

原著

インフルエンザウイルス抗原検出試薬 (ポクテム[®]S インフルエンザ)・RSV 抗原 検出試薬 (ポクテム[®]S RSV) の評価 —検体抽出試薬共通化の有用性の検証—*

浜本芳彦¹⁾ 浅井定三郎²⁾

要旨 2005/06年冬季にインフルエンザウイルス抗原検出試薬およびRSV抗原検出試薬の評価を行い、インフルエンザ疑いで陰性の5.4%からRSVを検出、RSV疑いで陰性の3.5%からインフルエンザウイルスが検出された。評価の対象にしたキットは検体抽出試薬が共通化されており、インフルエンザウイルスとRSVの両方を鑑別する際に、2種類を同時に使用することで、単回の検体採取で済み、患者苦痛の軽減につながるという有用性が確認された。

はじめに

インフルエンザウイルスは冬季に流行するかぜ症候群の重要な起因ウイルスの一つである。インフルエンザにおいて、小児ではインフルエンザ脳症などの重症化が問題となっている。しかし、近年、迅速診断キットが開発され、リアルタイムでインフルエンザウイルスを特定することが可能となって、オセルタミビルなど抗ウイルス薬による治療方針の決定などへの貢献が著しい。

一方、respiratory syncytial virus (RSV) はインフルエンザと同様に、冬季に流行するかぜ症候群の起因ウイルスの一つである。生後3カ月未満の乳児、気管支肺異形成や先天性心疾患などの慢

性心肺疾患を有する小児では重症化する傾向があることが報告されている¹⁻³⁾。

インフルエンザは12~3月にかけて、RSVは10~1月にかけて流行が認められる。乳幼児ではインフルエンザに特徴的な頭痛や筋肉痛、関節痛といった症状を確認することが困難なこと、また、インフルエンザとRSVの流行時期に重複があることから、しばしばインフルエンザとRSVとが判別困難な場合がある⁴⁾。これらの理由から冬季の小児科における診療では、インフルエンザとRSVの鑑別が重要となってくる。

現在、インフルエンザとRSVに対して複数のキットが販売されており、治療方針の決定や予後の予測に大きく貢献している。しかし、症状が典

* The evaluation of rapid influenza antigen detection reagent (POCTEM[®]S Influenza) and RSV antigen detection reagent (POCTEM[®]S RSV)—Verification for ability of commonization of sample extraction reagent between each kit—

Key words : カゼ症候群, インフルエンザ, RSV, 迅速診断

1) 浜本小児科 Yoshihiko Hamamoto

〔〒559-0033 大阪市住之江区南港中2-1-99〕

2) あさいこどもクリニック Sadasaburou Asai

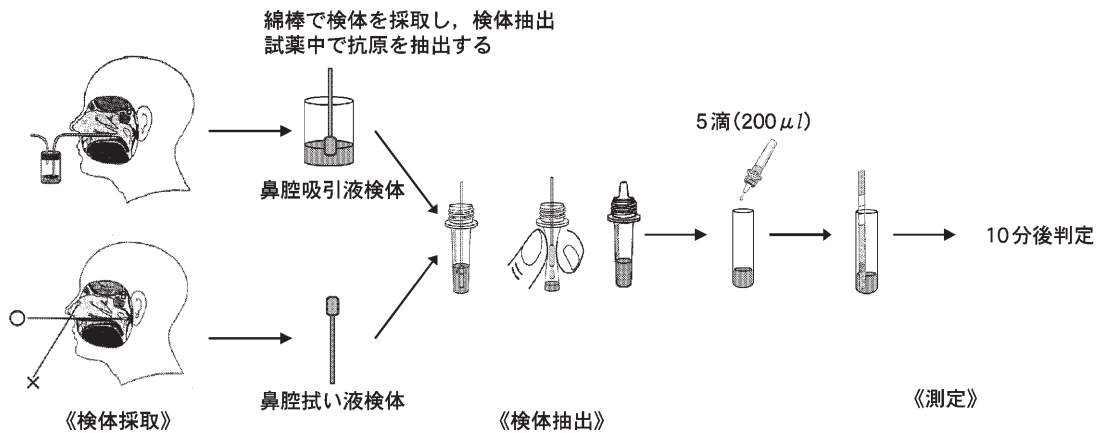


図1 ポクテム[®]S インフルエンザおよびポクテム[®]S RSV 測定方法

型的ではない患者においては、インフルエンザとRSVの両方を測定することが必要な場合があり、その際に2回の検体採取が避けられず、患者に肉体的負担を強いることになる。

今回、測定項目間で共通の検体抽出試薬を用い、10分間で測定可能なインフルエンザ抗原検出試薬(ポクテム[®]S インフルエンザ、以下、ポクテムS インフルエンザ)およびRSV抗原検出試薬(ポクテム[®]S RSV、以下、ポクテムS RSV)(いずれも着色ラテックス粒子を用いたスティックタイプのイムノクロマトグラフィー法の試薬)がシスメックス株式会社において開発された。2005年10月～2006年3月のインフルエンザおよびRSV流行期に大阪市内にある筆者らの施設において、これらの評価キットによって、同じ抽出試料を用いた両抗原の検査が可能であることを検証した。

I. 対象と方法

1. 測定対象

2005年10月～2006年3月の期間に、浜本小児科を受診した患者のうち、インフルエンザが疑われ、最高体温が38.0℃以上で、発症から72時間以内の133名の患者(平均年齢6.7歳, 0.4～22歳)をポクテムS インフルエンザの測定対象とした。また、37.5℃以上の発熱、鼻汁、咳や肺聴診所見の異常などの上・下気道症状などからRSV感染が疑われた102名の患者(平均年齢1.0歳, 0.2～9

歳)をポクテムS RSVの測定対象とした。

2005年10月～2006年1月の期間に、あさいこどもクリニックを受診した患者のうち、同様にRSV感染が疑われた105名の患者(平均年齢1.5歳, 0.2～5歳)をポクテムS RSVの測定対象とした。

2. 検体採取方法

浜本小児科においてはトラップ付き吸引カテテルJX-A08(株式会社ジェイ・エム・エス)を用いて鼻腔吸引液を採取し、これを検体とした。

あさいこどもクリニックにおいては、ポクテムS RSV付属の綿棒を用いて鼻腔拭い液を採取した。なお、BD RSV エグザマン(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)の鼻腔拭い液を採取する際、指定の別売綿棒を用いて採取し、1.2mlの生理食塩水で抽出したものを検体とした。

3. 評価キットおよび対照キット測定方法

ポクテムS インフルエンザはインフルエンザウイルスの核蛋白を型特異的に検出する。ポクテムS RSVはRSVのfusion蛋白を検出する。どちらの評価キットも抗原に特異的な抗体を使用したイムノクロマトグラフィー法を測定原理としており、検体中に抗原が存在する場合、着色ラテックス粒子に感作された抗体と反応しながら固相を移動し、固相に固定された抗体と複合体を形成し、着色ラインが確認される。どちらの評価キットの測定も、綿棒で採取した検体を0.8mlの検体抽出液で抽出した後、図1に示した測定方法に

従って実施した。

ポクテム S インフルエンザの対照として、ポクテム[®] インフルエンザ A/B (シスメックス株式会社、以下、ポクテムインフルエンザ A/B) を使用した。ポクテム S RSV の対照として、BD RSV エグザマン (以下、エグザマン) を使用した。対照キットはそれぞれの添付文書記載の方法で評価キットと同時に測定した (図 1)。

4. RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出

すべての検体に対して A 型インフルエンザ、B 型インフルエンザおよび RSV のリアルタイム RT-PCR 測定を実施し、起因ウイルスを同定した。本試験は、シスメックス株式会社において実施した。

1) RNA 抽出

RT-PCR 法の測定材料として鼻腔吸引液および鼻腔拭い液を用いた。2. で採取した鼻腔吸引液 50 μ l を NALC buffer 450 μ l で希釈し、室温にて 30 分間攪拌混和した後、6,000 rpm にて 15 分間遠心して、得られた上清のうち 200 μ l を EZ 1 BioRobo (株式会社キアゲン) を用いて EZ 1 Virus Mini Kit ver 1.0 (株式会社キアゲン) で抽出し、75 μ l の RNA 溶液を得た。また、2. で生理食塩水で抽出した鼻腔拭い液を同様に 6,000 rpm で 15 分間遠心し、同様に RNA を抽出した。抽出した RNA は -80°C にて凍結保管した。

2) リアルタイム RT-PCR

リアルタイム RT-PCR に用いるプライマーおよびプローブのデザインは、GenBank のデータベースに登録されている各ウイルス株の遺伝子配列の保存された領域に対して設計した。

A 型インフルエンザウイルスに対するプライマーおよびプローブには M 蛋白遺伝子に特異的な配列を用いた (Forward プライマー: 5'-CAT-GGAATGGCTAAAGACAAGACC-3', Reversal プライマー: 5'-ACTGGCAAGTGCACCAG-CA-3', プローブ: 5'-6 FAM-TTGTGTTTCACG-CTCAGCTCACCGTGCCCT-TAMRA-3')。B 型インフルエンザウイルスに対するプライマーおよびプローブには NP 蛋白遺伝子に特異的な配列を用いた (Forward プライマー: 5'-GTGGGACAACCAGACCAATCAT-3', Rever-

sal プライマー: 5'-CACTGCTTGTGGTTGCT-CTTTC-3', プローブ: 5'-6 FAM-CCCCAC-CAAGCAACAAACGAACCCT-TAMRA-3')。RSV に対するプライマーおよびプローブには L 蛋白遺伝子に特異的な配列を用いた (Forward プライマー: 5'-GGTAATACAGCAAAAATC-CAACCAACTT-3', Reversal プライマー: 5'-GCTCCT-TCACCTATGAATGCTATACA-3', プローブ: 5'-6 FAM-CATCACTTTATTG-CATGCTTCCTTGGCATCT-TAMRA-3')。リアルタイム RT-PCR の試薬として One Step RT-PCR Kit (Perfect Read Time) (タカラバイオ株式会社) を用いた。このキットの操作法に従い調製した RT-PCR 反応液 20 μ l と 1) で抽出したテンプレート RNA 5 μ l とを混和した。PCR 装置として ABI Prism 7500 (PE Applied Biosystem) を用い、FAM の蛍光を検出した。

5. 評価キットによる追加測定

キットによる初回測定の対象以外のウイルスが RT-PCR 法により検出された検体に対し、ポクテム S インフルエンザおよびポクテム S RSV の両試薬を用いて、追加測定を実施した。鼻腔吸引液に関しては検体として -80°C で保管した試料を使用した。また、鼻腔拭い液に関しては評価キットの検体抽出試薬で抽出し、いったん -80°C で保管した試料を用いた。本試験は、シスメックス株式会社において実施した。

II. 結 果

1. 評価キット性能評価

1) ポクテム[®] S インフルエンザ

表 1 に示すように、RT-PCR に対するポクテムインフルエンザ A/B とポクテム S インフルエンザの A 型陽性一致率は 85%/85%、A 型陰性一致率は 97%/97%、B 型陽性一致率は 67%/67%、B 型陰性一致率は 100%/100% となった。

2) ポクテム[®] S RSV

表 2 に示すように、RT-PCR に対するエグザマンとポクテム S RSV の陽性一致率は鼻腔吸引液でそれぞれ 74% (49/66)、74% (49/66)、鼻腔拭い液でそれぞれ 89% (49/55)、91% (50/55) となった。陰性一致率は鼻腔吸引液でそれぞれ 92% (33/

表 1 RT-PCR に対する対照試薬とポクテム[®]S インフルエンザとの一致率

	RT-PCR			
	A		B	
	+	-	+	-
ポクテム [®] インフルエンザ A/B	85% (61/72) ^a	97% (59/61) ^b	67% (4/6) ^e	100% (127/127) ^f
ポクテム [®] S インフルエンザ	85% (61/72) ^c	97% (59/61) ^d	67% (4/6) ^g	100% (127/127) ^h

95%信頼区間 a : 77~93%, b : 93~100%, c : 77~93%, d : 93~100%, e : 28~100%, f : 100%, g : 28~100%, h : 100%

表 2 RT-PCR に対する対照試薬とポクテム[®]S RSV との一致率

	RT-PCR			
	鼻腔吸引液		鼻腔拭い液	
	+	-	+	-
BD RSV エグザマン	74% (49/66) ^a	92% (33/36) ^b	89% (49/55) ^e	98% (49/50) ^f
ポクテム [®] S RSV	74% (49/66) ^c	97% (35/36) ^d	91% (50/55) ^g	96% (48/50) ^h

95%信頼区間 a : 64~85%, b : 83~100%, c : 64~85%, d : 92~100%, e : 81~97%, f : 94~100%, g : 83~99%, h : 91~100%

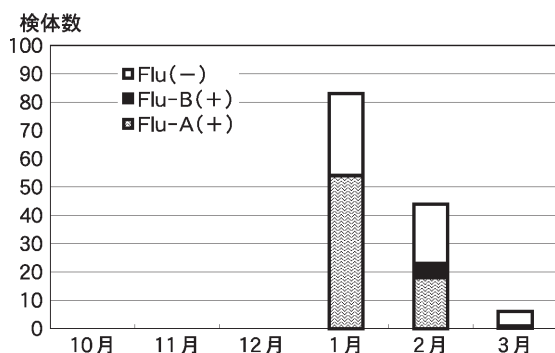


図 2 インフルエンザ疑い検体に対する RT-PCR による月別測定結果

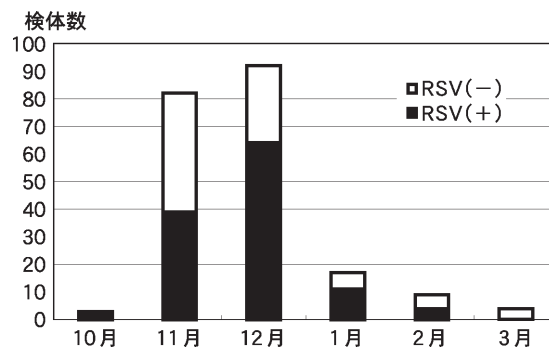


図 3 RSV 疑い検体に対する RT-PCR による月別測定結果

36), 97% (35/36), 鼻腔拭い液でそれぞれ 98% (49/50), 96% (48/50) となった。

2. 流行時期

1) インフルエンザの流行時期

インフルエンザ疑い検体に対して, RT-PCR による測定を実施した結果, 図 2 に示すように 1 月に患者分布のピークが認められた。

2) RSV の流行時期

RSV 疑い検体に対して RT-PCR による測定を実施した結果, 図 3 に示すように 12 月に患者分布のピークが認められた。

3. RT-PCR 法によるウイルス遺伝子の検出

1) インフルエンザ疑い検体からの RSV 遺伝子の検出

インフルエンザ疑い検体において, RT-PCR 法によりインフルエンザ陰性が確認された 55 検体のうち, 表 3-a に示した 5 検体で RSV が確認された (9%)。また, 表 3-c に示すように, インフルエンザと RSV の両方陽性が 3 検体で確認された。

表 3

a インフルエンザ疑い検体のうち、RT-PCR 法によりインフルエンザ陰性で RSV 陽性の検体

検体種	測定日	年齢		インフルエンザ		RSV	
		(年)	(月)	キット	RT-PCR	キット	RT-PCR
1 鼻腔吸引液	2006/1/14	1	0	—	—	+	+
2 鼻腔吸引液	2006/1/17	3	0	—	—	—	+
3 鼻腔吸引液	2006/1/17	1	0	—	—	+	+
4 鼻腔吸引液	2006/1/18	0	10	—	—	+	+
5 鼻腔吸引液	2006/1/21	6	0	—	—	—	+

b RSV 疑い検体のうち、RT-PCR 法により RSV 陰性でインフルエンザウイルス陽性の検体

検体種	測定日	年齢		インフルエンザ		RSV	
		(年)	(月)	キット	RT-PCR	キット	RT-PCR
6 鼻腔吸引液	2005/12/29	1	0	A	A	—	—
7 鼻腔吸引液	2006/1/4	0	9	A	A	—	—
8 鼻腔吸引液	2006/2/13	0	6	A	A	—	—
9 鼻腔拭い液	2005/12/5	3	0	—	A	—	—

c RT-PCR 法によりインフルエンザと RSV の重複感染が確認された検体

検体種	測定日	年齢		インフルエンザ		RSV	
		(年)	(月)	キット	RT-PCR	キット	RT-PCR
10 鼻腔吸引液	2006/1/16	3	0	A	A	—	+
11 鼻腔吸引液	2006/1/16	3	0	A	A	—	+
12 鼻腔吸引液	2006/1/16	3	0	—	A	—	+

2) RSV 疑い検体からのインフルエンザウイルス遺伝子の検出

RSV が疑われた検体において、RT-PCR 法により RSV 陰性が確認された 86 検体のうち、表 3-b に示した 4 検体で A 型インフルエンザウイルスが検出された (5%)。なお、RT-PCR 法により RSV 陽性が確認された検体のうち、インフルエンザ陽性の検体はなかった。

4. 評価キットによる追加測定

1) インフルエンザ疑い検体に対する追加測定

インフルエンザ疑い検体のうち、RT-PCR 法によりインフルエンザ陰性、RSV 陽性となった 5 検体についてポクテム S RSV による測定を実施した結果、表 3-a に示すように、3 検体が陽性であった。

また、表 3-c に示すように、インフルエンザと RSV の重複感染が認められた 3 検体に関しては、いずれの検体においてもポクテム S RSV では陰性であった。

なお、ポクテム S RSV で追加測定する際に、ポクテム S インフルエンザによる再測定を行ったが、初回測定と同じ結果であった。

2) RSV 疑い検体に対する追加測定

RSV 疑い検体のうち、RT-PCR 法により RSV 陰性、A 型インフルエンザ陽性となった 4 検体についてポクテム S インフルエンザによる測定を実施した結果、表 3-b に示すように、3 検体で A 型インフルエンザ陽性であった。

なお、ポクテム S インフルエンザで測定する際に、ポクテム S RSV による再測定を行ったが、初期設定と同じ結果であった (鼻腔吸引液検体のみ試験を実施した) (表 3)。

III. 考 察

今回、評価したポクテム S インフルエンザおよびポクテム S RSV は、医療現場で一定の評価を受けている対照試薬⁵⁾と同等の性能を有していることが確認された。

2005/06 冬季シーズンの筆者らの施設におけるインフルエンザの流行は1月頃からA型インフルエンザが認められ、B型の流行は3月以降であったが、その規模はA型を下回るものであった。同時期の大阪府においても同様の傾向が認められ⁶⁾、今回の検討結果は流行状況をよく反映していることが確認された。また、インフルエンザとRSVの感染時期に関しても、これまで流行時期が重複していることが報告されているが⁹⁾、筆者らの施設においてもインフルエンザおよびRSVの流行期には重複が認められ、従来の知見を裏付ける結果となった。そのような流行の重複期において、インフルエンザとRSVの症状が典型的ではない症例に関しては、判別が困難であることは少なくないと考えられた。

RT-PCR法にてA型インフルエンザとRSVの重複感染症例が3検体確認された。このうち2検体はポクテムS インフルエンザでA型インフルエンザ陽性であった。しかし、重複感染症例の3検体のうちポクテムS RSVにより、RSV陽性となった検体はなかった。その原因として、ポクテムS インフルエンザとポクテムS RSVの感度不足が考えられた。しかし、RT-PCRとの陽性一致率において、それぞれ85%(A型)、82%とこれまでの報告^{7,8)}と同水準であったこと、また、既存試薬との比較において、それぞれ100%(A型)、98%と良好な相関を示したことから、既存試薬と比較して性能上劣るものではないと思われる。

一般に抗原検出迅速診断試薬では、一定のウイルス量があってはじめて陽性反応を判定できる。今回、重複感染例で検出できなかったのは、検出限界以上のウイルス量に達していなかったためであろうが、それがRSV感染症でのウイルス量の問題なのか、それとも重複感染であることが影響しているのかは症例数が少なく特定できなかった。Shinjoらは、インフルエンザウイルスの存在下ではRSVの増殖が阻害されることを報告⁹⁾しており、今回のような重複感染症例において、RSVの増殖が抑制された可能性も考えられる。このような点も含めて、今後、継続して検討していく必要があると考えられる。

今回の検討において、インフルエンザ疑いで、

RT-PCR法によりインフルエンザ陰性の検体のうち、RT-PCR法によりRSV陽性の検体が5例(9%)認められた。これらの検体のうちポクテムS RSVによって3例が陽性でRT-PCRとの陽性一致率は60%であった。また、RSV疑いで、RT-PCR法によりRSV陰性の検体のうち、RT-PCR法によりA型インフルエンザ陽性の検体が4例(5%)認められた。これらの検体のうちポクテムS インフルエンザにより、3例がA型インフルエンザ陽性でRT-PCRとの陽性一致率は75%であった。症状が典型的ではないためにインフルエンザとRSVの鑑別が難しく、両方のキットにより確認する必要がある場合、現在市販されているキットでは、複数回の検体採取をしなければならないことになる。鼻腔検体採取の際には、患者鼻腔内にチューブや綿棒を挿入するため、上記のような場合、小児、特に乳児においては多大な苦痛を与えることとなる。今回、検討したポクテムS インフルエンザおよびポクテムS RSVは検体抽出試薬が共通化されているが、そのための感度および特異度の低下は認められず、既存のキットと同等の性能を有していた。したがって再検査の際に検体採取が不要で、患者苦痛の軽減に貢献することが確認された。

文 献

- 1) Eriksson M, et al : Population-based rates of severe respiratory syncytial virus infection in children with and without risk factors, and outcome in a tertiary care setting. *Acta Paediatr* 91 (5) : 593-598, 2002
- 2) Kaneko M, et al : Risk factors for severe respiratory syncytial virus-associated lower respiratory tract infection in children. *Pediatr Int* 43 (5) : 489-492, 2001
- 3) 浅沼秀臣, et al : 新生児集中治療室 (NICU) における Respiratory Syncytial Virus (RSV) 感染症の流行. *小児科臨床* 51 (7) : 1580-1584, 1998
- 4) Zambon MC, et al : Contribution of influenza and respiratory syncytial virus to community cases of influenza-like illness : an observational study. *Lancet* 358 : 1410-1416, 2001

- 5) 奥野良信, 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「ボクテムインフルエンザ A/B」の評価. 医学と薬学 48 (5): 895-904, 2002
- 6) 大阪府立公衆衛生研究所感染症発生動向調査情報, 2006
- 7) 藤枝俊之: 新しいインフルエンザ迅速検査試薬クイック S-インフル A・B「生研」の評価. 医学と薬学 51 (1): 127-130, 2004
- 8) 黒岩由紀, 他: 免疫クロマト法を用いた RS ウイルス迅速抗原検出キットの検討—multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction 法との比較—. 臨床小児医学 53 (3-4): 71-75, 2005
- 9) Shinjoh M, et al: *In vitro* growth profiles of respiratory syncytial virus in the presence of influenza virus. Acta Virol 44: 91-97, 2002

(受付: 2006 年 9 月 7 日, 受理: 2006 年 11 月 15 日)

* * *