

## 新規に開発された respiratory syncytial virus

## 迅速診断キットの有用性評価

<sup>1)</sup> 医療法人社団嗣業の会外房こどもクリニック, <sup>2)</sup> さいわいこどもクリニック, <sup>3)</sup> 若葉こどもクリニック

黒木 春郎<sup>1)</sup> 小口 薫<sup>2)</sup> 山崎 勉<sup>3)</sup>

(平成 27 年 2 月 26 日受付)

(平成 27 年 6 月 2 日受理)

Key words: RS virus, immunochromatography, rapid diagnosis, real-time PCR (RT-PCR)

## 要 旨

新規に開発された金コロイドを用いたイムノクロマトグラフィー法による respiratory syncytial virus (RSV) 迅速診断キットであるイムノキャッチ-RSV (栄研化学株式会社) (IC-A 法) に関して, 臨床的有用性を検討した。

2013 年 9 月~12 月に採取した鼻腔拭い液 210 検体, 及び鼻腔吸引液 134 検体を使用して, IC-A 法と既存の RSV 迅速診断キット 2 種 (IC-B 法, IC-C 法) の成績を比較した。IC-A 法は 8 分後, IC-B, IC-C 法は添付文書に記載されている時間を判定時間とした。

検体別に IC-A 法の RSV 陽性率を比較すると, 鼻腔拭い液は, 鼻腔吸引液共に約 35% で検体間による検出率の差は見られなかった。

鼻腔拭い液を検体とした場合, RT-PCR 法と IC-A 法, IC-B 法及び IC-C 法との全体一致率はそれぞれ, 96.2% (202/210), 89.5% (188/210), 90.5% (143/158) であった。鼻腔吸引液を検体とした場合, RT-PCR 法と IC-A 法, IC-B 法及び IC-C 法との全体一致率はそれぞれ, 96.3% (129/134), 94.0% (125/133), 97.7% (130/133) であった。

ウイルス培養液を用いて最小検出感度を確認した結果, IC-A 法では A 型 (Long 株)  $3.0 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL, B 型 (Wild 株)  $7.5 \times 10$  TCID<sub>50</sub>/mL まで陽性であった。

以上の結果より IC-A 法は既存キットに比べ感度, 特異度が同等以上であり, 判定時間が短縮されており, ベッドサイドにおける臨床的有用性が高いものと判断される。

[感染症誌 89: 574~578, 2015]

## はじめに

Respiratory syncytial virus (RSV) は, エンベロープを有するマイナス一本鎖 RNA ウイルスで, Paramyxovirus 科の中で, 血球凝集やノイラミニダーゼ活性を示さない Pneumovirus 属に分類される<sup>1)2)</sup>。温帯地方では毎年冬季に流行する呼吸器感染症の代表的な原因ウイルスの一つで, 2 歳までにほぼ 100% の人が初感染するが, 終生免疫は獲得されず, 感染を反復する。特に早産児や呼吸器系の基礎疾患を有する児において重症化しやすく, 初感染患者の 1~3% が入院治療を要するとされる<sup>3)~5)</sup>。ウイルス蛋白の抗原性の違いにより, 大きく A 型, B 型の 2 つのグループに

分けられ, 疫学的には A 型と B 型が交互に流行するが, ウイルスに感染した患者の臨床像に大きな差はみられないとされている<sup>6)7)</sup>。2013 年の人口動態統計によると, 本邦の RSV 感染症による死亡数は, 2008~2012 年の 5 年間で, 年平均 31.4 人 (28~36 人) と報告されており, 米国では年間 400 例ほどの小児が RSV 感染症により死亡していることが推測されている<sup>8)</sup>。また, 成人や高齢者の呼吸器感染症を惹起することも報告されており, 施設内感染の原因微生物としても重要である。従って, 迅速診断キットの臨床的必要性は高い<sup>9)</sup>。

今回, 新規に開発された金コロイドを用いたイムノクロマトグラフィー法による迅速診断キットであるイムノキャッチ-RSV に関して, 臨床的有用性を検討した。

別刷請求先: (〒299-4503) いすみ市岬町和泉 1880-4

外房こどもクリニック

黒木 春郎

## 対象と方法

### 1. 対象

2013年9月～12月の期間に、RSV感染症が疑われる下気道炎等の症状を呈して、関東地方4県の4医療機関（医療法人社団嗣業の会外房こどもクリニック・千葉県、若葉こどもクリニック・埼玉県、さいわいこどもクリニック・東京都、ゆいクリニック・神奈川県）を受診した患者344名から採取された鼻腔拭い液（210検体）または鼻腔吸引液（134検体）を対象とした。対象年齢は生後2週間から43歳で、全体での対象平均年齢は1歳8カ月、鼻腔拭い液では1歳9カ月（1月から43歳、中央値1歳5カ月）、鼻腔吸引液では1歳6カ月（生後2週間から7歳6カ月、中央値1歳4カ月）であった。検体は、診察時に採取し、全ての対象患者あるいは患児の保護者より文書により本研究への同意を得た。

### 2. 方法

#### 1) 検体採取方法

鼻腔拭い液は各RSV迅速診断キットに付属の綿棒を用いて鼻腔内を数回擦るようにして採取した。鼻腔吸引液は吸引器具を用いて検体を採取後、各RSV迅速診断キットに付属の綿棒にて必要量を各キットの検体抽出液に添加した。検体は採取した直後に各迅速診断キットにて測定を行い、残りの検体抽出液は凍結保存した。

#### 2) イムノキャッチ-RSV（栄研化学株式会社）（IC-A法）

IC-A法はイムノクロマトグラフィー法に基づくRSV迅速診断キットで、金コロイドを担体として用いている。A型及びB型RSVの双方を認識するモノクローナル抗体を使用しているため、A型及びB型のRSVを幅広く検出することができる。操作は添付文書に記載された方法に従って行い、8分後に、赤色のテストライン及びコントロールラインが確認されたものを陽性と判定した。

#### 3) 対照試薬（IC-B法、IC-C法）

比較対照試薬として、既存のRSV迅速診断キット2種、クイックチェイサーRSV（株式会社ミズホメディー）及びプライムチェックRSV（アルフレッサファーマ株式会社）を使用した。2キット共に金コロイドを担体として用いたRSV抗原検出用試薬で、イムノクロマトグラフィー法を測定原理としている。IC-B法及びIC-C法の使用方法は、各添付文書に記載された方法に従った。

#### 4) RT-PCR法

RT-PCR法は、Stocktonらの方法に準じて行った<sup>10)</sup>。測定には、迅速診断キットで使用した残りの検体抽出液を凍結保存し、凍結状態のまま輸送したものを融解

して使用した。IC-A法に用いた懸濁液を遠心分離（10,000rpm, 5min）後、上清からQIAamp Viral RNA Mini Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出し、逆転写反応にてcDNAを合成した。さらに、合成したcDNAを用いてPCRを行い、増幅産物はエチジウムブロマイドを添加した1.5%アガロースゲルで電気泳動後、A型：334bp、B型：183bpに相当するバンドの有無を確認した。迅速診断キットの比較で結果が乖離した検体については、IC-B法及びIC-C法の測定に使用した検体抽出液を用いて同様に試験した。実験は、栄研化学株式会社にて実施した。

#### 5) 迅速診断キットの比較

鼻腔拭い液及び鼻腔吸引液を検体とし、各迅速診断キットに関してRT-PCR法との陽性一致率、陰性一致率、全体一致率を比較した。

#### 6) 検体種別陽性率の比較

RT-PCR法及びIC-A法の判定結果より、試験期間中に収集した鼻腔拭い液及び鼻腔吸引液の全検体数に対する陽性率を算出した。

#### 7) 最小検出感度の比較

A型（Long株）及びB型（Wild株）の培養液を用いてイムノクロマトグラフィー法試薬3種の最小検出感度を確認した。各キット付属の綿棒にて培養液を採取し抽出液に懸濁したものを試料原液として2倍希釈系列を作製し、各キットの検出限界を比較した。本試験は、栄研化学株式会社で行った。

## 成績

### 1. 検体種別の陽性率比較

RT-PCR法の解析結果を基に、検体種別の陽性率を比較した結果、鼻腔拭い液での陽性率は37.6%（79/210）、鼻腔吸引液では36.6%（49/134）、検体全体では37.2%（128/344）であった。さらに、この陽性率を0歳～1歳未満、1歳～2歳未満、2歳～3歳未満、3歳～4歳未満、4歳以上と年齢別に分けた場合、鼻腔拭い液ではそれぞれ、34.2%（27/79）、42.2%（35/83）、42.9%（12/28）、50.0%（3/6）、14.3%（2/14）、鼻腔吸引液ではそれぞれ、42.9%（24/56）、37.5%（18/48）、31.6%（6/19）、0.0%（0/1）、10.0%（1/10）、検体全体ではそれぞれ、37.8%（51/135）、40.5%（53/131）、38.3%（18/47）、42.9%（3/7）、12.5%（3/24）であった。また、IC-A法の測定結果を基に検体種別の陽性率を比較した結果、鼻腔拭い液での陽性率は33.8%、鼻腔吸引液では35.8%、検体全体では34.6%であり、検体種別の陽性率に有意差はみられなかった（ $p=0.6509$ ）。

### 2. 臨床検体におけるキットの成績比較

#### 1) 鼻腔拭い液

RT-PCR法と、IC-A、IC-B及びIC-C法との成績比較をTable 1に示した。

RT-PCR法とIC-A法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ89.9% (71/79), 100.0% (131/131), 96.2% (202/210)で8例が偽陰性と判定された。

RT-PCR法とIC-B法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ81.0% (64/79), 94.7% (124/131), 89.5% (188/210)で、15例が偽陰性、7例が偽陽性と判定された。

RT-PCR法とIC-C法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ76.9% (50/65), 100.0% (93/93), 90.5% (143/158)で、15例が偽陰性と判定された。IC-A法とIC-B法 ( $p=0.0044$ ), 及びIC-A法とIC-C法 ( $p=0.0131$ )の全体一致率ではIC-A法が有意に高値であったが、IC-B法とIC-C法では有意差が認められなかった ( $p=0.3868$ )。

## 2) 鼻腔吸引液

RT-PCR法と、IC-A、IC-B及びIC-C法との成績比較をTable 2に示す。

RT-PCR法とIC-A法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ93.9% (46/49), 97.6% (83/85), 96.3% (129/134)で、3例が偽陰性、2例が偽陽性と判定された。偽陽性と判定された2例は、IC-B、IC-C法では陰性であった。

Table 1 Comparisons of IC-A, IC-B, IC-C and RT-PCR for the detection of RSV in nasal swabs

Nasal swab	RT-PCR			Concordance Rate	
	Positive	Negative	Total		
IC-A	Positive	71	0	71	Positive: 89.9%
	Negative	8	131	139	Negative: 100.0%
	Total	79	131	210	Total: 96.2%
IC-B	Positive	64	7	71	Positive: 81.0%
	Negative	15	124	139	Negative: 94.7%
	Total	79	131	210	Total: 89.5%
IC-C	Positive	50	0	50	Positive: 76.9%
	Negative	15	93	108	Negative: 100.0%
	Total	65	93	158	Total: 90.5%

RT-PCR法とIC-B法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ91.8% (45/49), 95.2% (80/84), 94.0% (125/133)で、4例が偽陰性、4例が偽陽性と判定された。偽陽性と判定された4例は、IC-A、IC-C法では陰性であった。

RT-PCR法とIC-C法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ95.9% (47/49), 98.8% (83/84), 97.7% (130/133)で、2例が偽陰性、1例が偽陽性と判定された。偽陽性と判定された1例は、IC-A、IC-B法では陰性であった。IC-A法とIC-B法 ( $p=0.1983$ ), IC-A法とIC-C法 ( $p=0.7523$ )及びIC-B法とIC-C法 ( $p=0.0670$ )の全体一致率では有意差が認められなかった。

## 3. 最小検出感度

A型及びB型ウイルス培養液 ( $2.4 \times 10^5$ TCID<sub>50</sub>/mL)を各キットの抽出液にて2倍希釈系列を作製し、感度試験を行った結果をTable 3に示した。IC-A法はA型ウイルス培養液  $3.0 \times 10^2$ TCID<sub>50</sub>/mL, B型ウイルス培養液  $7.5 \times 10^2$ TCID<sub>50</sub>/mLまで検出された。IC-B法及びIC-C法は、A型ウイルス培養液, B型ウイルス培養液共に  $6.0 \times 10^2$ TCID<sub>50</sub>/mLまで検出可能であった。

Table 2 Comparisons of IC-A, IC-B, IC-C and RT-PCR for the detection of RSV in nasopharyngeal aspirate

Nasopharyngeal aspirate	RT-PCR			Concordance Rate	
	Positive	Negative	Total		
IC-A	Positive	46	2	48	Positive: 93.9%
	Negative	3	83	86	Negative: 97.6%
	Total	49	85	134	Total: 96.3%
IC-B	Positive	45	4	49	Positive: 91.8%
	Negative	4	80	84	Negative: 95.2%
	Total	49	84	133	Total: 94.0%
IC-C	Positive	47	1	48	Positive: 95.9%
	Negative	2	83	85	Negative: 98.8%
	Total	49	84	133	Total: 97.7%

Table 3 Evaluation of the minimum detectable titer

Sub-group	Virus titer (TCID <sub>50</sub> /mL)	IC-A result at 8 min	IC-B result at 15 min	IC-C result at 10 min
RSV-A	$2.4 \times 10^3$	Positive	Positive	Positive
	$1.2 \times 10^3$	Positive	Positive	Positive
	$6.0 \times 10^2$	Positive	Positive	Positive
	$3.0 \times 10^2$	Positive	Negative	Negative
	$1.5 \times 10^2$	Negative	Not measured	Not measured
RSV-B	$1.2 \times 10^3$	Positive	Positive	Positive
	$6.0 \times 10^2$	Positive	Positive	Weakly positive
	$3.0 \times 10^2$	Positive	Negative	Negative
	$1.5 \times 10^2$	Positive	Not measured	Negative
	$7.5 \times 10^1$	Weakly positive	Not measured	Not measured
$3.8 \times 10^1$	Negative	Not measured	Not measured	

## 考 察

RSV 感染症の診断には、ウイルス分離法、抗原検出法、遺伝子検出法、抗体検査法が挙げられるが、最も簡便で短時間に測定できることから、イムノクロマトグラフィー法を用いた RSV 迅速診断キットが広く普及している<sup>11)12)</sup>。現在は数種類のキットが発売されているが、今回我々が評価した IC-A 法は、判定時間が 8 分で、既存キットより短時間で診断することが可能であり、視認性も良好であった。RSV の感染経路は飛沫感染と接触感染であるが、感染伝播リスクが高い感染症と認識される<sup>2)13)14)</sup>。短時間に RSV 感染症が診断されることにより、適切な施設内感染対策がより迅速に講じられることが期待される。

臨床検体におけるキットの成績比較では、Table 1、2 に示したように、RT-PCR 法と IC-A、IC-B、IC-C 法との全体一致率は約 90% と良好な成績が得られた。また Table 3 に示したように、培養した RSV を用いたキットの感度比較では、各添付文書記載の判定時間 IC-A 法 8 分、IC-B 法 15 分、IC-C 法 10 分での測定結果を比べるとサブグループ A、B 共に IC-A 法が 3 キット中最も高感度であった。

RSV は気道上皮に親和性が高く、ウイルス感染後増殖して細胞を破壊し発病に至るため<sup>15)</sup>、検体として鼻腔吸引液や鼻腔拭い液が使用される。過去の報告では、咽頭拭い液や鼻腔拭い液よりも鼻腔吸引液の方が感度よく検出されると報告されているが<sup>16)17)</sup>、年齢や症状等によって採取可能な検体が異なり、検体の性状にも差が見られる。IC-A 法は検体として、鼻腔拭い液、鼻腔吸引液共に測定可能であるため、両検体の IC-A 法測定結果を比較した。その結果、検体間や検体の性状による影響は認められず、いずれの検体を用いても陽性率は約 35% で、有意差が認められなかった。これは今回、RSV 感染症の疑われる患者を対象としたため、鼻腔拭い液採取時にも本感染症の主症状の一つである鼻汁が多く採取され、鼻腔吸引液と鼻腔拭い液の検体種間差が生じなかったと推測される。この結果は、過去に報告された外来診療例の陽性率とほぼ同等であった<sup>18)</sup>。

以上のように、イムノキャッチ-RSV は感度、特異度共に十分な性能を有すると考えられた。RSV 迅速診断キットは 2011 年に保険適応範囲が拡大され、使用機会が増加していると推測されるが、外来診療での保険適用は 1 歳未満である。今回の検討では、2 歳以上の呼吸器感染患児においても陽性検体が多く、RSV は乳児のみでなく幼児においても重要な呼吸器病原微生物であることが確認された。一般に、年長児や成人における RSV 感染症は比較的軽症の経過をとることが多いが、乳幼児への感染源となることが危惧され、

適切な病原診断の適用が期待される。

謝辞：今回、鼻腔吸引検体を提供していただきました。ゆいクリニックの由井郁子先生には深く御礼申し上げます。

利益相反自己申告：日本感染症学会の定める利益相反指針に記されている内容のうち、申告すべきものはないが、今回試験に使用した試薬は全て、栄研化学株式会社より提供されたため、保険取裁からは除外した。患者へは検体採取前に本試験について書面にて十分に説明した上で、同意を得た。各施設にて診断した後、検体抽出液の残液を栄研化学株式会社が収集し、RT-PCR を実施した。その他、全著者は日本臨床検査薬協会が定めた『体外診断用医薬品取り扱い指針』に記載されている金額に基づき、栄研化学株式会社より臨床試験に関する資金の提供を受けている。

## 文 献

- Collins PL, Karron RA: Respiratory syncytial virus and Metapneumovirus. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology* (6th edition). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2013; p. 1086—23.
- Falser AR, Walsh EE: Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 371—84.
- Boyce TG, Mellen BG, Mitchel EF Jr, Wright PF, Griffin MR: Rates of hospitalization for respiratory syncytial virus infection among children in medicaid. *J Pediatr* 2000; 137: 865—70.
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, *et al.*: The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009; 5: 360 (6): 588—98.
- Hall CB, Weinberg GA, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Schultz AF, *et al.*: Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics* 2013; 132: 341—8.
- 永井和重, 堤 裕幸: RS ウイルス感染症総論. *小児科診療* 2007; 12: 2237—41.
- Cane PA: Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001; 11: 103—16.
- American Academy of Pediatrics: Respiratory syncytial virus. In: Pickering LK, Baker CJ, Kimberlin DW, Long SS, eds. *Red Book: 2012 Report of the Committee on Infectious Diseases* 29th edition. American Academy of Pediatrics, Elk Grove Village, Illinois, 2012; p. 609—18.
- 河合直樹, 池松秀之, 岩城紀男, 川島 崇, 前田哲也, 廣津伸夫, 他: PCR による高齢者を含めた RS ウイルス検出例の検討—新しい迅速診断キットの使用経験を含めて—. *感染症誌* 2008; 82: 1—5.

- 10) Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC : Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol* 1998 ; 36 : 2990—5.
- 11) 七種美和子, 武内可尚, 長 秀男, 安部 隆, 宗村徹也, 川上千春 : イムノクロマトグラフィー法を用いた respiratory syncytial virus 診断キットの検討. *感染症誌* 2003 ; 77 : 443—50.
- 12) 武山 彩, 橋本浩一, 川崎幸彦, 片寄雅彦, 細矢光亮 : RS ウイルス迅速診断の有用性と問題点—定量的リアルタイム PCR 法をスタンダードとした検討—. *小児感染免疫* 2010 ; 22 : 337—41.
- 13) Isao M, John PD : Human Genetic Factors and Respiratory Syncytial Virus Disease Severity. *Clin Microbiol Rev* 2008 ; 21 : 686—03.
- 14) William WT, David KS, Eric W, Lynnette B, Nancy C, Larry JA, *et al.* : Mortality Associated With Influenza and Respiratory Syncytial Virus in the United States. *JAMA* 2003 ; 289 : 179—86.
- 15) 堤 裕幸 : RS ウイルス. *ウイルス* 2005 ; 55 : 77—84.
- 16) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会 : Respiratory syncytial (RS) ウイルス. 上原すゑ子, 砂川慶介監修, 小児呼吸器感染症診療ガイドライン 2007. 協和企画, 東京, 2007 ; p. 22—3.
- 17) Heikkinen T, Jane M, Aimo AS, Olli R : Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2002 ; 40 : 4337—9.
- 18) 青木知信, 堤 裕幸, 武内可尚 : 本邦における RS ウイルス感染症の疫学 RS ウイルス感染症疫学研究会中間報告 (2002 年 9 月—2003 年 8 月). *小児科診療* 2005 ; 68 : 1757—62.

#### Usefulness of a Newly Developed Immunochromatographic Assay Kit for the Detection of Respiratory Syncytial Virus

Haruo KUROKI<sup>1)</sup>, Kaoru OGUCHI<sup>2)</sup> & Tsutomu YAMAZAKI<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>Medical corporation Shigyo-no-kai Sotobo Children's Clinic, <sup>2)</sup>Saiwai Pediatric Clinic, <sup>3)</sup>Wakaba Children's Clinic

We evaluated the usefulness of IMMUNOCATCH-RSV (Eiken chemical Co., Ltd.) (IC-A), a newly developed immunochromatographic assay kit for detection of respiratory syncytial virus (RSV).

For the clinical study, 210 nasal swabs and 134 nasopharyngeal aspirates were collected from pediatric patients with acute respiratory tract infections in 2013. Three immunochromatographic assay kits (IC-A, IC-B and IC-C), and the RT-PCR method were used for the detection of RSV. The detection times for IC-A, IC-B and IC-C were 8, 15 and 10 minutes, respectively.

The positive rates for IC-A using nasal swabs and nasopharyngeal aspirates were 33.8% and 35.8%, respectively.

For the nasal swab specimens, the total concordance rates of RT-PCR with IC-A, IC-B and IC-C were 96.2% (202/210), 89.5% (188/210), and 90.5% (143/158), respectively. As for the nasopharyngeal aspirates, the total concordance rates of RT-PCR with IC-A, IC-B and IC-C were 96.3% (129/134), 94.0% (125/133), and 97.7% (130/133), respectively.

The minimum detection concentration of IC-A was  $3.0 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub>/mL for the RSV subgroup A strain, and  $7.5 \times 10$  TCID<sub>50</sub>/mL for the RSV subgroup B strain.

In conclusion, the current data indicate that IC-A is a useful kit for more rapid and accurate detection of RSV infection.