

迅速診断キットで A 型と B 型インフルエンザウイルスの重複感染が疑われ、 RT-PCR 法とウイルス分離法で確定された 11 例について

¹⁾広島県保健環境センター, ²⁾原小児科, ³⁾かくたクリニック

高尾 信一¹⁾ 原 三千丸²⁾ 角田 修³⁾ 島津 幸枝¹⁾
桑山 勝¹⁾ 福田 伸治¹⁾ 宮崎佳都夫¹⁾

(平成 17 年 6 月 27 日受付)

(平成 17 年 9 月 7 日受理)

Key words : influenza, co-infection, rapid diagnosis

要 旨

2004/05 年シーズンは、多くの地域で複数のインフルエンザウイルス [B 型と A(H3)型の 2 種類、あるいは B 型, A(H3)型, A(H1)型の 3 種類] が、同時期に混合流行を起こしていた。そうした流行状況下では、同じヒトが同時に複数のウイルスに重複感染を起こす可能性が考えられた。

我々は 2005 年 2 月から 3 月にかけて、全国 13 の小児科診療施設において、インフルエンザ迅速診断キットが A 型と B 型の両方に陽性反応を示したことから、2 種類のインフルエンザウイルスの重複感染が疑われた 15 例について、RT-PCR 法とウイルス分離法で重複感染の有無をウイルス学的に検討した。

RT-PCR 法検査から 15 例中 10 例は B 型と A(H3)型の、また別の 1 例は B 型と A(H1)型の重複感染例であることが確認された。一方、迅速診断キットでは明らかに A 型と B 型の両方に陽性反応を示したにもかかわらず、RT-PCR 法では B 型の遺伝子しか検出されなかった症例が 2 例あり、また別の 2 例については、いずれの型のウイルス遺伝子も検出されず、それらの 4 例は迅速キットの判定結果が偽陽性であった可能性が考えられた。

ウイルス分離法では、対象とした 15 例中、ウイルス分離を実施しなかった 4 例を除き、11 例中 9 例から RT-PCR 法の結果と一致する型のインフルエンザウイルスが分離された。

複数の型のインフルエンザウイルスが混合流行している際には、重複感染例があることを考慮して、検査や治療が行われる必要があると思われる。

[感染症誌 79 : 877~886, 2005]

序 文

インフルエンザの迅速診断キット (以下、診断キットと略す) の普及によって、臨床現場においても A 型と B 型インフルエンザの鑑別診断が容易に可能となった¹⁾。しかしそれに伴い、診断キッ

トで偽陰性や偽陽性が出現する場合があることや、A 型と B 型の両方に陽性反応が出現した際の解釈等について、臨床現場で若干の混乱が生じていることも否定できない²⁾。これまでに A 型と B 型インフルエンザウイルスの重複感染例がウイルス学的に証明されたケースは少なく、そのために診断キットで A 型と B 型の両方に陽性反応を示した検体は、偽陽性の反応である場合が多いと考

別刷請求先 : (〒734-0007) 広島市南区皆実町 1-6-29

広島県保健環境センター微生物第二部

高尾 信一

平成17年11月20日

えられてきた³⁾⁴⁾。

今回我々は、これまでに実施された市販の診断キットを用いた比較試験の成績から^{2)5)~8)}、2004/05年シーズンに市販されていた診断キットの中で、感度と特異性に最も信頼がおけるキットの1つであると判断した、エスプラインインフルエンザ A&B-N⁷⁾ (以下、エスプライン A&B-N と略す;富士レジオ社)を一次スクリーニングとして用い、それによる検査結果で A 型と B 型の両方に陽性反応を示した患者検体 15 例について、RT-PCR 法とウイルス分離法を用いて重複感染の可能性を検討した。その結果、15 例中 11 例については、明らかに A 型と B 型インフルエンザウイルスの重複感染例であることをウイルス学的に確認出来たので、その概要を報告する。

対象と方法

1. 対象

2005年2月から3月までの期間に、全国13の小児科診療所において、エスプライン A&B-N を用いてインフルエンザの迅速診断を行った際に、A 型と B 型の両方に陽性反応を示し、A 型ウイルスと B 型ウイルスとの重複感染が疑われた 15 名の患者検体 (鼻腔スワブ:7 件, 鼻腔吸引液:8 件) を対象とした。対象とした患者の検体が鼻腔吸引液の場合は、診断キットに使用した残りの検体を、また鼻腔スワブの場合は、患者から再度採取し直した検体を、その後のウイルス学的試験に供した。

2. RT-PCR 法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出

インフルエンザウイルスの遺伝子検出は、既報⁹⁾ に準じて実施した。すなわち、患者検体 50~250 μ L からウイルス RNA を抽出した後、インフルエンザウイルス A(H1) 型, A(H3) 型および B 型の赤血球凝集素遺伝子に、それぞれ特異的なプライマーを用いた RT-PCR 法で、各型のインフルエンザウイルス遺伝子の有無を判定した。

3. 培養細胞を用いた型別インフルエンザウイルスの分離

2 種類以上の型のインフルエンザウイルスが混在している検体中から、A(H1)型, A(H3)型ある

いは B 型ウイルスを、それぞれ区別して分離する (以下、分別分離と表現する) ために、インフルエンザウイルスの型特異的抗血清で、同じ型のウイルスの増殖を抑制した状態で分離を行った。具体的には、デンカ生研から市販されている 2004/05 年シーズン用のインフルエンザウイルス HI 試薬「生研」[抗 A/ニューカレドニア/20/99 (H1N1) 血清, 抗 A/ワイオミング/3/2003 (H3N2) 血清, 抗 B/上海/361/2002 血清] を、1mL の蒸留水で溶解後、56°C, 30 分間の非働化处理したものを中和用抗血清として用いた。事前の予備実験の結果から、それらの抗血清を 10~40 倍して用いれば、同じ型のウイルス増殖は抑制するが、違う型のウイルス増殖は、ほとんど抑制しないことが確かめられたので、実際の検体 100 μ L と、10~40 倍に希釈した各抗血清 100 μ L とを、それぞれ個別に混合して、37°C で 1.5 時間中和した後に 24 穴マイクロプレートに培養した MDCK (+) 細胞¹⁰⁾ に接種し、最終濃度 60 μ g/mL のトリプシンを添加した維持培地中で、34°C で 7~8 日間培養して分別分離を試みた。ウイルス分離の確認には、細胞変性効果 (CPE) と 0.5% 七面鳥血球を用いた赤血球凝集 (HA) 試験を指標として判断した。CPE や HA 価が弱い、あるいは認められなかったものについては、さらに MDCK (+) 細胞に 2~4 代の継代を行った。なお、MDCK (+) 細胞は広島大学大学院医歯薬学総合研究科ウイルス学研究室の清谷克寛博士から分与されたものを用いた。

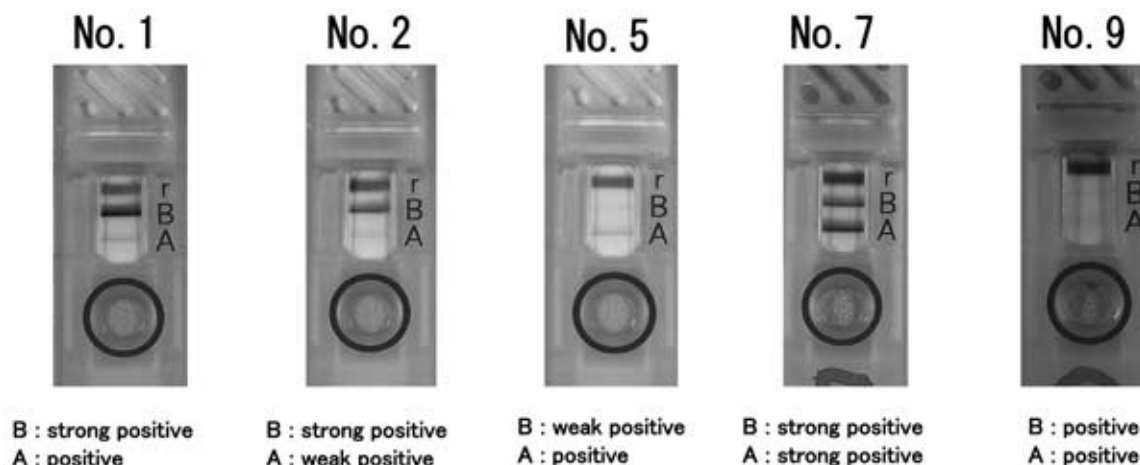
4. 分離ウイルス株の抗原分析

分別分離されたウイルス株については、国立感染症研究所から分与された 2004/05 年シーズン用のインフルエンザ HI 試験用標準抗血清を用いた HI 試験によって、各分離ウイルスの HA 型の確認と抗原分析を行った。なお、広島県内で 2004/05 年シーズンに重複感染でない患者から分離されたウイルス株 [B/Hiroshima/07/05, A/Hiroshima/01/05 (H1N1), A/Hiroshima/29/05 (H3N2)] も比較のためのコントロール株として用いた。

5. 分離ウイルス株のノイラミニダーゼ (NA) 型別の決定

分離された A 型ウイルス株については、我々が

Fig. 1 Example of dual positive reactions for influenza virus type A and type B with the rapid diagnostic kit (ESPLINE Influenza A&B-N)



従来から実施している RT-PCR 法を利用した NA 型別法¹¹⁾により NA 型を決定した。

結 果

1. 対象患者の概要

対象患者 15 名は、2005 年 2 月下旬から 3 月下旬までの間に、全国 13 の小児科診療施設で実施したエスプライン A&B-N を用いた迅速診断の結果で、A 型と B 型の両方に陽性反応が出現したことから (Fig. 1)、2 種類のインフルエンザウイルスによる重複感染が疑われたものである。それらの患者の概要を Table 1 に示した。

患者はいずれも 1 歳 5 カ月から 8 歳までの小児で、検体が採取された時期は、各小児科診療所で実施された診断キットを用いたインフルエンザ検査によって、それぞれの小児科診療所の周辺および隣接する地域で、A 型と B 型ウイルスをそれぞれ原因とするインフルエンザ患者が多数発生していることが確認されていた時期であった。

患者は、いずれも 38℃ 以上の発熱が出現しており、発熱が出現した当日から 2 日以内に検体が採取された。患者の発熱期間は、解熱時まで観察された 12 例では 1 日から 3 日間で、同じ時期に各小児科診療所を受診した A 型あるいは B 型ウイルス単独感染の患者と比較しても、臨床的には特に重症感は認められず、合併症を起こした例も無

かった。

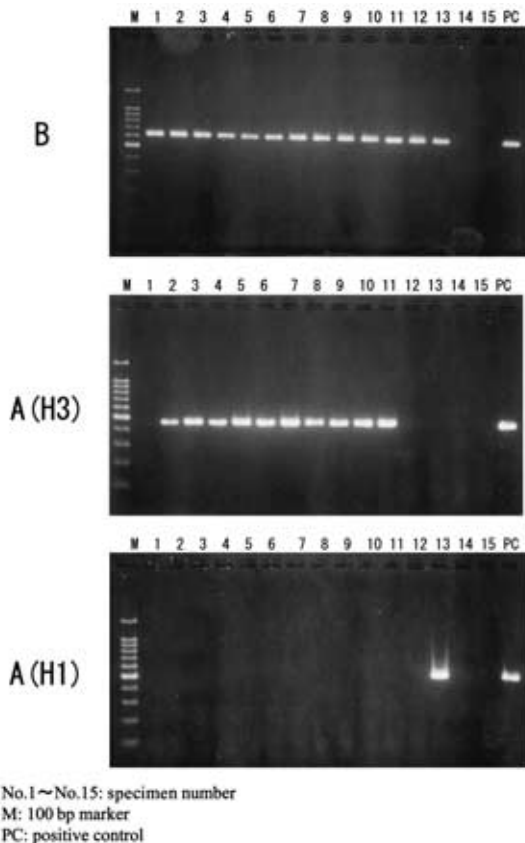
2. 診断キットで A 型、B 型の両方に陽性反応を示した患者検体の RT-PCR 法およびウイルス分離結果

対象となった 15 名からの検体について、RT-PCR 法と MDCK(+) 細胞を用いたウイルス分離法で重複感染の有無を確認した (Fig. 2, Table 1)。

RT-PCR 法での検査結果から、15 例中 10 例 (No. 2~No. 11) に B 型と A (H3) 型の両方の遺伝子増幅が認められ、これらの患者は B 型と A (H3) 型ウイルスに重複感染していたことが確認された。また、1 例 (No. 13) では、B 型と A (H1) 型両方の遺伝子増幅が認められたことから、この患者は B 型と A (H1) 型ウイルスの重複感染例であった。一方、診断キットでは明らかに A 型と B 型の両方に陽性反応を示したにもかかわらず、RT-PCR 法では B 型の遺伝子増幅しか確認されない症例も 2 例あった (No. 1, No. 12)。また、別の 2 例 (No. 14, No. 15) では、RT-PCR 法ではいずれのインフルエンザウイルス遺伝子も検出されなかった。

ウイルス分離の結果は RT-PCR 法でのそれと一致していた。すなわち、検体採取の量が少ないなどの理由で、ウイルスの分別分離を実施するこ

Fig. 2 Results of influenza virus type-specific RT-PCR



とができなかった4例 (No. 3, No. 6, No. 8, No. 9)を除いた, 11例中9例ではRT-PCR法の結果と一致するインフルエンザウイルスを分別分離することが出来た. また, RT-PCR法ではいずれの型のウイルス遺伝子も検出されなかった2例 (No. 14, No. 15)については, ウイルス分離法でも陰性であった.

以上の結果から, 今回対象とした15例中11例は, 明らかにB型とA(H3)型ウイルス, あるいはB型とA(H1)型ウイルスとの重複感染例であったことが確認された. 一方で, 残りの4例については診断キットの判定結果が偽陽性を示していた可能性が考えられた.

3. A型分離ウイルス株のNA型の決定

各患者検体からMDCK(+)細胞を用いて分別分離できた株のうち, A(H3)型6株とA(H1)型

1株について, RT-PCR法を用いてNAの型を同定した. その結果, それらの株は, いずれもA(H3N2)型とA(H1N1)型ウイルスであった.

4. 分離ウイルス株のHA抗原分析

重複感染例から分離されたインフルエンザウイルスの抗原性状を確かめるために, 検体から分別分離したB型ウイルス9株, A(H3N2)型ウイルス6株, A(H1N1)型ウイルス1株, およびコントロールとして用いた広島県内で重複感染でない患者から分離されたインフルエンザウイルス3株について, 2004/05年シーズンのインフルエンザ標準抗血清を用いて行ったHI試験でウイルスの抗原分析を実施した(Table 2). その結果, 分別分離された株はいずれもコントロールとして用いた株と同様のHI価を示しており, HAの抗原性状を見る限り, 特に重複感染による影響は認められなかった.

考 察

我が国における2004/05年シーズンのインフルエンザの流行は, 過去に例を見ない流行パターンを示した点で特異的であった. すなわち, 例年だとA型ウイルスの流行のピークに引き続いてB型ウイルスが流行してくるのが一般的であったが, 2004/05年シーズンは, 多くの都道府県で2005年の第3週頃からA(H3)型とB型が同一地域で, ほぼ同時に流行し, 地域によっては, それにA(H1)型も加わるといった複雑な流行パターンを示した(国立感染症研究所感染症情報センターホームページ, 週別ウイルス分離状況 <http://idsc.nih.go.jp/iasr/prompt/graph-kj.html> より). 我々は, そのような状況においては, 同じ患者が2種類, 場合によっては3種類のインフルエンザに, 同時に重複感染する症例が存在し得ると考え今回の調査を行った.

我が国では1999年以降, 一般の医療機関においてもインフルエンザの診断キットの使用が可能となり, そのことがインフルエンザの診断に大きく貢献したことは間違いない¹⁾. その一方で, 診断キットの判定において偽陰性あるいは偽陽性が出現する場合の存在ことや, A型とB型が共に陽性と判定された場合の解釈について, 医療機関にお

Table 1 Profile of 15 suspected cases of co-infection by influenza virus type A and type B and results of the rapid diagnostic test and virological tests

No. of Patient	Sex	Age (Yr, mo)	Date of fever onset	Duration of fever (day)	Date of specimen collection	specimen	Geographic area of specimen collection	Results of RT-PCR			Results of virus isolation			Code name of the influenza virus isolated
								B	A (H3)	A (H1)	B	A (H3N2)	A (H1N1)	
1	F	2Y, 7M	20-Feb	3	21-Feb	Nasal aspirate	Fuchu-cho, Hiroshima Pref.	+	-	-	+	-	-	B/Hiroshima/301/05
2	F	7Y, 5M	21-Feb	3	22-Feb	Nasal swab	Kumagaya-city, Saitama Pref.	+	+	-	+	+	-	B/Hiroshima/302/05 A/Hiroshima/101/05 (H3N2)
3	F	6Y, 0M	24-Feb	≦ 2	25-Feb	Nasal swab	Nonoichi-cho, Ishikawa Pref.	+	+	-	not done			
4	M	2Y, 6M	22-Feb	2	22-Feb	Nasal aspirate	Zama-city, Kanagawa Pref.	+	+	-	+	+	-	B/Hiroshima/303/05 A/Hiroshima/102/05 (H3N2)
5	M	2Y, 9M	28-Feb	3	28-Feb	Nasal aspirate	Kaita-cho, Hiroshima Pref.	+	+	-	+	+	-	B/Hiroshima/306/05 A/Hiroshima/104/05 (H3N2)
6	M	2Y, 5M	1-Mar	1	2-Mar	Nasal aspirate	Kumagaya-city, Saitama Pref.	+	+	-	not done			
7	M	8Y, 0M	1-Mar	3	2-Mar	Nasal aspirate	Syunan-city, Yamaguchi Pref.	+	+	-	+	+	-	B/Hiroshima/308/05 A/Hiroshima/106/05 (H3N2)
8	F	5Y, 10M	23-Feb	≦ 1	23-Feb	Nasal swab	Nonoichi-cho, Ishikawa Pref.	+	+	-	not done			
9	M	4Y, 0M	6-Mar	2	7-Mar	Nasal swab	Niigata-city, Niigata Pref.	+	+	-	not done			
10	F	5Y, 4M	7-Mar	2	8-Mar	Nasal aspirate	Karatsu-city, Saga Pref.	+	+	-	+	+	-	B/Hiroshima/309/05 A/Hiroshima/107/05 (H3N2)
11	M	6Y, 7M	22-Mar	3	23-Feb	Nasal swab	Ageo-city, Saitama Pref.	+	+	-	+	+	-	B/Hiroshima/304/05 A/Hiroshima/103/05 (H3N2)
12	F	6Y, 5M	25-Mar	2	25-Feb	Nasal swab	Ageo-city, Saitama Pref.	+	-	-	+	-	-	B/Hiroshima/305/05
13	F	6Y, 9M	28-Feb	≦ 2	28-Feb	Nasal aspirate	Yamabe-cho, Yamagata Pref.	+	-	+	+	-	+	B/Hiroshima/307/05 A/Hiroshima/105/05 (H1N1)
14	F	2Y, 7M	13-Mar	2	15-Mar	Nasal swab	Hiroshima-city, Hiroshima Pref.	-	-	-	-	-	-	
15	M	1Y, 5M	25-Feb	2	26-Feb	Nasal aspirate	Toyama-city, Toyama Pref.	-	-	-	-	-	-	

Table 2 Results of hemagglutination inhibition (HI) testing of the influenza isolates

Code name of the influenza virus isolated	Passage history	Standard reference antisera for the influenza viruses in the 2004/05 influenza season				
		A/New Caledonia/20/99 (H1N1) (1:160) ^a	A/Moscow/13/98 (H1N1) (1:1,280)	A/Wyoming/03/2003 (H3N2) (1:1,280)	B/Johannesburg/5/99 (1:1,280)	B/Brisbane/32/2002 (1:1,280)
B/Hiroshima/07/05 ^b	MDCK-1 ^c	< 10	< 10	< 10	320	< 10
A/Hiroshima/01/05 (H1N1) ^b	MDCK-1	320	40	< 10	< 10	< 10
A/Hiroshima/29/05 (H3N2) ^b	MDCK-2	< 10	< 10	160	< 10	< 10
B/Hiroshima/301/05	MDCK-3	< 10	< 10	< 10	320	< 10
B/Hiroshima/302/05	MDCK-2	< 10	< 10	< 10	320	< 10
B/Hiroshima/303/05	MDCK-4	< 10	< 10	< 10	640	< 10
B/Hiroshima/306/05	MDCK-4	< 10	< 10	< 10	320	< 10
B/Hiroshima/308/05	MDCK-3	< 10	< 10	< 10	320	< 10
B/Hiroshima/309/05	MDCK-3	< 10	< 10	< 10	320	< 10
B/Hiroshima/304/05	MDCK-4	< 10	< 10	< 10	320	< 10
B/Hiroshima/305/05	MDCK-3	< 10	< 10	< 10	160	< 10
B/Hiroshima/307/05	MDCK-4	< 10	< 10	< 10	320	< 10
A/Hiroshima/101/05 (H3N2)	MDCK-4	< 10	< 10	640	< 10	< 10
A/Hiroshima/102/02 (H3N2)	MDCK-3	< 10	< 10	320	< 10	< 10
A/Hiroshima/104/05 (H3N2)	MDCK-4	< 10	< 10	320	< 10	< 10
A/Hiroshima/106/05 (H3N2)	MDCK-4	< 10	< 10	320	< 10	< 10
A/Hiroshima/107/05 (H3N2)	MDCK-4	< 10	< 10	160	< 10	< 10
A/Hiroshima/103/05 (H3N2)	MDCK-4	< 10	< 10	320	< 10	< 10
A/Hiroshima/105/05 (H1N1)	MDCK-2	320	20	< 10	< 10	< 10

a : The numbers indicate the homologous HI titer

b : Strains isolated from patients infected with a single influenza virus in the 2004/05 influenza season

c : Numbers indicate the number of passages in MDCK(+) cells

いて若干の混乱が生じていることも否定できない²⁾。偽陰性の原因については、感染初期のウイルス排泄量が少ない時点での検体採取や不適切な検体採取方法などが考えられ^{4)~6)}、偽陽性の原因については、他のウイルスや細菌との交差反応以外に、何らかの体内物質、例えば気道粘液中に含まれる物質との非特異反応などが考えられる⁴⁾。同様に、診断キットで A 型と B 型が同時に陽性になった場合にも、その多くが非特異反応による偽陽性であると判断されてきた³⁾⁴⁾。その理由の一つには、2種類のインフルエンザウイルスがヒトに同時に感染した場合には、ウイルス間の干渉が起きることで一方のウイルスの増殖が抑制されてしまうために、結果としてどちらか一方のウイルスのみが増殖してくるので、重複感染は起こり難いと考えられていたからである¹²⁾。しかし今回我々が示したように、複数のインフルエンザウイルスが同時期に混合流行している場合においては、同じヒトの体内で A 型と B 型が同時に増殖している重複感染例も存在していることが明らかとなった。そうした患者の検体を診断キットで検査すれば、検体の採取時期や体内で増殖しているウイルス量の比率にもよるが、A 型と B 型が共に陽性となる場合も有り得る。言い換えれば、地域でのインフルエンザの流行が A 型と B 型の混合流行を起こしているような場合であれば、信頼性の高い迅速キットで A 型、B 型が共に陽性となった場合には、重複感染の可能性も考慮すべきであろう。その一方で、今回の我々の調査においても、No. 1 や No. 12 の患者のように、明らかに A 型ウイルスに対してキットが非特異反応を示した例や、No. 14 や No. 15 の患者のように、A 型と B 型ウイルスの両方に対して非特異反応を示した可能性のある例も認められたのも事実である。ただし、そのうち No. 15 については、採取された検体が RT-PCR 法やウイルス分離などのウイルス学的検査が実施されるまでの約 1 カ月の間、家庭用の冷凍庫内で保存されており、また No. 14 については、ウイルス学的検査用に再度採取し直した際に、十分な量の鼻腔スワブが採取できていなかった可能性もあった。そうした理由から、それらの検体で

はウイルス学的検査結果が陰性になった可能性も完全には否定できない。診断キットについては、各メーカーの努力によって毎年のように、感度・特異性の高い製品へと改良が加えられているが、さらに信頼性の高い診断キットの開発を各メーカーにはお願いしたい。

インフルエンザウイルスの重複感染例については、これまでも A 型と B 型ウイルスが同時期に混合流行していたシーズンはあり、その際には患者によっては複数のインフルエンザウイルスに重複感染を起こしていた事例も少なからず存在していた可能性が考えられる。しかし、ウイルス学的な検査によって、インフルエンザウイルスの重複感染が明らかにされた例は多くない。我々が知る限り、日本国内では 1980 年に酒匂らが報告した A(H1) 型と A(H3) 型による重複感染の 1 例¹³⁾、2003 年に松浦らのグループが報告した A(H3) 型と B 型による 1 例¹²⁾¹⁴⁾、2004 年に三田村らが診断キットの評価報告の中で明らかにした A 型と B 型による 1 例⁷⁾、および 2005 年に島田らが報告した埼玉県内での A(H3N2) 型と B 型の重複感染例¹⁵⁾などが散見されるに過ぎない。なお、この埼玉県での症例については、今回我々が検査対象とした No. 6 と同じ患者であり、我々が調べた検体と同じ時に採取された検体が埼玉県衛生研究所でも検査されており、その結果 A(H3N2) 型と B 型の両方のウイルスが分離されていたことを付け加えておく。

今回我々は、重複感染をウイルス学的に確認するために、RT-PCR 法での型特異的なインフルエンザウイルス遺伝子の検出に加えて、培養細胞を用いて各型ウイルスの分別分離も試みた。インフルエンザウイルスの分別分離に関して言えば、複数の型のウイルスが混在している検体中から、それぞれの型のウイルスを分別して分離することは必ずしも容易ではなく、分離に際して何らかの工夫を加える必要がある。その方法として酒匂ら¹³⁾は、発育鶏卵でウイルスを分離・増殖させた後に、プラーク法を用いて A(H1) 型ウイルスと A(H3) 型ウイルスを分別分離している。一方で松浦ら¹⁴⁾は、MDCK 細胞を使ったウイルス分離の際に、A

型ウイルスは培養液中にトリプシンを添加することで、親ウイルスから子ウイルス、孫ウイルスというように、マルチサイクルにウイルスが増殖できるが(以下、多段増殖と表現する)、B型ウイルスの場合はトリプシンを添加しなくても多段増殖できる性状¹⁶⁾を利用してB型ウイルスのみを分離し、また、その年に流行したA(H3)型ウイルス株がニワトリ赤血球を凝集しにくかったことを利用し、あらかじめ血球でB型ウイルスを吸収・除去することでA(H3)型ウイルスのみを分別分離している。さらに島田ら¹⁵⁾は、MDCK細胞の培養液をトリプシンを添加した場合と添加しない場合の2通りの条件下で分離を試み、それらの培養上清を限界希釈して継代培養することで、A(H3N2)型とB型ウイルスの分別分離に成功している。しかし今回の我々のケースでは、B型ウイルス株のMDCK(+)細胞における増殖速度が、A(H1)型ウイルスやA(H3)型ウイルスのそれと比較して極めて早かったために、プラーク法を用いたのでは、元の検体中にA型ウイルスの量が少なかった場合には、B型ウイルスの増殖がA型ウイルスの増殖を覆い隠してしまっており、その結果A型ウイルスを上手く分別分離出来ない可能性が考えられた。また、A(H1)型、A(H3)型およびB型のいずれもがニワトリおよび七面鳥血球に対して凝集能を有していたために、血球凝集能を利用した吸収除去法も利用することが出来なかった。さらに、検体中にA型とB型ウイルスの混入している割合が違う可能性が考えられ、元の検体中のA型ウイルスがB型ウイルスに比較して極端に多い場合には、トリプシンを添加しない状態でウイルスを試みても、結果的に培養上清中には同程度のA型、B型ウイルスが混在してしまうことも考えられたので、トリプシン添加の有無による分別分離するといった方法も採用しなかった。今回我々は、あらかじめ検体とウイルス型に特異的な抗血清とを混合し、抗血清と同型のウイルスの増殖を中和処理する方法で分別分離を行う方法を用いた。その際に、培養細胞としてNomaら¹⁰⁾が報告したMDCK(+)細胞を用いたことが、効率よく分別分離が可能であった理由の一つと考えている。すな

わち、このMDCK(+)細胞は、一般的に広く用いられているMDCK細胞とは異なり、培養液中にトリプシンを添加しなくても細胞内の内因性プロテアーゼによってA型インフルエンザウイルスの赤血球凝集素蛋白が開裂することで、多段増殖が可能であるという特徴を有している¹⁰⁾。一般的なMDCK細胞を用いたのでは、中和に用いた抗血清によって、培養液中に添加したトリプシンの作用が減弱されてしまい、結果的にA型ウイルスの増殖は抑制されてしまう可能性も考えられる。なお、今回我々が実施した分別分離の際には、念のために培養上清中にトリプシンも添加して培養を行っている。

最後に、分別分離の必要性について言及すれば、複数のインフルエンザウイルスの重複感染が予想される患者の検体を検査する場合、ウイルス学的に重複感染の有無を確認する目的のためだけであれば、RT-PCR法などの遺伝子学的検査法が、迅速性、正確性、また経済的に考えても適当であろう。しかし、A型とB型ウイルスによる重複感染の場合は、ウイルス遺伝子の交雑による新型ウイルスの出現の可能性を考慮する必要はないのかもしれないが、一方で、特にA(H1)型とA(H3)型ウイルスとの重複感染の場合には、ヒト体内で遺伝子交雑を起こしたウイルス¹⁷⁾が生じている可能性も考えられる。そのような場合には、患者からウイルスを分離し、その性状を確認しておくことは極めて重要である。その際には、先に示した酒匂ら¹³⁾、松浦ら¹⁴⁾、および島田ら¹⁵⁾の方法に加えて、今回我々が用いた分別分離法も有用な手法の一つになると思われる。

謝辞：今回の調査に協力いただきました、増田宏先生(ますだ小児科：広島県府中町)、新井幸男先生(新井こどもクリニック：埼玉県熊谷市)、中村英夫先生(中村小児科：石川県野々市町)河村一郎先生(かわむら小児科：山口県周南市)、山崎雅彦先生(座間小児科診療所：神奈川県座間市)、佐野康子先生(佐野医院小児科：新潟市)、坂本亘司先生(坂本小児科医院：佐賀県唐津市)、川上哲夫先生(川上こどもクリニック：埼玉県上尾市)、板垣勉先生(山辺こどもクリニック：山形県山辺町)、森美喜夫先生(もり小児科：広島市)、押田喜博先生(上飯野小児科：富山市)

の各先生方に、また、貴重な MDCK(+)細胞を分与下さいました、広島大学大学院医歯薬学総合研究科ウイルス学研究室の清谷克寛博士に深謝いたします。

文 献

- 1) 河合直樹, 岩城紀男, 佐藤家隆, 前田哲也, 川島崇, 重松 武, 他: 市中医療機関におけるインフルエンザ治療の現状. *インフルエンザ* 2003; 4: 227-33.
- 2) 川上千春, 三田村敬子, 木村和弘: 迅速診断キットの基礎検討. *インフルエンザ* 2003; 4: 317-24.
- 3) 岩崎紀男, 河合直樹, 池松秀之, 柏木征三郎: 2002年から2003年にかけてのインフルエンザの流行を振り返って. *臨床と研究* 2003; 80: 1921-30.
- 4) 市川正孝, 三田村敬子, 山崎雅彦, 木村和弘, 込山 修, 山本敬一, 他: イムノクロマトグラフィ法と酵素免疫法を組み合わせた原理による新しい迅速診断キット(エスプラインインフルエンザ A&B)の検討. *医学と薬学* 2003; 49: 469-78.
- 5) 原 三千丸, 高尾信一, 福田伸治, 島津幸枝, 宮崎佳都夫: A型インフルエンザに対する3種類のイムノクロマト法迅速診断キットの比較検討. *感染症誌* 2004; 78: 935-42.
- 6) 原 三千丸: インフルエンザの迅速診断. *インフルエンザ* 2005; 6: 35-9.
- 7) 三田村敬子, 山崎雅彦, 市川正孝, 木村和弘, 川上千春, 清水英明, 他: イムノクロマトグラフィ法と酵素免疫法を組み合わせた原理によるインフルエンザ迅速検査キットの検討. *感染症誌* 2004; 78: 597-603.
- 8) 原 三千丸, 高尾信一, 福田伸治, 島津幸枝, 桑山 勝, 宮崎佳都夫: B型インフルエンザに対する4種類のイムノクロマト法迅速診断キットの比較検討. *感染症誌* 2005; 79: 803-11.
- 9) 高尾信一, 金本康生, 妹尾正登, 野田雅博, 徳本静代: 混合プライマーを用いたPCR法によるインフルエンザウイルスの検出と同定. *広島県保健センター研究報告* 1994; 2: 9-13.
- 10) Noma K, Kiyotani K, Kouchi H, Fujii Y, Egi Y, Tanaka K, *et al.*: Endogenous protease-dependent replication of human influenza viruses in two MDCK cell lines. *Arch Virol* 1998; 143: 1898-909.
- 11) Takao S, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, Miyazaki K: Neuraminidase Subtyping of Human Influenza A Viruses by RT-PCR and Its Application to Clinical Isolates. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 204-5.
- 12) 正木明夫, 松浦久美子, 香取幸治, 永井美之: AH3型とB型インフルエンザウイルスによる混合感染の1例について. *小児感染免疫* 2003; 15: 199-205.
- 13) 酒匂光郎, 中山堯之, 相原勝敏, 岡 徹也, 野中実男, 根路銘国昭, 他: 同一患者より同時に分離されたA(H1)型ウイルスとA(H3)型ウイルスについて. *ウイルス* 1980; 30: 33-40.
- 14) 松浦久美子, 香取幸治, 永井美之, 正木明夫, 田中有易知: A(H3)型とB型インフルエンザによる混合感染の1例について. *富山衛研年報* 2002; 25: 172-75.
- 15) 島田慎一, 篠原美千代, 内田和江, 土井りえ, 河本恭子, 清水美穂, 他: A/H3N2型およびB型インフルエンザウイルスの同時感染例. *病原微生物検出情報月報* 2005; 26: 16-7.
- 16) 飛田清毅: MDCK細胞によるインフルエンザウイルスの分離. *臨床とウイルス* 1976; 4: 58-61.
- 17) 佐藤克彦, 森下高行, 榮 賢司: 海外渡航者より分離されたインフルエンザ AH1N2ウイルスについて. *感染症誌* 2004; 78: 476-81.

Eleven Cases of Co-infection with Influenza Type A and Type B Suspected by Use
of a Rapid Diagnostic Kit and Confirmed by RT-PCR and Virus Isolation

Shinichi TAKAO¹⁾, Michimaru HARA²⁾, Osamu KAKUTA³⁾, Yukie SHIMAZU¹⁾,
Masaru KUWAYAMA¹⁾, Shinji FUKUDA¹⁾ & Kazuo MIYAZAKI¹⁾

¹⁾Hiroshima Prefectural Institute of Health and Environment

²⁾Hara Pediatric Clinic

³⁾Kakuta Clinic

In the 2004/05 influenza season there were epidemics of influenza caused by several types of viruses (type B and A (H3) viruses, and type B, A (H3), and A (H1) viruses) in many areas of Japan. In such epidemics a single individual could be co-infected with several influenza viruses. From February to March in 2005, we examined 15 patients who were positive for influenza type A and B viruses when tested with a rapid diagnostic kit.

The type A (H3) and B influenza virus genes were successfully amplified by RT-PCR in 10 of the 15 patients, confirming that they were co-infected with type A (H3) and B viruses. The type A (H1) and B virus genes were successfully amplified in another patient, confirming that the patient was co-infected with type A (H1) and B viruses. By contrast, 2 patients were clearly positive for type A and B viruses according to the rapid diagnostic kit, but positive for type B virus alone by RT-PCR. No influenza virus genes were detected by RT-PCR in the remaining 2 patients.

To isolate one type from a mixture of two different types of influenza viruses in a specimen, we neutralized one of the types with type-specific antiserum, and isolated the other with MDCK (+) cells. The results obtained by virus isolation were identical to those obtained by RT-PCR. Influenza viruses corresponding to the results of RT-PCR were isolated from 9 of the 11 patients in which isolation was attempted. No viruses were isolated from the 2 patients in whom no virus genes were detectable by RT-PCR.

Based on these results we concluded that 11 of 15 patients who were positive for type A and B viruses according to the rapid diagnostic kit were co-infected with type A (H3) or A (H1) and B virus.

When several types of influenza viruses are prevalent, as in the 2004/05 influenza season, the possibility of a patient being co-infected with more than one type of influenza virus should be considered.