

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

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⁾
伊勢原協同病院小児科⁴⁾, 日本鋼管病院小児科⁵⁾

清水 英明¹⁾ 渡辺 寿美²⁾ 川上 千春³⁾ 平位 芳江¹⁾
木村 和弘⁴⁾ 菅谷 憲夫⁵⁾ 今井 光信²⁾

(平成10年5月7日受付)

(平成10年6月1日受理)

Key words: influenza A virus, rapid diagnosis, ELISA

要 旨

A 型インフルエンザウイルスの迅速診断法である抗原検出キット Directigen Flu A についての評価を目的として、各種検討を行なった。

現在までにヒトで流行した A (H1N1, H2N2, H3N2) 型17株および1997年に香港でヒトから分離された H5N1 (Hongkong/156/97) すべてに反応し、抗原の変異、亜型間での差は認められなかった。また、A 型インフルエンザウイルス以外の呼吸器系ウイルスとの交差反応はみられなかった。

ブランク定量したウイルス液を用いた検出限界の測定では、 2.4×10^3 pfu/assay のウイルス量で陽性と判定することが可能であった。

呼吸器系疾患が認められる小児から採取した臨床検体を用い、細胞培養によるウイルス分離との比較を行なった。咽頭ぬぐい液を検体とした場合、感度は77.9%、特異性は98.4%であった。鼻汁吸引液では感度は92.1%、特異性は100%で、高い感度および特異性が証明された。

この検査キットは他のインフルエンザ診断法に比べて簡便かつ迅速な検出が可能であり、約10~15分で結果が得られることから、様々な医療現場において有用であると考えられる。

序 文

1997年5月に香港において、今までトリのインフルエンザウイルスとされていた A (H5N1) がヒトから分離され¹⁾、新型インフルエンザウイルスとして世界的に注目された。過去にも1918年 (H1N1)、1957年 (H2N2)、1968年 (H3N2) に A 型インフルエンザウイルスの不連続変異が引き起こす汎流行によって多数の死者、罹患者が発生しており、今回出現した A (H5N1) についても世界的な流行が危惧されている。

国立感染症研究所と地方衛生研究所によるインフルエンザウイルスの分離調査報告²⁾によると、A

型インフルエンザウイルスは、毎年必ず A (H1N1) あるいは A (H3N2) が冬期に数多く分離され、年間でのウイルス分離数は他の呼吸器系ウイルスに比べて圧倒的に多い。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、新型ウイルスの出現の有無にかかわらず、インフルエンザウイルス感染による社会的影響は大きい。特に、乳幼児、高齢者および呼吸器・循環器等基礎疾患を持つハイリスクグループは重症化しやすく³⁾、死亡例も多いと考えられ、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、培養細胞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、結果を得るまでに長期

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

平成10年8月20日

間かかり、診断・治療に結びつけることは難しい。そのため、迅速診断法として reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法がインフルエンザウイルスの診断に応用されている⁴⁾⁵⁾。RT-PCR 法は高感度で、特異性の高い検査法であるが、遺伝子等を扱う施設が必要なため、研究室レベルの検査法にとどまり、一般的な医療機関に導入することは現段階では困難と思われる。

今回、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) を用いたインフルエンザウイルス抗原検出キットである Directigen Flu A (Becton Dickinson, USA) について各種試験を行ない、インフルエンザの診断への有用性の検討を行なった。

材料と方法

1. 使用ウイルス

ヒト由来の A 型インフルエンザウイルスである H1N1 (PR/8/34, FM/1/47, NJ/8/76, Kumamoto/37/79, Yamagata/120/86, Yamagata/32/89, Beijing/262/95), H2N2 (Singapore/1/57), H3N2 (Aichi/2/68, Bangkok/1/79, Philippines/2/82, Yamagata/96/85, Sichuan/2/87, Guizhou/54/89, Shiga/2/91, Kitakyusyu/159/93, Wuhan/359/95), H5N1 (Hongkong/156/97), トリ由来の H4N6 (Duck/CZ/1/56), H7N3 (Turkey/England/1/63) およびブタ由来の H1N1 (SW/Iowa/15/30) を用いた。また、A 型インフルエンザウイルス以外のウイルスとして、B 型インフルエンザウイルス (Mie/1/93, Guangdong/05/94), 1997年に神奈川県内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, エコーウイルス 3・9・11・25・30 型, エンテロ 71 型, ムンプスウイルスおよびライノウイルス 1A の標準株を用いた。

2. 臨床検体

1997年11月から1998年3月にかけて神奈川県内で発生した集団かぜ児童から採取したうがい液98件および医療機関にインフルエンザ様の呼吸器症状で来院した患者の咽頭ぬぐい液175件、鼻汁吸引

液45件を採取した。なお、検体採取液には0.5%ゼラチン加PBS(-)を使用した。検体の採取法として、うがい液は、5mlの採取液で約1分間うがいをさせて、滅菌した容器に採取した。咽頭ぬぐい液は、滅菌した綿棒で咽頭部分を擦過し、1.5mlの採取液の入った試験管に綿棒を入れ攪拌後、綿棒を除いた。鼻汁吸引液は、ディスポーサブルシリンジに装着した滅菌カテーテルを鼻咽頭まで挿入し、鼻汁を採取した。1ml~2mlの鼻汁を4mlの採取液の入った試験管に加え、攪拌した。全ての検体に終濃度100U/mlのペニシリン、1mg/mlのストレプトマイシンを加え、3,000rpmで20分間遠心し、その上清を検査に使用した。

3. Directigen Flu A を用いたインフルエンザウイルスの抗原検出

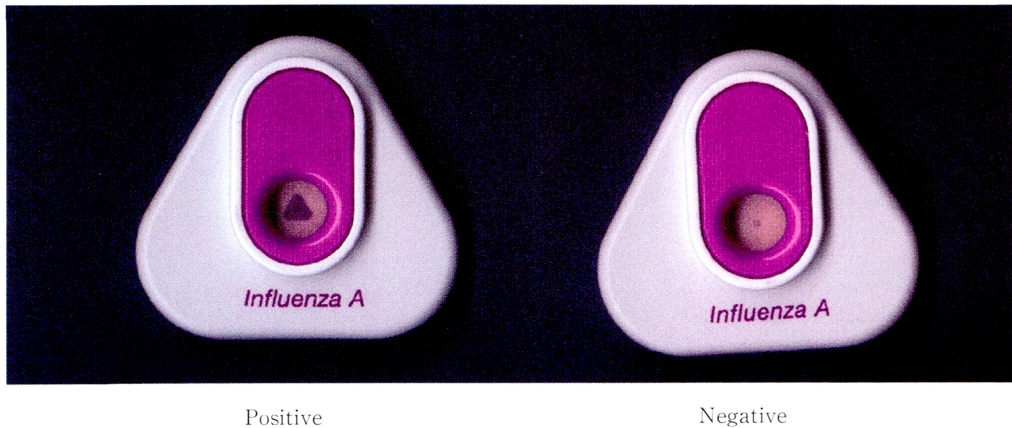
Directigen Flu A は A 型インフルエンザウイルス抗原をナイロン膜上に吸着させ、ELISA によって発色の有無を確認するキットである。

検査法についてはキットに添付されたプロトコールに従って行なった。すなわち、フィルターの付いた分注チューブに125 μ lの検体を入れ、Tween 20加溶解液を8滴(約200 μ l)加えて混合する。その処理検体をキット本体のナイロン膜上に全量滴下し、膜に吸着させて、洗浄液で洗浄する。その後、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を含む反応液を加え、2分間反応させる。膜を洗浄後、基質(3-indoxyl phosphate)を含んだ発色液を加えて5分後に判定する。判定は膜上に紫色の三角形が可視された場合をA型インフルエンザウイルス陽性とし、三角形が認められず、膜の中心にコントロールとして吸着したA型インフルエンザウイルス抗原の紫色のドットのみ観察された場合は陰性とする(Fig. 1)。

4. 細胞培養によるウイルス分離

インフルエンザウイルスの分離にはMDCK細胞および一部の検体についてCaCo-2細胞を使用した。24穴のマイクロプレートに単層の細胞を作製し、PBS(-)で洗浄後、150 μ lの検体を接種し37°Cで30分吸着後、トリプシン加イーグルMEMを加え、34°Cでインキュベートした。2代まで継

Fig. 1 Directigen Flu A device showing positive and negative results



代して細胞変性効果の認められたものについて、0.5%モルモット血球を用いて血球凝集能を測定後、血球凝集抑制 (HI) 試験を行ない同定した。

5. ウイルスの定量

ブランク定量法を用いてウイルス量を測定した A/Yamagata/32/89 (H1N1), A/Kitakyusyu/159/93 (H3N2) について 10^{-2} ~ 10^{-6} までの希釈列を作製し、その希釈ウイルスを用いて検査キットの検出限界について調査した。

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18株について Directigen Flu A の反応性を調査したところ、すべての株で発色を呈し、陽性の反応が認められた。また、ブタ A 型 (SW/Iowa/15/30), トリ A 型 (Duck/CZ/1/56, Turkey/England/1/63) インフルエンザウイルスについても同様に反応が認められ、今回使用した A 型インフルエンザウイルスの全ての株が検出可能であった。しかし、B 型インフルエンザウイルス、その他のウイルスでは発色は認められず、交差反応はみられなかった (Table 1)。

2. 検出限界の検討

ブランク定量法の結果、A/Yamagata/32/89は 1.8×10^8 pfu/ml, A/Kitakyusyu/159/93は 2.0×10^8 pfu/ml のウイルス量であった。その希釈ウイルスを用いた Directigen Flu A の検出限界の測

定では A/Yamagata/32/89, A/Kitakyusyu/159/93の両株とも原液の 10^{-4} 希釈まで反応が認められた。これらのウイルス希釈液中には A/Yamagata/32/89で 1.8×10^4 pfu/ml, A/Kitakyusyu/159/93で 2.0×10^4 pfu/ml のウイルス粒子が存在し、キットに使用する $125 \mu\text{l}$ 中にそれぞれ 2.3×10^3 pfu, 2.5×10^3 pfu まで発色を判別できた。

3. 臨床検体を用いた細胞培養との比較

臨床検体について Directigen Flu A でインフルエンザウイルスの抗原検出を行ない、細胞培養によるウイルス分離との比較を行なった。なお、感度および特異性は細胞培養を基準として測定した。

鼻汁吸引液を検体とした場合の検出結果を Table 2 に示した。45件中 A 型インフルエンザウイルスが分離されたのは 38例 (84.4%)、Directigen Flu A では35例 (77.8%) が陽性で、感度は92.1%、特異性は100%であった。咽頭ぬぐい液での検出結果 (Table 3) では175件中 A 型インフルエンザウイルスが分離されたのは 113例 (64.5%)、Directigen Flu A 陽性は89例 (50.9%) で感度は77.9%、特異性は98.4%であった。うがい液の検出結果を Table 4 に示した。98件中ウイルス分離では47例 (48.0%) がインフルエンザ A 型陽性に対し、Directigen Flu A 陽性はわずか6例 (6.1%) で、感度は12.8%、特異性は100%で

Table 1 Reactivity of Directigen Flu A with isolated virus

Positive	Negative
Influenza A, PR/8/34 (H1N1)	Influenza B, Mie/1/93
Influenza A, FM/1/47 (H1N1)	Influenza B, Guangdong/05/94
Influenza A, NJ/8/76 (H1N1)	Parainfluenzavirus type 1
Influenza A, Kumamoto/37/79 (H1N1)	Parainfluenzavirus type 2
Influenza A, Yamagata/120/86 (H1N1)	Parainfluenzavirus type 3
Influenza A, Yamagata/32/89 (H1N1)	Respiratory syncytial virus
Influenza A, Beijing/262/95 (H1N1)	Adenovirus type 1
Influenza A, SW/Iowa/15/30 (H1N1)	Adenovirus type 2
Influenza A, Singapore/1/57 (H2N2)	Adenovirus type 3
Influenza A, Aichi/2/68 (H3N2)	Adenovirus type 4
Influenza A, Bangkok/1/79 (H3N2)	Adenovirus type 5
Influenza A, Philippines/2/82 (H3N2)	Adenovirus type 6
Influenza A, Yamagata/96/85 (H3N2)	Adenovirus type 7
Influenza A, Sichuan/2/87 (H3N2)	Echovirus type 3
Influenza A, Guizhou/54/89 (H3N2)	Echovirus type 9
Influenza A, Shiga/2/91 (H3N2)	Echovirus type 11
Influenza A, Kitakyusyu/159/93 (H3N2)	Echovirus type 25
Influenza A, Wuhan/359/95 (H3N2)	Echovirus type 30
Influenza A, Duck/CZ/1/56 (H4N6)	Enterovirus type 71
Influenza A, Hongkong/156/97 (H5N1)	Mumpsvirus
Influenza A, Turkey/England/1/63 (H7N3)	Rhinovirus type 1A

Table 2 Sensitivity and specificity of the Directigen Flu A with nasopharyngeal aspirate specimens (n=45)

Result by virus isolation (No. of specimens)	Result by Directigen Flu A		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Positive	Negative		
Positive (38)	35	3	92.1%	—
Negative (7)	0	7	—	100%

Table 3 Sensitivity and specificity of the Directigen Flu A with throat swab specimens (n=175)

Result by virus isolation (No. of specimens)	Result by Directigen Flu A		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Positive	Negative		
Positive (113)	88	25	77.9%	—
Negative (62)	1	61	—	98.4%

Table 4 Sensitivity and specificity of the Directigen Flu A with gargle specimens (n=98)

Result by virus isolation (No. of specimens)	Result by Directigen Flu A		Sensitivity (%)	Specificity (%)
	Positive	Negative		
Positive (47)	6	41	12.8%	—
Negative (51)	0	51	—	100%

あった。

考 察

インフルエンザウイルスの迅速診断法として、蛍光抗体法 (IF)⁶⁾⁷⁾や ELISA⁸⁾⁹⁾を使用した抗原検出の報告がみられるが、これらの方法は本邦では実用化されておらず、RT-PCR法が主流となっている。

今回、迅速診断法として ELISA を用いたインフルエンザウイルス抗原検出キットである Directigen Flu A の検討を行った。このキットは A 型インフルエンザウイルス核蛋白 (NP) を抗原としたモノクローナル抗体を使用しているため、亜型の区別なく A 型インフルエンザウイルスを検出することができ、検査に使用したヒト、トリ、ブタのすべての A 型インフルエンザウイルスに反応が認められた。このことから、連続変異 (drift) によって抗原性が違う A 型インフルエンザウイルスや不連続変異 (shift) によって、いわゆる新型インフルエンザウイルスが出現した場合でも迅速に検査をすることが可能である。また、トリやブタの A 型インフルエンザウイルス抗原に対しても発色を呈したことから、このキットはヒトにおける検査目的だけでなく、トリやブタのインフルエンザウイルスのスクリーニング検査にも使用することができ、ヒト以外のインフルエンザウイルス検査試薬としても有効であることが示唆された。

臨床検体別の検出率では、使用した検体によって明確な差が認められた。MDCK 細胞を用いた細胞培養によるウイルス分離との比較の結果、うがい液を検体とした場合、Directigen Flu A の感度は 12.8% と低かった。しかし、咽頭ぬぐい液および鼻汁吸引液では感度は 77.9%、92.1% と高く、特異性においては、100% に近い値であった。インフルエンザ感染者は、うがい液中に $3 \times 10^2 \sim 5 \times 10^3$ pfu/ml、咽頭ぬぐい液中に $5 \times 10 \sim 1.5 \times 10^4$ pfu/ml のウイルス粒子が存在するとされている¹⁰⁾¹¹⁾。今回、Directigen Flu A の検出限界は約 2.4×10^3 pfu/assay との結果が得られた。うがい液は咽頭ぬぐい液に比べて、使用する採取液量が多く、また、小児においては確実に採取すること

が難しい。本邦ではインフルエンザウイルスの検査に鼻汁吸引液等鼻腔から採取した検体を使用することが少ない。しかし、諸外国ではインフルエンザの検査に鼻汁吸引液や鼻腔洗浄液を使用しているところが多く⁶⁾⁹⁾¹²⁾¹³⁾、今回の結果でも Directigen Flu A およびウイルスの分離の両法において鼻汁吸引液が最も高い検出率であった。このことから、Directigen Flu A の検体には、ある程度のウイルス量を確保できる鼻汁吸引液あるいは咽頭ぬぐい液が良いと思われる。これらの検体は、医療従事者が比較的容易かつ直接、患者から採取できるものである。

インフルエンザウイルスの一般的な検査法として、現在のところ細胞培養によるウイルス分離以外に血清検査による診断が用いられている。今回検体の提供を受けた患者のうち、うがい液を採取した集団かぜ児童からはペア血清を採取することができ、HI 試験の結果、Directigen Flu A およびウイルス分離陽性の患者すべてにおいて A 型インフルエンザウイルス (H3N2) に対する抗体の上昇を確認することができた。しかし、医療機関で咽頭ぬぐい液、鼻汁吸引液を採取した患者はおもに外来患者であったため回復期血清の採取はできなかった。今後、検査の再確認のために、ペア血清も同時に採取を行ない、血清学的診断と Directigen Flu A との比較検討を行なっていきたい。

インフルエンザの症状は一般的に発熱、呼吸器・消化器症状を主体とする急性感染症である。しかし、肺炎、心筋炎等の合併症によって重症化することもある¹⁴⁾¹⁵⁾。特に最近ではインフルエンザ流行時に脳炎・脳症が多発し、患者の髄液等からウイルスが分離、また、RT-PCR 法によってウイルス遺伝子が検出される例が数多くみられ、冬期の脳炎・脳症にインフルエンザウイルスが関与していると言う裏付けがなされている¹⁶⁾¹⁷⁾。また、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、重症化する可能性が高い。これらハイリスクグループについてはインフルエンザウイルスに対する予防および早期治療が不可欠である。予防としてワクチンの接種が有効であるが、任意接種となり接種率は低くなって

いる。近年では A 型インフルエンザの治療薬としてアマンタジン、リマンタジンの医療現場での効果も報告され¹⁸⁾¹⁹⁾、さらに新しく抗ノイラミニダーゼ薬の開発もなされており²⁰⁾、インフルエンザの治療の面からも迅速診断の重要性が高まるものと考えられる。

なお、本邦において、冬期には A 型だけでなく B 型インフルエンザウイルスも流行し、近年では両型の混合流行が多く認められる。また、A 型と同様に脳炎・脳症や心筋炎等の重症例から B 型の分離が報告されている²⁾。現在のところ B 型インフルエンザウイルスを特異的に検出する市販キットはなく、今後、B 型インフルエンザウイルスについても簡便かつ迅速に検出できるキットの開発が望まれる。

文 献

- 1) Subbarao K, Klimov A, Katz J *et al.*: Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* 1998; 279: 393-396.
- 2) 国立感染症研究所: 〈特集〉インフルエンザ1996/1997. 病原微生物検出情報 1997; 18: 299-300.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 清水英明, 渡辺寿美, 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.
- 6) Daisy JA, Lief FS, Friedman HW: Rapid diagnosis of influenza A infection by direct immunofluorescence of nasopharyngeal aspirates in adults. *J Clin Microbiol* 1979; 9: 688-692.
- 7) Shalit I, McKee PA, Beauchamp H, Waner JL: Comparison of polyclonal antiserum versus antibodies for the rapid diagnosis of influenza A virus infections by immunofluorescence in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 877-879.
- 8) Harmon MW, Pawlik KM: Enzyme immunoassay for direct detection of influenza type A and adenovirus antigens in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 5-11.
- 9) Sarkkinen HK, Halonen PE, Salmi AA: Detection of influenza A virus by radioimmunoassay and enzyme immunoassay from nasopharyngeal specimens. *J Med Virol*; 7: 213-220.
- 10) 中村和幸, 西沢修一: MDCK 細胞の浮遊培養および浮遊培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離. *感染症誌* 1980; 54: 306-312.
- 11) 中村和幸, 西沢修一: インフルエンザ様患者からのウイルス分離法についての検討—ESK 浮遊培養細胞によるインフルエンザウイルスの分離—. *感染症誌* 1986; 60: 1284-1293.
- 12) Waner JL, Todd SJ, Shalaby H, Murphy P, Wall LV: Comparison of Directigen FLU-A with viral isolation and direct immunofluorescence for the rapid detection and identification of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 479-482.
- 13) Dominguez EA, Taber LH, Couch RB: Comparison of rapid diagnostic techniques for respiratory syncytial and influenza A virus respiratory infections in young children. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2286-2290.
- 14) 武内可尚: インフルエンザの重症合併症. *小児科* 1998; 39: 125-138.
- 15) 永武 毅: インフルエンザ肺炎の病型分類とその臨床—純ウイルス型, 細菌性混合型および二次性細菌感染型—. *日本臨床* 1997; 55: 2687-2692.
- 16) 田中俊光, 北橋智子, 山本多喜子, 他: インフルエンザウイルス A (H3N2) 型が髄液から分離された脳炎の 1 例. *病原微生物検出情報* 1988; 19: 75-76.
- 17) 富樫武弘, 松蔭嘉裕, 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.
- 18) Sugaya N, Kusumoto N, Suzuki Y, Nerome R, Nerome K: Large sequential outbreaks caused by influenza A (H3N2) and B viruses in an institution for the mentally handicapped. *J Med Virol* 1996; 50: 120-125.
- 19) Hall CB, Dolin R, Gala CL *et al.*: Children with influenza A infection: Treatment with Rimantadine. *Pediatr* 1987; 80: 275-282.
- 20) Hayden FG, Osterhaus A, Treanor JJ *et al.*: Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections. *N Engl J Med* 1997; 337: 874-880.

Evaluation of a Rapid Enzyme Immunoassay Membrane Test for
Diagnosis of Influenza A Virus Infection

Hideaki SHIMIZU¹⁾, Sumi WATANABE²⁾, Chiharu KAWAKAMI³⁾, Yoshie HIRAI¹⁾,
Kazuhiro KIMURA⁴⁾, Norio SUGAYA⁵⁾ & Mitsunobu IMAI²⁾

¹⁾Kawasaki City Institute of Public Health

²⁾Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

³⁾Yokohama City Institute of Public Health

⁴⁾Department of Pediatrics, Isehara Kyodo Hospital

⁵⁾Department of Pediatrics, Nippon Kokan Hospital

A rapid enzyme immunoassay membrane test, Directigen Flu A (Becton Dickinson, USA), was evaluated by using virus isolates and clinical specimens. The reference laboratory diagnosis was based on the results of virus isolation.

Directigen Flu A was reactive for all subtypes of human influenza A viruses, including reference strains of H1N1, H2N2 and H3N2. Moreover, H5N1 (Hongkong/156/97) was also detected by this kit. No cross reactivity was detected with other respiratory viruses.

Directigen Flu A showed positive reaction with the solution containing influenza A virus of 2.4×10^3 pfu/assay.

The rapid test demonstrated 77.9% sensitivity and 98.4% specificity for testing of throat swabs from children with respiratory symptoms. It showed higher sensitivity and specificity (92.1% and 100%) for testing of nasopharyngeal aspirates.

Directigen Flu A should be useful for the rapid diagnosis of influenza A virus infection.