

原著

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 —

武山 彩¹⁾ 橋本 浩一²⁾ 川崎 幸彦²⁾
片寄 雅彦¹⁾ 細矢 光亮²⁾

要旨 下気道炎患者から採取した鼻腔吸引液を検体とし、リアルタイム PCR 法による RS ウイルス検出・定量をスタンダードとして、迅速診断キットの有効性と問題点を検証した。検討したのは 2007 年 11 月に入手可能であった 6 種のキットである。キットの特異度はいずれも良好で偽陽性はみられなかった。感度は 79~32% とキット間で大きな開きがあり、検体中のウイルス量が少ない場合にはいずれのキットにおいても陰性を示した。

はじめに

RS ウイルス感染症は、毎年冬季に流行する呼吸器感染症であり、乳幼児や基礎疾患を有する児においては症状が重篤化することがある^{1,2)}。RS ウイルスの迅速診断は、罹患者の重症化の予測や院内感染対策のうえで大変重要である。ウイルス感染症の診断で最も確実な方法はウイルス分離であるが、細胞培養や分離・同定のための設備と日数を要するため、日常診療における迅速診断には用いられない。リアルタイム PCR 法はウイルス遺伝子を増幅して検出する方法で、ウイルス分離法よりも検出感度が高く^{3,4)}、ウイルス量の定量も可能であるが、迅速性には欠ける。最も簡便に短時間で結果判定が可能であるのが、迅速診断キットを用いたウイルス抗原検出法であるが、そこで問題になるのが迅速診断キットの感度と特異度である。われわれは、リアルタイム PCR 法をスタンダードとし、現在日本国内で各社より発売され

ている迅速診断キットの性能を評価して、RS ウイルス感染症診断における有効性と問題点を検証した。

1. 方法

1. 検体

2007 年 11 月~2008 年 2 月にかけて、公立相馬総合病院に下気道炎にて入院した患児 50 名より鼻咽頭分泌液（鼻腔吸引液）を採取し、これを検体として用いた。鼻腔吸引液は文献 5) の方法に従って調整した。すなわち、分泌液量を秤量し、同重量の NALC バッファー（0.9% NaCl, 10 g/l N-acetyl-L-cystein）を添加して、穏やかに 30 分間震盪した後、3,000 rpm で 10 分間遠心した。上清を 100 μ l ずつ 7 本のマイクロチューブに分注し、使用直前まで 2~6 カ月間 -20°C で保存した。

2. リアルタイム PCR によるウイルス量の定量
調整検体 1 本から QIAamp MiniElute Virus Spin Kit (Quiagen GmbH, Germany) を用いウイルス

Key words : RS ウイルス, 迅速診断, リアルタイム PCR, 感度, 特異度

1) 公立相馬総合病院

[〒976-0011 相馬市新沼字坪ヶ迫 142]

2) 福島県立医科大学小児科

表 1 検討に用いた RS ウイルス迅速診断キット

| 販売メーカー | A 社 | B 社 | C 社 |
|-------------|--|--|--|
| 検出ウイルス | RS ウイルス サブタイプ A, B | RS ウイルス サブタイプ A, B | RS ウイルス サブタイプ A, B |
| 原理 | イムノクロマト法 | イムノクロマト法 | イムノクロマト法 |
| 測定時間 | 15 分 | 15 分 | 15 分 |
| 検体 | 鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 鼻腔洗浄液 | 鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 鼻腔洗浄液 | 鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 鼻腔洗浄液 |
| 社の添付文書による感度 | サブタイプ A 1.38×10^3 TCID ₅₀ /ml~ サブタイプ B 8.71×10^3 TCID ₅₀ /ml~ | サブタイプ A 1.41×10^2 TCID ₅₀ /ml~ サブタイプ B 3.95×10^1 TCID ₅₀ /ml~ | サブタイプ A 5.0×10^3 TCID ₅₀ /ml~ サブタイプ B 4.6×10^2 TCID ₅₀ /ml~ |
| 販売メーカー | D 社 | E 社 | F 社 |
| 検出ウイルス | RS ウイルス サブタイプ A, B | RS ウイルス サブタイプ A, B | RS ウイルス サブタイプ A, B |
| 原理 | イムノクロマト法 | イムノクロマト法 | イムノクロマト法 |
| 測定時間 | 10 分 | 15 分 | 15 分 |
| 検体 | 鼻腔吸引液 鼻腔拭い液 | 鼻腔吸引液 鼻腔または鼻咽頭拭い液 鼻腔洗浄液 | 鼻咽頭拭い液 鼻腔洗浄液 |
| 社の添付文書による感度 | サブタイプ A 6.0×10^4 TCID ₅₀ /ml~ サブタイプ B 6.0×10^4 TCID ₅₀ /ml~ | サブタイプ A 5.2×10^6 TCID ₅₀ /ml~ サブタイプ B 7.6×10^5 TCID ₅₀ /ml~ | |

ス核酸を精製した。PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて C-DNA を作製し、Premix Ex Taq (TaKaRa) を用い TaqMan 法で ABI-7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用して RSV ウイルス遺伝子を増幅した。RSV-A、RSV-B に対するプライマーとプローブは文献 6) を参考に作製した。ウイルスコピー数定量化のための標準曲線は、実験室株 RSV-A2 株 (RSV タイプ A)、および臨床分離株 RSV-B 株 (RSV タイプ B) を HEp-2 細胞に感染させ、TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose 50) を求め、希釈系列に基づき作製した。

3. 抽出試料の調整と RSV 抗原検出

検討に用いた RS ウイルス抗原迅速検出キットは 2007 年 11 月に入手が可能であった以下の 6 種類のキットである。RSV エグザマン (日本ベクトン・デッキンソン)、クイックチェイサー RSV (ミズホメディイ)、ポクテム S-RSV (シスメック

ス)、チェック RSV (アルフレッサファーマ)、イムノカード ST-RSV (テイエフビー)、BinaxNow RSV キット (栄研化学)。これらの 6 メーカーの商品名を順不同で A, B, C, D, E, F 社の商品とした (表 1)。キットごとに調整検体 1 本 (100 μ l) を用意して、各キットのプロトコールに従って試料を作製し、RS ウイルス抗原検出を試みた。

1) RSV エグザマン

調整検体 (100 μ l) に生理食塩水 150 μ l を加える。全量 (250 μ l) を抽出試薬と混合して抽出試料とし、RS ウイルス抗原を検出する。

2) クイックチェイサー RSV, ポクテム S-RSV, チェック RSV

キット付属の滅菌綿棒を調整検体 (100 μ l) に浸し、検体抽出試薬試験管でよく攪拌して抽出試料とし、RS ウイルス抗原を検出する。

3) イムノカード ST-RSV

キット付属の滅菌綿棒を調整検体 (100 μ l) に

浸し、希釈液 8 滴の入った試験管でよく攪拌して抽出試料とし、RS ウイルス抗原を検出する。

4) BinaxNOW RSV テスト

キット付属の滅菌スポンジ棒を調整検体 (100 μ l) に浸し、検体抽出試薬試験管でよく攪拌して抽出試料とし、RS ウイルス抗原を検出する。

II. 結 果

下気道炎を呈して入院した患児 50 例のリアルタイム PCR では陰性が 16 例、陽性が 34 例であった。RSV-A 単独陽性が 30 例、RSV-B 単独陽性が 1 例、RSV-A、RSV-B とともに陽性が 3 例であった。PCR の結果と迅速診断の結果を比較して、各キットの感度、特異度を求めた。

1. 各キットの感度と特異度の検討 (表 2, 3)

PCR 結果に対してのキットの感度は 32~79%、特異度は各キットとも 100%であった。

表 2 各キットの迅速診断結果および PCR の結果

| | A 社 | | | B 社 | | | C 社 | | |
|--------|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|
| | 診断キット | | | 診断キット | | | 診断キット | | |
| | 陽性 | 陰性 | 計 | 陽性 | 陰性 | 計 | 陽性 | 陰性 | 計 |
| PCR 陽性 | 27 | 7 | 34 | 26 | 8 | 34 | 25 | 9 | 34 |
| PCR 陰性 | 0 | 16 | 16 | 0 | 16 | 16 | 0 | 16 | 16 |
| 計 | 27 | 23 | 50 | 26 | 24 | 50 | 25 | 25 | 50 |

| | D 社 | | | E 社 | | | F 社 | | |
|--------|-------|----|----|-------|----|----|-------|----|----|
| | 診断キット | | | 診断キット | | | 診断キット | | |
| | 陽性 | 陰性 | 計 | 陽性 | 陰性 | 計 | 陽性 | 陰性 | 計 |
| PCR 陽性 | 21 | 13 | 34 | 13 | 21 | 34 | 11 | 23 | 34 |
| PCR 陰性 | 0 | 16 | 16 | 0 | 16 | 16 | 0 | 16 | 16 |
| 計 | 21 | 29 | 50 | 13 | 37 | 50 | 11 | 39 | 50 |

表 3 検出感度・特異度および検体中のウイルス量の比較

| | A 社 | B 社 | C 社 | D 社 | E 社 | F 社 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 感度 | 79% | 76% | 73% | 62% | 40% | 32% |
| 特異度 | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% | 100% |
| 陽性検体 ウイルス量* | 5.07 \pm 1.51 | 5.12 \pm 1.54 | 5.21 \pm 1.51 | 5.48 \pm 1.44 | 5.97 \pm 1.43 | 5.75 \pm 1.41 |
| 陰性検体 ウイルス量* | 2.91 \pm 0.13 | 3.01 \pm 2.88 | 3.01 \pm 0.27 | 3.27 \pm 0.76 | 3.84 \pm 1.17 | 4.04 \pm 1.44 |

*ウイルス量 (指数表示) (平均 \pm 標準偏差 TCID₅₀/ml)

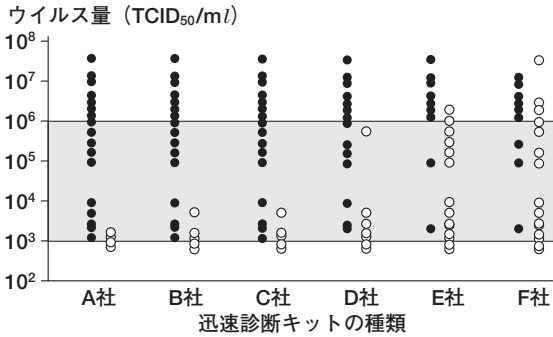
2. ウイルス量と各キットの結果との比較 (表 3, 図)

RSV 陽性検体のウイルス量は 10^{2.76}~10^{7.51} TCID₅₀/ml であったが、それらウイルス量と各キットの陽性・陰性との関係を調べた。

A 社の陽性検体ウイルス量 (平均 \pm 標準偏差) は 10^{5.07 \pm 1.51} TCID₅₀/ml、陰性検体ウイルス量は 10^{2.91 \pm 0.13} TCID₅₀/ml、B 社では陽性 10^{5.12 \pm 1.54} TCID₅₀/ml、陰性 10^{3.01 \pm 0.28} TCID₅₀/ml、C 社は陽性 10^{5.21 \pm 1.51} TCID₅₀/ml、陰性 10^{3.01 \pm 0.27} TCID₅₀/ml、D 社は陽性 10^{5.48 \pm 1.44} TCID₅₀/ml、陰性 10^{3.27 \pm 0.28} TCID₅₀/ml、E 社は陽性 10^{5.97 \pm 1.43} TCID₅₀/ml、陰性 10^{3.84 \pm 1.17} TCID₅₀/ml、F 社は陽性 10^{5.75 \pm 1.41} TCID₅₀/ml、陰性 10^{4.04 \pm 1.44} TCID₅₀/ml であった。鼻汁中の感染性ウイルス量は 10³~10⁶ TCID₅₀/ml とされる⁷⁾が、D、E、F 社のキットでは、10³ TCID₅₀/ml 付近のウイルス量でも陰性を示す検体があった。さらに F 社のキットはリアルタイム PCR にて RSV-B と同定された臨床検体において、4 検体中 2 検体で陰性であった。E 社のキットでは同様の 4 検体中 1 検体で陰性であった。この陰性を示した検体 2 検体のウイルス量はともにリアルタイム PCR では 10⁵ TCID₅₀/ml レベルであった。

III. 考 察

ウイルス感染症の診断には、ウイルス分離、ウイルス抗原検出、ウイルス遺伝子検出、ウイルス抗体価測定がある。ウイルス分離が最も確実な方法であるが、検体の凍結融解や室温保存などにより分離率は急激に低下する⁸⁾。また細胞培養や分離・同定のための設備を必要とし、結果を得るために数日~数週間を要するため、日常診療におけ



□ 通常鼻汁に含まれるウイルス量
● 迅速診断陽性 ○ 迅速診断陰性
図 鼻汁中の感染性ウイルス量と迅速診断検査成績との比較

る一般的な診断には用いられない。PCR法によるウイルス遺伝子検出法は迅速性があり、感度・特異度が高く、凍結保存検体でも検出率が低下しない。また遺伝子系統解析により、ウイルスの伝播などの解析が可能である⁸⁾。しかし設備を必要とし、手技がやや煩雑で費用がかかり、日常検査には適さない。血清学的診断は、RSウイルスでは気道感染(局所感染)が主であるため、全身感染をきたすウイルスに比較すると血清抗体反応は弱い⁸⁾。そのため抗体の上昇がない場合に感染がなかったとはいえない。また急性期と回復期で抗体価を比較するため、診断が回顧的になる。最も簡便に短時間で結果判定が可能であるのは、迅速診断キットを用いたウイルス抗原検出法である。検体の採取部位は、咽頭よりも上咽頭(後鼻腔)がよく、鼻咽頭分泌液を吸引して用いるのが最もよい⁹⁾。鼻汁中には $10^3 \sim 10^6$ TCID₅₀/mlのウイルスが存在し、この量は迅速診断キットの添付文書に記載されている検出感度($10^3 \sim 10^4$ TCID₅₀/ml)と同程度かそれより多い。ウイルス分離法を基準にした場合、迅速診断キットの感度・特異度は概ね良好で、感度は90%以上、特異度は90%以上とされている¹⁰⁾。

今回われわれは、定量PCR法をスタンダードとし、6種の迅速診断キットの性能評価を行った。迅速診断キットの特異度はいずれも良好であり、用いているモノクローナル抗体の特異性は高いと考えられる。一方、感度は各迅速診断キット間で

差がみられた。検出感度に大きな影響を与えた要因としては、各キットで用いられているモノクローナル抗体の感度の良否が考えられる。現在の抗原検出キットの感度からすると、迅速診断陰性はRSウイルス感染を否定するものではない。しかし特異度は高く、迅速診断陽性は、RSウイルス感染と診断してよいと思われる。

本研究では細胞培養液と鼻汁培養液で、ウイルスコピー数当たりの生きているウイルス数の割合が同等と仮定して、鼻汁中のウイルス量(TCID₅₀)を算出した。今回の結果が通常鼻汁に含まれるとされるウイルス量より高い検体が存在したのは、その検体においては、ウイルスコピー数当たりの生ウイルス数の割合が、細胞培養液よりもかなり低くなっている可能性があり、その影響が考えられる。一方で、気道分泌液中には気道上皮が剥離して混入しているため、その混入の程度によりウイルス量が多くなったことも推測される。

RSウイルスはほとんどの小児が2歳までに感染し、その後も再感染を繰り返して、すべての年齢層に感染者が分布する^{8,11)}。飛沫感染する他、排泄された喀痰や鼻汁中にも多量に存在し、手指や器物を介して接触感染によっても伝播する。RSウイルスは施設内感染の病原体としても注意すべきウイルスである¹²⁾。成人は軽度の上気道炎症症状のみであり、RSウイルスに罹患しながら自覚のない医療従事者を介して病棟内を伝播することも多い。RSウイルス感染児の隔離と感染児に接する家族や医療従事者の十分な手洗いが必要である。RSウイルス迅速診断キットの感度と特異度は、罹患者の重症化の予測や治療方針の決定の他に、院内感染対策上も重要であるといえる。

おわりに

われわれは鼻咽頭分泌液を用いて、RSV迅速診断キットの有用性をPCR法と比較して評価し、問題点を検証した。適切な方法で検体を採取し、感度の良好なキットを使用した場合には、迅速診断キットによる抗原検出法は、RSウイルス感染症の診断において非常に有用な手段であると思われる。メーカー各社には、感度のさらなる向上を期待するとともに、日常診療において重要な診断

キットであることを認識して、特異度の低い不良製品が出荷されることがないように、十分な精度管理を要望したい。

謝辞：検体の分析にご尽力いただいた福島県立医科大学小児科 藁谷朋子先生に深謝いたします。

文 献

- 1) 川崎幸彦, 他: RS ウイルス初感染下部気道感染症 254 症例の疫学的臨床的検討. 日児誌 103: 1222-1226, 1999
- 2) 川崎幸彦, 他: RS ウイルス再感染罹患時の臨床像に関する検討. 日児誌 106: 482-485, 2002
- 3) Liao RS, et al: Comparison of viral isolation and multiplex real-time reverse transcription-PCR for confirmation of respiratory syncytial virus and influenza virus detection by antigen immunoassays. J Clin Microbiol 47: 527-532, 2009
- 4) Falsey A, et al: Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: Comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. J Clin Microbiol 40: 817-820, 2002
- 5) Drosten C, et al: Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. N Engl J Med 348: 1967-1976, 2003
- 6) Hu A, et al: Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. J Clin Microbiol 41: 149-154, 2003
- 7) Hall CB, et al: Respiratory syncytial virus infection in infants: quantitation and duration of shedding. J Pediatr 89: 11-15, 1976
- 8) 堤 裕幸: RS ウイルス. 小児感染症マニュアル 2003-2004 (日本小児感染症学会編). 東京医学社, 東京, 2003, 243-253
- 9) Heikkinen T, et al: Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. J Clin Microbiol 40: 4337-4339, 2002
- 10) Swierkosz EM, et al: Evaluation of the Abbott TESTPACK RSV Enzyme Immunoassay for detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal swab specimens. J Clin Microbiol 27: 1151-1154, 1989
- 11) 河合直樹, 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 82: 1-5, 2008
- 12) 浅沼秀臣, 他: 新生児集中治療室 (NICU) における RSV 感染症の流行. 小児臨 51: 1580-1584, 1998

Usefulness and problems of rapid antigen test for respiratory syncytial virus detection

Aya TAKEYAMA¹⁾, Koichi HASHIMOTO²⁾, Yukihiro KAWASAKI²⁾,
Masahiko KATAYOSE¹⁾, Mitsuaki HOSOYA²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Soma General Hospital

²⁾Department of Pediatrics, Fukushima Medical University

At present, the rapid respiratory syncytial virus (RSV) antigen detection kit is common and easily controlled in clinical use. In this study we demonstrated the effectiveness and problems of the rapid RSV antigen detection kits. We compared the specificity and sensitivity of six test kits available in Japan using a real-time polymerase chain reaction (PCR). Nasopharyngeal aspiration samples were obtained from children with lower respiratory tract infections caused by RSV who were hospitalized in Soma General Hospital using both rapid RSV antigen detection tests and a real-time PCR.

Based on the results of real-time PCR, all of the kits had high specificity and few false positive. However, kit sensitivities varied from 32% to 79%. Negative results were obtained from all rapid tests in nasopharyngeal samples containing lower viral loads. It should be considered that the false negatives are attributable to the binding affinity of the monoclonal anti-

body to the antigen.

Rapid RSV antigen detection kits contribute to controlling RSV infection by using a sample containing sufficient viral load and a kit with high sensitivity and specificity.

(受付：2010年4月6日，受理：2010年7月9日)

* * *