンザウイルスである H1N1 5 株 (NJ/8/76, Bangkok/10/83, Yamagata/120/86, Yamagata/32/89, Beijing/262/95), H3N2 8 株 (Aichi/2/68, Philippines/2/82, Sichuan/2/87, Beijing/352/89, Kitakyusyu/159/93, Akita/1/94, Wuhan/359/95, Sydney/05/97) および B 型インフルエンザウイルス 10 株 (Ibaraki/2/85, Victoria/2/87, Aichi/5/88, Yamagata/16/88, Hong Kong/22/89, Bangkok/163/90, Mie/1/93, Guangdong/05/94, Shangdong/07/97, Yamanashi/116/98) を用いた。また、インフルエンザウイルス以外の呼吸器由来ウイルスとして、神奈川県で分離されたパラインフルエンザウイルス 1~3 型, RS ウイルス, アデノウイルス 1~7 型, ポリオウイルス 1~3 型, エコーウイルス 3・9・11・25・30 型, コクサッキー A 16 型, コクサッキー B1~5 型, エンテロウイルス 71 型, ムンプスウイルスおよび単純ヘルペス 1 型を用いてキットの特異性の検討を行った。

2. 検出感度の検討

インフルエンザウイルス分離株の A/Beijing/262/95 (H1N1), A/Kitakyusyu/159/93 (H3N2), B/Guangdong/05/94 について MDCK 細胞によるブランク定量法を用いてウイルス量を測定した。各ウイルスとも 10 倍から 1,280 倍までの希釈列を作製し、その希釈ウイルスを用いてキットの検出感度について検討した。なお、対照として、ディレクティジェン Flu A およびインフルエンザ OIA も同様に検討を行った。

3. Directigen™ Flu A + B の操作方法

Directigen™ Flu A + B はインフルエンザウイルスの核蛋白をナイロン膜上の反応面に物理的に吸着させた後、EIA の手法を用いて発色の有無を目視するもので、原理的にはディレクティジェン Flu A と同様である。しかし、A 型と B 型を別個に鑑別するために、各々独立した 2 つの反応面を有している。検査手順は所定の方法に従い次の通り実施した。

まず、ウイルス懸濁液 200μl を分注チューブに入れ、抽出液 8 滴を加えて前処理した。次に、分注チューブにフィルターを取り付け、キット本体の A 型用と B 型用の反応面に滴下した。洗浄後、

アルカリフォスファターゼ標識抗 A 型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体およびアルカリフォスファターゼ標識抗 B 型インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を各々の反応面に滴下し、2 分放置した。その後洗浄液、基質液を加え、5 分間放置し、反応停止液を加えて結果判定を行った。検査に要する時間は約 10 分である (Table 1)。判定は A 型用の反応面に紫色の三角形がみられた場合を A 型インフルエンザウイルス陽性、B 型用の反応面に同様の反応がみられた場合を B 型インフルエンザウイルス陽性とした (Fig. 1)。両方の反応面に三角形が認められず、膜の中心にコントロールの紫色のドットが観察された場合を陰性とした。

成 績

1. 特異性の検討

ヒト由来の A 型インフルエンザウイルス 13 株および B 型インフルエンザウイルス 10 株について Directigen™ Flu A+B の反応性を検討したところ、すべての株で発色を呈し、陽性の反応が認められた。その他の呼吸器由来ウイルスでは HEp-2 で分離した RS ウイルスで A 型用と B 型用の両方の反応面に発色が認められた。RS ウイルスについては CaCo-2 で分離したものでは発色がみられず陰性であった。そこで、RS ウイルスの増殖に用いた HEp-2 の細胞成分のみを検体として、検査を行ったところ同様の発色が認められた。このことから、本キットはインフルエンザウイルス以外の呼吸器由来のウイルスとは発色を示さず陰性であったが、HEp-2 と反応することが確認された (Table 2)。

2. 検出感度の検討

ブランク定量法の結果、A/Beijing/262/95 (H1N1) は 1.0×10^7 pfu/ml、A/Kitakyusyu/159/93 (H3N2) は 6.0×10^7 pfu/ml、B/Guangdong/05/94 は 2.0×10^7 pfu/ml のウイルス量が得られた。その試料を希釈して用いた Directigen™ Flu A+B の検出限界の測定では、A/Beijing/262/95 で 1,280 倍、A/Kitakyusyu/159/93 で 1,280 倍、B/Guangdong/05/94 で 640 倍まで反応が認められた。このことから、A/Beijing/262/95 で 7.8×10^3 pfu/ml、

A/Kitakyusyu/159/93 で 4.7×10^4 pfu/ml、B/Guangdong/05/94 で 3.1×10^4 pfu/ml まで検出可能であった。

また、ディレクティジェン Flu A では A/Beijing/262/95 で 3.9×10^3 pfu/ml、A/Kitakyusyu/159/93 で 2.3×10^4 pfu/ml まで反応がみられ、B/Guangdong/05/94 とは反応しなかった。インフルエンザ OIA は A/Beijing/262/95 で 3.1×10^4 pfu/ml、A/Kitakyusyu/159/93 で 1.9×10^5 pfu/ml、B/Guangdong/05/94 で 6.3×10^4 pfu/ml まで検出された。

考 察

近年、迅速診断法として reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法^{6,7)}や EIA 等が普及し、インフルエンザの診断に応用されている。RT-PCR 法は高感度で、特異性の高い検査法であり、A (H1N1, H3N2) 型と B 型の同定を行うことができる。しかし、ウイルス RNA を扱う施設が必要なため、研究施設では汎用されているものの、医療機関で使用されることは少ない。EIA は 1999 年、A 型インフルエンザウイルスを検出するディレクティジェン Flu A^{1,2)}が販売され、多くの医療機関で使用された。また、2000 年になって、A 型と B 型が検出可能なインフルエンザ OIA³⁾⁻⁵⁾も市販されるに至り、インフルエンザの診断が簡易かつ迅速にできるようになった。しかし、ディレクティジェン Flu A は A 型のみを検出し、インフルエンザ OIA は A 型・B 型の両方を検出するものの、その鑑別はできない。Directigen™ Flu A+B はインフルエンザウイルスの検出だけでなく、A 型と B 型の鑑別ができることが利点である。このキットは A 型と B 型インフルエンザウイルスの各々の核蛋白質に対するモノクローナル抗体を使用しているが、今回の検討では A (H1N1, H3N2) 型と B 型の過去から現在までの流行株すべてと陽性の反応を示し、インフルエンザ抗原の変異による疑陰性は認められなかった。しかし、Directigen™ Flu A+B は A 型と B 型インフルエンザウイルス以外に、HEp-2 で陽性反応が認められた。そこで、検査に供した HEp-2 のアルカリフォスファターゼ活性を測定したところ、他の

培養細胞に比べて非常に高い活性がみられた。一方、インフルエンザウイルスの分離培養に使用する MDCK や CaCo-2 を含む他の培養細胞では、いずれもアルカリフォスファターゼ活性は微量で、Directigen™ Flu A+B との陽性反応も認められなかった。以上のことから、HEp-2 由来のアルカリフォスファターゼが何らかの理由で反応面に吸着し、Directigen™ Flu A+B の基質と反応したため発色したものと考えられる。なお、この反応は HEp-2 でのみ認められたものであり、インフルエンザウイルスの検査をするにあたり影響がないものと思われる。

今回行った Directigen™ Flu A+B の検出感度は A 型インフルエンザウイルスでは 7.8×10^3 pfu/ml から 4.7×10^4 pfu/ml の範囲であった。これはディレクティジェン Flu A とほぼ同等、インフルエンザ OIA よりやや高い値であった。また、B 型インフルエンザウイルスでは 3.1×10^4 pfu/ml でありインフルエンザ OIA とほぼ同等の感度であり、十分臨床サイドで使用するものであると考える。

インフルエンザは発熱、呼吸器・消化器症状を主体とする急性感染症であるが、高齢者や乳幼児および基礎疾患を持つ患者等については合併症の頻度も高く、重症化することもある^{8,9)}。特にインフルエンザウイルスの感染による脳炎・脳症の報告が増加しており問題となっている¹⁰⁾。インフルエンザの症状は一般的に A 型インフルエンザウイルスのほうが重篤になりやすいと言われているが、B 型インフルエンザについても重症例の報告がみられ¹¹⁾、両型とも発症時の早期治療が望まれる。インフルエンザウイルスの治療薬には、塩酸アマンタジンが A 型インフルエンザの治療薬として、1998 年に本邦で認可され、その有効性が報告されている¹²⁾。また、A 型と B 型の両方に効果のあるノイラミニダーゼ阻害薬のザナミビルやオセルタミビルについても臨床有用性が検討されている¹³⁾。これら治療薬の使用で対処が可能になりつつある今、インフルエンザの確定診断は重要であり、特に 10 分から 15 分でインフルエンザウイルスを検出できる迅速診断キットは重要性が高ま

るものと考えられる。また、本キットは A 型と B 型インフルエンザウイルスの区別が可能で、治療薬を選択できる利点がある。

インフルエンザウイルスは冬の流行シーズン以外の呼吸器疾患患者から分離されることがあり、その集団発生も報告されている¹⁴⁾。この時期には MDCK 細胞等インフルエンザウイルスに感受性のある細胞を培養している検査施設は少ない。Directigen™ Flu A+B はインフルエンザウイルスの流行する冬期だけでなく、流行閉期においてもインフルエンザが否かの確認、さらには A 型と B 型インフルエンザウイルスの鑑別も容易に行うことができる。このことから、本キットは疫学的研究にも有用であると考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) 三田村敬子, 菅谷憲夫, 蕪澤真理, 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Yamada A, Imanishi J, Nakajima E, Nakajima K, Nakajima S: Detection of influenza viruses in throat swab by using polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 1991; 35: 259-265.
- 7) 清水英明, 渡邊寿美, 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.
- 8) 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.
- 9) 武内可尚: インフルエンザの重症合併症. 小児科 1998; 39: 125-138.
- 10) 富樫武弘, 松園嘉裕, 穴倉迪彌, 根路銘国昭: インフルエンザ流行中の小児期脳炎・脳症. 日本臨床 1997; 55: 2699-2705.

- 11) 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.
- 12) 三浦 大, 菅谷憲夫, 林恵理子 : A 型インフルエンザ脳症に対する amantadine の使用経験 . 感染症誌 1998 ; 72 : 840–844.
- 13) Hayden FG, Osterhaus A, Treanor JJ *et al.* : Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenzavirus infections. *N Engl J Med* 1997 ; 337 : 874–880.
- 14) 佐原啓二, 長岡宏美, 三輪好伸, 杉枝正明, 宮本秀樹 : 夏季に起きた B 型インフルエンザウイルスによる集団発生 . 感染症誌 1999 ; 73 : 253–254.

Sensitivity and Specificity of Rapid Diagnosis Kit Detecting Separately Influenza A and B Viruses

Hideaki SHIMIZU¹⁾, Sumi WATANABE²⁾, Chiharu KAWAKAMI³⁾, Yoshie HIRAI¹⁾,
Keiko MITAMURA⁴⁾, Norio SUGAYA⁴⁾ & Mitsunobu IMAI²⁾

¹⁾Kawasaki City Institute of Public Health

²⁾Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

³⁾Yokohama City Institute of Health

⁴⁾Department of Pediatrics, Nippon Kokan Hospital

Sensitivity and specificity of the Directigen™ Flu A+B kit, a rapid test for influenza virus A and B, were evaluated. This test detects influenza A and B viruses separately by EIA.

Reactivity of the kit was tested using a total of 23 isolates : 13 isolates of human influenza virus A (H1N1, H3N2) and 10 isolates of human influenza virus B. All of the isolates were tested positive and no difference in reactivity was found in antigenic variables and subtypes. The kit was only reactive to influenza virus A and B, not reactive to other viruses.

Typical influenza A and B strains were tested for detection limit. 7.8×10^3 pfu/ml was a detection limit for influenza virus A (H1N1 : Beijing/262/95) 4.7×10^4 pfu/ml for influenza virus A (H3N2 : Kitakyusyu/159/93) and 3.1×10^4 pfu/ml for influenza virus B (Guangdong/05/94)

The Directigen™ Flu A + B kit was a easy-to-use, rapid detection device and the kit has sensitivity and specificity equivalent to other diagnostic devices, suggesting the kit are useful in medical institutions.