

リアルタイム PCR 法との比較による A 型および B 型インフルエンザ迅速診断キットの評価

¹⁾ 原小児科, ²⁾ 東京都健康安全研究センター微生物部, ³⁾ 広島県保健環境センター微生物第二部

原 三千丸¹⁾ 貞升 健志²⁾ 高尾 信一³⁾
 新開 敬行²⁾ 甲斐 明美²⁾ 福田 伸治³⁾
 島津 幸枝³⁾ 桑山 勝³⁾ 宮崎佳都夫³⁾

(平成 18 年 2 月 16 日受付)

(平成 18 年 6 月 2 日受理)

Key words: real-time PCR, influenza, viral load, rapid diagnosis

要 旨

A 型インフルエンザと比べて, B 型の迅速診断キットによる感度が不良であることの原因を調べるために, リアルタイム PCR 法による検討を行った. 2004/2005 年シーズンに, インフルエンザを疑われた小児の鼻咽腔吸引液の稀釈・遠心上清を用いて迅速診断試験 (エスプライン インフルエンザ A&B-N を含む 4 キットを使用) とウイルス分離を行った. これらの検査済みの保存検体を用いて, リアルタイム PCR によりウイルス量を測定した.

ウイルス分離による B 型陽性で迅速診断試験陰性 12 検体でのインフルエンザウイルス量 (RNA コピー数) の平均は, 6.6 ± 0.18 (\log_{10} コピー数/mL), B 型陽性迅速診断試験陽性 57 検体では 8.51 ± 0.57 , A 型陽性 (H3N2) で迅速診断試験陽性 36 検体の A 型 RNA コピー数は 8.72 ± 0.63 であった. B 型検体で迅速診断試験陰性群と陽性群の間には, 検体中のウイルス量に有意差がみられ ($p < 0.0001$), B 型の迅速診断試験陰性群と A 型の迅速診断試験陽性群の間にも有意差が存在した ($p < 0.0001$). B 型の迅速診断試験陽性群と A 型の迅速診断試験陽性群の間には, 有意差はみられなかった.

B 型に対する迅速診断キットの低感度の原因は, 検体中のウイルス量が少ないことによると思われる.

[感染症誌 80: 522~526, 2006]

序 文

筆者等は, 相次いで発売されたインフルエンザウイルス迅速抗原診断キットの主として A 型に対する検査成績を報告してきた^{1)~5)}. 優れたキットの出現により, 2003/04 年と 2004/05 年シーズンの鼻咽腔吸引液での検討では, A 型に関しては, 極めて正確に診断できることを報告した⁴⁾⁵⁾. しかし, 筆者等の経験 (Table 1)²⁾⁵⁾のみならず, 三田村等の報告⁶⁾においても, A 型と比べて B 型インフルエンザの迅速診断キットでの感度は低く, その理由は不明のままである. 今回, 比較的多数の B 型の検体を得ることができたので, 低感度の要因を明らかにするために, real-time polymerase chain reaction (以下リアルタイム PCR) を用

いて供試検体中のインフルエンザウイルス量を調べ, 迅速診断キットの反応性との比較検討を行ったので, その成績を報告する.

対象と方法

1. 検体とその処理法

2005 年 1 月より 4 月までの期間に, インフルエンザを疑われた小児より, 鼻咽腔吸引液を採取した. 吸引液を 1~3 mL の生理食塩水にて稀釈, 攪拌した後, 検体の一部を輸送培地に入れて, 広島県保健環境センター微生物第二部にてウイルス分離・同定¹⁾を行った. 残りの検体を, 2,000 回転 5 分間遠心して得られた上清を, 最終検体として迅速診断試験を行った. 迅速診断用には, エスプライン インフルエンザ A&B-N (富士レジオ, エスプラインと略す), ポクテム インフルエンザ A/B (シスメックス), QuickVue ラピッド SP influ (QUIDEL 社), キャピリア FluA+

別刷請求先: (〒736-0035) 広島県安芸郡海田町日の出町
6-6-202
原小児科 原 三千丸

Table 1 Sensitivity of rapid diagnostic tests in the influenza A and B patients confirmed by virus isolation in cell culture

| Seasons | Rapid test kits | Type A | | Type B | |
|---------------------------|--------------------------|----------|------------------|----------|------------------|
| | | Patients | Sensitivity (%) | Patients | Sensitivity (%) |
| 2001/02 | Influ A・B-Quick | | 95 | | 88 |
| | Capilia FluA, B | 135 | 96 ^{a)} | 74 | 84 ^{b)} |
| | Quick Vue Influenza Test | | 96 | | 91 |
| ESPLINE Influenza A&B - N | 100 ^{c)} | | 89 ^{d)} | | |
| 2004/05 | POCTEM INFLUENZA A/B | 40 | 95 | 163 | 87 |
| | Quick Vue Rapid SP influ | | 98 | | 88 |
| | Capilia FluA+B | | 98 | | 86 |
| | | | | | |

Significant differences : a)-b), p = 0.004. c)-d), p = 0.027

All specimens : nasopharyngeal aspirates

B (タウンズ) を使用した。4キットとも、A型とB型を鑑別できるワンデバイスのイムノクロマト法を原理としたキットである。これらのウイルス分離・同定と迅速診断試験の成績は、既に本誌に報告済みである⁵⁾。

今回、迅速診断試験を行った後、 -75°C で保存されていた検体(遠心上清)を用いて、リアルタイムPCRを行った。

2. リアルタイムPCR用の対象検体

2004/2005年シーズンの全278検体のウイルス分離にて、B型が163検体(A型とB型同時陽性1例を含む)から、A香港型(AH3と略す)が40検体(A型B型同時陽性1例を含む)から検出された⁵⁾。4種類のキットの中で最も感度の良かったエスプラインによるB型とA型の感度は、それぞれ89%、100%であった(Table 1)⁵⁾。B型のエスプライン陽性145検体中、他の3キットすべて陽性であったものは139検体であり、B型で4キットすべて陰性は、18検体であった。A型でエスプライン陽性40検体(偽陰性検体なし)の中で、エスプライン以外のキットで陰性を呈した検体は2検体であった⁵⁾。

これらの検体から、B型(ウイルス分離陽性)で4キットすべて陰性12検体(B型迅速診断陰性群と呼ぶ)、B型で4キットすべて陽性の57検体(B型迅速診断陽性群)、AH3で4キットともすべて陽性36検体(A型迅速診断陽性群)、A型、B型共にインフルエンザウイルス分離陰性32検体を用いて、リアルタイムPCRを行った。なお、インフルエンザウイルス分離陰性32検体中には、アデノウイルス1型が検出されたもの1検体、アデノウイルス2型1検体、単純ヘルペスウイルス1型1検体、ヒトメタニューモウイルス10検体(PCR法にて検出)が含まれていた。

3. リアルタイムPCR

リアルタイムPCRは、東京都健康安全研究センター微生物部にて行った。

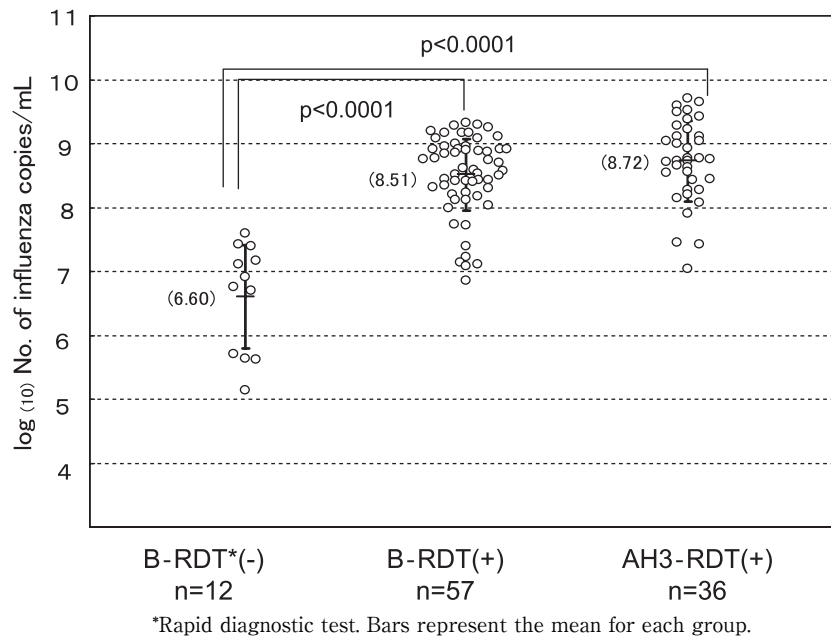
遠心上清140 μL よりQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、RNA溶液60 μL を得た。内5 μL とAH3型またはB型検出用プライマーをOmniscrypt Reverse Transcriptase 溶液(QIAGEN)に加え、 37°C 、60分間反応しcDNAを作製した。さらに、TaqMan Universal MasterMix 溶液(アプライドバイオシステムズジャパン:ABI)に、cDNAと蛍光プローブを加えて、ABI PRISM 7900 HT Genetic Analyser (ABI)により、 50°C (2分) $\rightarrow 95^{\circ}\text{C}$ (10分)の反応後、 $[95^{\circ}\text{C}$ (15秒) $\rightarrow 57^{\circ}\text{C}$ (1分)]を1サイクルとする、計45サイクルの反応条件で、インフルエンザウイルス遺伝子の検出を行った。

AH3型検出用リアルタイムPCR用プライマーは、RT-H3-588v2(TCAAGCATCAGGAAAAATCACA)およびRT-H3-653v2(CCTATATTCGGGATTACAGTTT)を、蛍光プローブとしてFlu-H3-611(FAM-TCTCTACCAAAGAAGCCA-MGB)を用いた^{7,8)}。

また、B型検出用プライマーとして、B-F210(CAAATCCTCAAAAAGTTCACCTCATC)およびB-R277(GCCGCCAATCTGAGAAACA)を、蛍光プローブとしてB-probe 239T(VIC-AATGGAGTAACCACACATT-MGB)を使用した。

リアルタイムPCR用標準コントロールとして、AH3型についてはRT-H3-588v2、AH3-PおよびRT-H3-653v2に相補的な配列を有する66塩基の合成鎖DNAを、B型については、B-F210、B-probe239TおよびB-R277に相補的な配列を有する68塩基の合成鎖DNAを作製した。各合成鎖DNAをTris・EDTA(pH8.0)に溶解後、 3×10^0 から 3×10^7 copies/ μL までの段階希釈系列を作り、標準コントロールとして各検体由来cDNAとともに検査に使用した。得られた定量値は遠心上清1mLあたりに換算し、有意差検定には、Mann-Whitney U testを用いた。なお、リアルタイムPCR用プライマーおよび蛍光プローブ

Fig. 1 Quantified Influenza A and B Viral Load by Real-Time PCR



はABIに、合成鎖DNAはファスマックに合成委託を行った。

成績

今回使用したリアルタイムPCR法の検出感度および定量性について、標準DNAを用いて検討した。その結果、AH3およびB検出系ともに検出感度は15 copies/tubeであり、 $1.5 \times 10^1 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/tubeの範囲内において、増幅されたDNA量に相関する検出曲線が得られ、横軸にコピー数、縦軸にPCRサイクル数をとった片対数グラフでは直線性を示した。

ウイルス分離B型陽性69検体とAH3分離陽性36検体の(重)型と、リアルタイムPCRによって検出された遺伝子のそれは完全に一致した。インフルエンザウイルス分離陰性32検体中、3検体からリアルタイムPCRによってB型遺伝子が検出された。そのRNAコピー数は極めて低値(\log_{10} コピー数/mL: 3.8, 3.4, 3.9)であった。残りの29検体は、検出感度以下で陰性と判定された。

B型迅速診断陰性群12検体のリアルタイムPCR法を用いた定量では、 \log_{10} コピー数/mLは 6.60 ± 0.81 (平均 \pm SD)であり、B型迅速診断陽性群57検体では 8.51 ± 0.57 であった(Fig. 1)。A型迅速診断陽性群36検体の \log_{10} コピー数/mLは、 8.72 ± 0.63 であった(Fig. 1)。B型迅速診断陰性群とB型迅速診断陽性群の間、B型迅速診断陰性群とA型迅速診断陽性群の間には、検体中のウイルス量に有意差がみられたが(いずれも $p < 0.0001$)、B型迅速診断陽性群とA型迅速診断陽性群の間には、有意差は存在しなかった($p = 0.12$)。

考察

インフルエンザの迅速診断キットが1999/2000年シーズンに本邦で使用可能となって以来、シーズン毎に、キットの開発および改良がなされてきた。最近、簡便性(ワンステップ)と迅速性(15分以内)に優れ、A型とB型を区別して一つのデバイスで判定できる(ワンデバイス)高感度のイムノクロマト法キットが主流となりつつある。

筆者等は迅速診断キットの発売以来、数種類のキットを用いて、その有用性の検討を重ねてきた^{1)~5)}。最近2シーズンの検討で、高感度のイムノクロマト法キットの出現により、A型インフルエンザに関しては、ほぼ完全に診断できることを報告した。すなわち、2003/04シーズン(A型95検体)⁴⁾と2004/05(A型40検体)⁵⁾シーズンのA型ウイルス分離陽性検体を使用したエスプランでの感度は、両者とも100%であった。しかし、比較的多くのB型検体が得られた2シーズンの検討²⁾⁵⁾では、Table 1に呈示したように、優れたキットを用いても、B型に対する感度は90%前後であり、すべてのキットでA型と比べ低感度であった。三田村等の報告⁶⁾でも、A型に比べて、B型の感度が劣ることが指摘されている。B型の低感度の原因は、キットの性能に問題があるのか、それとも、B型の検体中のウイルス量が少ないのかが考えられるが、結論は不明のままであった。今回筆者等が使用した4種類のキットに関して、培養ウイルス株を用いての最小検出感度試験の成績では、A型とB型のウイルス量は、ほとんど同等であるとする報告^{9)~11)}が多い。すなわち、A型とB型の検体中に同じ程度のウ

ウイルス量があれば、キットによる B 型の感度は、A 型に劣らないことを示唆している。

そこで、筆者等は、B 型の低感度の原因が、ウイルス量が少ないためかどうかを明らかにする目的で、リアルタイム PCR 法を用いて検体中のウイルス量の定量を行った。リアルタイム PCR 法とは、一対のプライマーと蛍光プローブを同時に PCR 法にて増幅し、標的 DNA 量を蛍光強度により解析する方法で、迅速性と定量性の面で優れた方法である。

2004/05 年シーズンの鼻咽腔吸引液の希釈・遠心上清で、ウイルス分離培養と迅速診断試験（4 キットを使用）済みの保存検体の一部を対象とした。十分な量が採取できたことを目視で確認した鼻咽腔吸引液を、さらに粘稠性を取り除くために希釈・遠心した上清であるので、ウイルスの定量を目的とするリアルタイム PCR に適う検体だと考えている。

ウイルス分離と迅速診断試験の結果により、3 群に分けて検体を選択してリアルタイム PCR を行った。すなわち、B 型ウイルス分離陽性迅速診断試験陰性 12 検体、B 型迅速診断試験陽性 57 検体、AH3 ウイルス分離陽性迅速診断試験陽性 36 検体である。最初に、ウイルス分離によって同定された B 型と AH3 は、リアルタイム PCR による結果と完全に一致した。次に、ウイルス量の定量では、B 型迅速診断陰性群の RNA コピー数は、他の 2 群（B 型迅速診断陽性群および A 型迅速診断陽性群）のコピー数と比べて、有意に低かった。B 型迅速診断陽性群と A 型迅速診断陽性群のコピー数の間に、有意差はみられなかった。

以上の成績から、B 型インフルエンザ患児の迅速診断試験が A 型と比べて低感度であった原因は、ウイルス量が少ないことが最大の要因だと推定された。この説をより強固にするために、シーズンを変えて、A 型迅速診断キット陰性群（一部のキットで陰性を含めて）を加えて、リアルタイム PCR のコピー数の定量を行う予定である。

B 型対象検体の患児の発熱の有無や病時期と、ウイルス量との間の相関を検討した。すなわち、発熱群（38.0℃ 以上）と無熱群（37.9℃ 以下）。最初に発熱（38.0℃ 以上）した日を 1 病日として、1 病日、2 病日、3～6 病日の 3 群。無熱群の中で 1 病日（微熱が最初に出た日）、2 病日、3、4 病日の 3 群。これらのそれぞれの群間に、相関は見出せなかった。言い換えれば、B 型の場合、患児の病状や検体採取時期に関係

なく、最適な検体を用いて最も優れたキットを選択しても、迅速診断試験が偽陰性になり得ることを念頭に入れて、診療しなければならない。ウイルス量の寡少が問題であるので、必ずしも容易ではないが、今後の B 型に対するキットの感度の改善を望みたい。

文 献

- 1) 原三千丸：2 種類のインフルエンザ迅速診断キットの比較検討。日児誌 2001；105：100—3.
- 2) 原三千丸：3 種類のインフルエンザ迅速診断キットの比較検討。日児誌 2003；107：35—9.
- 3) 原三千丸：A 型インフルエンザに対する 2 種類のイムノクロマト法迅速診断キットの比較検討。日児誌 2004；108：406—11.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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診断キットの検討。感染症誌 2004；78：597—603.
- 7) 新開敬行，貞升健志，長谷川道弥，田部井由紀子，長島真美，吉田靖子，他：重症急性呼吸器症候群（SARS）診断のための遺伝子検査法の確立。東京都健康安全研究センター年報 2004；55：25—9.
- 8) Shimada S, Sadamasu K, Shinkai T, Kakuta O, Kikuchi Y, Shinohara M, *et al.*: Virological analysis of a case of dual infection by influenza A (H3N2) and B viruses. *Jpn J Infect Dis* 2006；59：67—8.
- 9) 山崎雅彦，三田村敬子，川上千春：インフルエンザ迅速診断キットの現況。インフルエンザ 2003；4：43—50.
- 10) 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.
- 11) 奥野良信，中川直子，加瀬哲男，森川佐依子，馬場宏一，山本威久，他：A 型，B 型の鑑別が可能なインフルエンザ迅速診断キット「ポクテム インフルエンザ A/B」の評価。医学と薬学 2002；5：895—904.

Evaluation of Immunochromatography Test for Rapid Detection of
Influenza A and B Viruses Using Real-time PCR

Michimaru HARA¹⁾, Kenji SADAMASU²⁾, Shinichi TAKAO³⁾, Takayuki SHINKAI²⁾, Akemi KAI²⁾,
Shinji FUKUDA³⁾, Yukie SHIMAZU³⁾, Masaru KUWAYAMA³⁾ & Kazuo MIYAZAKI³⁾

¹⁾Hara Pediatric Clinic, ²⁾Department of Microbiology, Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, ³⁾Division of 2nd
Microbiology, Hiroshima Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science

The sensitivity of rapid diagnostic kits to influenza B is lower than to influenza A. The cause-poor performance of the kit or the scarcity of viruses in type B specimens has yet to be clarified. Using real-time PCR, we measured the amount of influenza viruses with nasopharyngeal aspirate fluid previously identified by virus isolation culture and passing the rapid diagnosis test by four types of kits, including the ESPLINE Influenza A&B-N (Fujirebio Corp., Japan).

We classified the results of virus isolation and rapid diagnosis tests into three groups and examined them: group 1 (12 specimens, influenza B, all negative in tests using four types of kits); group 2 (57 specimens, influenza B, all positive in tests); and group 3 (36 specimens, AH3, all positive in tests). The average amount of viruses in group 1 ($6.60 \pm 0.81 \log_{10}$ copies/mL) was significantly lower ($p < 0.0001$) than that in group 2 ($8.51 \pm 0.57 \log_{10}$ copies/mL) or group 3 ($8.72 \pm 0.63 \log_{10}$ copies/mL). No significant difference was seen in the amount of viruses between groups 2 and 3. We concluded that the cause of low sensitivity in rapid diagnostic kits to influenza B are attributable to the scarcity of viruses in the specimen.