

イムノクロマトグラフィー法によるインフルエンザ 迅速診断キットの臨床的検討

¹⁾秦野赤十字病院小児科, ²⁾日本鋼管病院小児科, ³⁾伊勢原協同病院小児科,
⁴⁾伊勢原協同病院細菌検査室, ⁵⁾神奈川県衛生研究所, ⁶⁾川崎市衛生研究所

山崎 雅彦¹⁾ 三田村敬子²⁾ 木村 和弘³⁾ 荻澤 真理²⁾ 込山 修³⁾
市川 正孝³⁾ 山本 敬一³⁾ 染谷 研一¹⁾ 中野 孝子¹⁾ 橋本 洋子⁴⁾
萩原 紀子⁴⁾ 前澤 民子⁴⁾ 渡邊 寿美⁵⁾ 清水 英明⁶⁾ 菅谷 憲夫²⁾

(平成 13 年 10 月 15 日受付)

(平成 13 年 11 月 6 日受理)

Key words : Influenza, rapid diagnosis, immunochromatography

要 旨

A 型と B 型のインフルエンザウイルスが検出可能な, イムノクロマトグラフィー法による迅速診断キット, QuickVue Influenza Test (QUIDEL, USA) について検討した。対象は, 2001 年 1 月から 3 月のインフルエンザ様疾患の患者で, 鼻腔吸引液 184 検体, 鼻腔ぬぐい液 140 検体, 咽頭ぬぐい液 101 検体を採取した。ウイルス分離陽性 204 検体中, QuickVue 陽性は 179 検体, ウイルス分離陰性 221 検体中 QuickVue 陰性は 203 検体で, ウイルス分離との比較で, 本キットの感度は 87.7%, 特異度は 91.9% となった。検体毎の感度は, 鼻腔吸引液で 92.6%, 鼻腔スワブで 83.7%, 咽頭ぬぐい液で 76.5% と, これまでの酵素免疫法による迅速診断キットによる結果と同様な傾向を示した。本キットとインフルエンザ OIA との比較では, 陽性と陰性の判定は 84.2% が一致し, 全体では同等の感度, 特異度であった。大きな特徴は簡便性に優れている点であった。A 型と B 型の型別はできないが, 2つのウイルスを同時に検出できることから, 外来治療におけるノイラミニダーゼ阻害剤の投与に際しての補助診断として有用である。

[感染症誌 75: 1047~1053, 2001]

序 文

インフルエンザの診断と治療は, ここ数年で大きな変貌を遂げている。1999 年に A 型インフルエンザに対する迅速診断キット¹⁾²⁾が発売され, 次いで A, B 型インフルエンザウイルス検出キット^{3)~6)}も発売された。現在では 4 種類のキットが発売されており, 外来での迅速診断も広く行われるようになっている。治療では, 1998 年に A 型イン

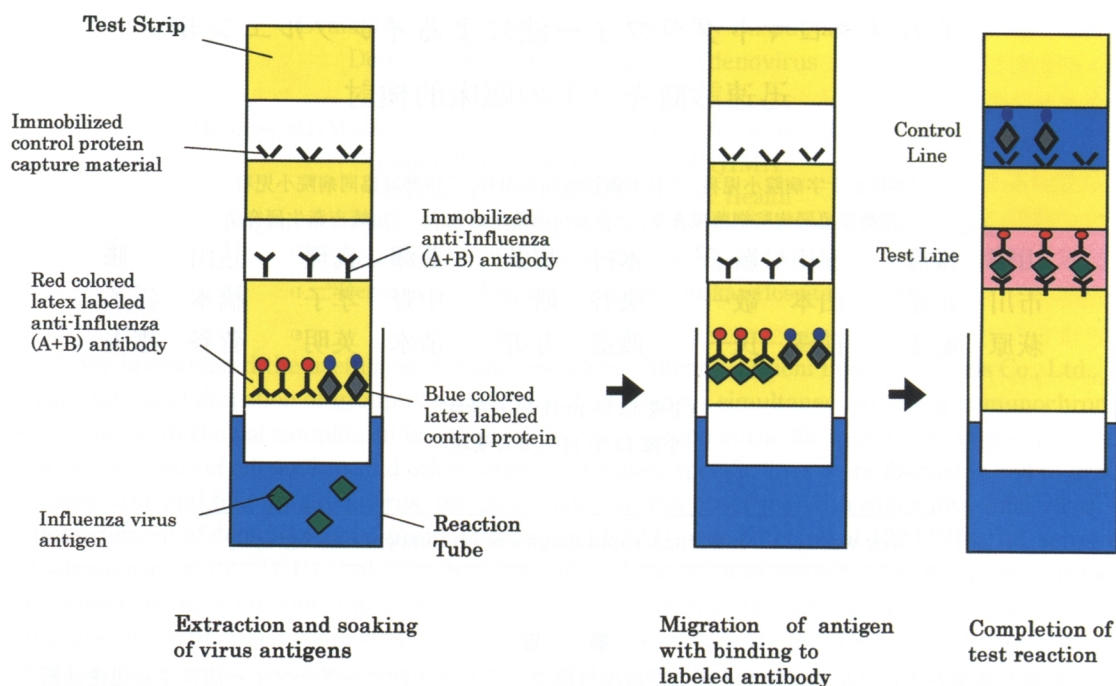
フルエンザに対するアマンタジンの適応も認められ, 2001 年からはノイラミニダーゼ阻害剤であるザナミビル, オセルタミビルの発売により, A 型, B 型インフルエンザに対する治療が可能となった。このような状況のなかで, 2つのタイプのインフルエンザウイルスが検出可能な迅速診断の必要性, 重要性は従来にも増して高まっているといえる。

今回, イムノクロマトグラフィー法を用い, A 型と B 型のインフルエンザウイルスを検出する

別刷請求先: (〒257-0045) 神奈川県秦野市桜町 1-4-5
秦野赤十字病院小児科 山崎 雅彦

平成13年12月20日

Fig. 1 Principle of QuickVue Influenza test



迅速診断キット QuickVue Influenza Test (Quidel Corp. USA: 以下 QV) を, 2000/2001 のインフルエンザシーズンに使用し, ウイルス分離, nested RT-PCR, 他のインフルエンザウイルス迅速診断キットとの比較検討を行った。

材料と方法

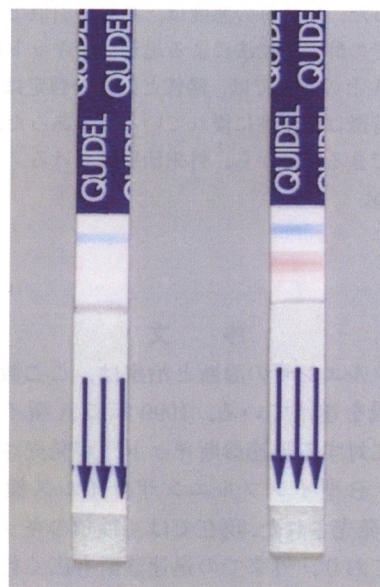
<対象>

2001 年 1 月から 3 月の間に, 秦野赤十字病院, 日本鋼管病院の小児科, 伊勢原協同病院の小児科および内科を, インフルエンザ様症状で受診した外来および入院患者から, 鼻咽頭吸引液 184 検体, 鼻腔ぬぐい液 140 検体, 咽頭ぬぐい液 101 検体の計 425 検体を採取した。

<材料と方法>

比較検査として, ウイルス分離と Optical immunoassay による, A 型と B 型インフルエンザウイルスが検出可能な迅速診断キット, インフルエンザ OIA (第一化学薬品: 以下 OIA) を行った。迅速診断キット陽性, ウイルス分離陰性の検体については, nested RT-PCR による確認を行った。

Fig. 2 Negative and positive results of QuickVue Influenza test



Left : negative Right : positive

鼻咽頭吸引液は、これまでの報告と同様の方法⁷⁾で採取した。OIA 用検体を綿棒にとり、残りを 2～4ml のウイルス輸送培地 (0.5% ゼラチン加リン酸緩衝液) で溶解した。この内 0.3ml を QV に使用し、残りをウイルス分離および PCR 用として凍結保存した。鼻腔ぬぐい液は、金属製のフレキシブルなシャフトのレーヨン綿棒を用いて、鼻腔粘膜を十分に擦過して 3 本採取し、2 本を迅速診断用とした。もう 1 本のスワブは、2ml の輸送培地中で十分に攪拌して、ウイルス分離用検体として凍結した。咽頭ぬぐい液も、同じ綿棒を用いて咽頭粘膜を十分に擦過して 3 本採取し、2 本を迅速診断用とした。もう 1 本のスワブは、鼻腔ぬぐい液と同様にウイルス分離用検体として処理した。

ウイルス分離は、 -70°C に凍結した検体を解凍して、MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞あるいは CaCo2 細胞を用い、細胞変性効果を確認し、特異抗血清により同定した。Nested RT-PCR は、プライマーをインフルエンザウイルス HA (Hemagglutinin) 遺伝子に設定して行った。

<QuickVue Influenza Test>

QuickVue Influenza Test は、A 型および B 型インフルエンザウイルスの核蛋白に対するマウスモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィ法による、インフルエンザ迅速診断キットである。

反応試薬チューブで反応試薬溶解液 (生理食塩水) により処理された検体は、毛細管現象によりテストストリップ内を上部に移動するが、A 型あるいは B 型インフルエンザウイルス抗原がある場合には、着色粒子結合抗インフルエンザウイルス抗体に捕捉されて複合体を形成し、さらに、抗インフルエンザウイルス抗体が含まれる判定ラインの部分で再度捕捉され、免疫複合体を形成して着色がみられる。その上部にはコントロール蛋白に対する抗体が含まれる部分があり、そこでコントロール蛋白が捕捉されて複合体を形成し、コントロールラインの着色がみられる (Fig. 1)。

キットは専用の綿棒、反応試薬チューブ、反応試薬溶解液、スポイト、テストストリップで構成されている。

操作は、はじめに反応試薬溶解液を反応試薬チューブに入れ、この中に、採取した検体を加え、検体がスワブの場合は壁面、底面などに押し付けて 3 回以上回転させて抽出した。検体が鼻腔吸引液の場合は、希釈した検体を添付のスポイトを用いて一定量吸引し、反応試薬チューブに加えて攪拌した。次に、テストストリップを矢印の方向が下になるように反応試薬チューブに入れ、10 分間静置した。

10 分後にテストストリップの目視判定を行い、コントロールラインのみ認める場合を陰性とし、コントロールラインと判定ラインの両方が認められる場合を陽性とした (Fig. 2)。

成 績

迅速診断キットで判定した 425 検体について検討を行った。ウイルス分離陽性は 204 検体で、A ソ連型 91 株、A 香港型 20 株、B 型 93 株であった。ウイルス分離陰性は 221 検体で、この内迅速診断陽性の検体から、PCR により A ソ連型 2 株、A 香港型 2 株、B 型 7 株が検出された。

全検体の QV による判定結果をウイルス分離と比較すると、感度 87.7% (179/204)、特異度 91.9% (203/221) であった (Table 1)。PCR の結果で補正すると感度は 87.4% (188/215)、特異度 95.7% (201/210) となった。A 型、B 型それぞれの感度は、A 型が 83.8% (93/111)、B 型が 92.5% (86/93)、A 型の亜型別では、A ソ連型と A 香港型の感度は 83.5% (76/91) と 85.0% (17/20) で、それぞれの感度に有意差は認められなかった。検体別の感度、特異度は、鼻腔吸引液で 92.6% (112/121)、88.9% (56/63) (Table 2)、鼻腔ぬぐい液で 83.7% (41/49)、92.3% (84/91) (Table 3)、咽頭ぬぐい液で 76.5% (26/34)、94.0% (63/67) (Table 4) であった。

同じ検体の OIA による判定結果をウイルス分離と比較すると、感度 81.9% (167/204)、特異度 86.0% (190/221) で (Table 1)、PCR の結果で補正すると、感度は 81.4% (175/215)、特異度は 89.0% (187/210) となった。

両キットの陽性と陰性の判定は 84.2% (358/425) が一致した。両キットの成績を比較すると、

Table 1 Comparison of two influenza rapid detection tests and isolation of influenza A and B viruses in all specimens

		Culture				Quick Vue	Flu OIA
		A (+)	B (+)	(-)	Sensitivity	87.7%	81.9%
Quick Vue	(+)	93	86	18	(95%CI)	(83.2—92.2%)	(76.6—87.2%)
	(-)	18	7	203	Specificity	91.9%	86.0%
Flu OIA	(+)	92	75	31	(95%CI)	(88.2—95.5%)	(81.4—90.6%)
	(-)	19	18	190	PPV	90.9%	84.3%
PPV : Positive predictive value					(95%CI)	(86.8—94.9%)	(79.3—89.4%)
NPV : Negative predictive value					NPV	89.0%	83.7%
CI : Confidence interval					(95%CI)	(85.0—93.1%)	(78.9—88.5%)
					Efficiency	89.9%	84.0%
					(95%CI)	(87.0—92.7%)	(80.5—87.5%)

Table 2 Comparison of two influenza rapid detection tests and isolation of influenza A and B viruses in nasal aspirates

		Culture				Quick Vue	Flu OIA
		A (+)	B (+)	(-)	Sensitivity	92.6%	86.8%
Quick Vue	(+)	60	52	7	(95%CI)	(87.9—97.2%)	(80.7—92.8%)
	(-)	7	2	56	Specificity	88.9%	87.3%
Flu OIA	(+)	57	48	8	(95%CI)	(81.1—96.6%)	(79.1—95.5%)
	(-)	10	6	55	PPV	94.1%	92.9%
PPV : Positive predictive value					(95%CI)	(89.9—98.3%)	(88.2—97.6%)
NPV : Negative predictive value					NPV	86.2%	77.5%
CI : Confidence interval					(95%CI)	(77.8—94.6%)	(67.7—87.2%)
					Efficiency	91.3%	87.0%
					(95%CI)	(87.2—95.4%)	(82.1—91.8%)

Table 3 Comparison of two influenza rapid detection tests and isolation of influenza A and B viruses in nasal swabs

		Culture				Quick Vue	Flu OIA
		A (+)	B (+)	(-)	Sensitivity	83.7%	79.6%
Quick Vue	(+)	21	20	7	(95%CI)	(73.3—94.0%)	(68.3—90.9%)
	(-)	4	4	84	Specificity	92.3%	87.9%
Flu OIA	(+)	21	18	11	(95%CI)	(86.8—97.8%)	(81.2—94.6%)
	(-)	4	6	80	PPV	85.4%	78.0%
PPV : Positive predictive value					(95%CI)	(75.4—95.4%)	(66.5—89.5%)
NPV : Negative predictive value					NPV	91.3%	88.9%
CI : Confidence interval					(95%CI)	(85.5—97.1%)	(82.4—95.4%)
					Efficiency	89.3%	85.0%
					(95%CI)	(84.2—94.4%)	(79.1—90.9%)

咽頭ぬぐい液での B 型の感度 ($p=0.031$), 特異度 ($p=0.033$), 一致率 ($p=0.041$) についてのみ有意差が認められ, いずれも QV が高値であった。

考 察

今回の検討を行った 2000/2001 シーズンは, A

香港型, A ソ連型, B 型が混在して流行したが, 1998/1999 シーズンにも前半は A 香港型, 後半は B 型が混合流行したように, 我が国でのインフルエンザの流行は B 型インフルエンザが定期的に流行する傾向がみられている¹²⁾. 小児では, B 型

Table 4 Comparison of two influenza rapid detection tests and isolation of influenza A and B viruses in throat swabs

		Culture				Quick Vue	Flu OIA
		A (+)	B (+)	(-)			
Quick Vue	(+)	12	14	4	Sensitivity	76.5%	67.6%
	(-)	7	1	63	(95%CI)	(62.2—90.7%)	(51.9—83.4%)
Flu OIA	(+)	14	9	12	Specificity	94.0%	82.1%
	(-)	5	6	55	(95%CI)	(88.4—99.7%)	(72.9—91.3%)
PPV : Positive predictive value					PPV	86.7%	65.7%
NPV : Negative predictive value					(95%CI)	(74.5—98.8%)	(50.0—81.4%)
CI : Confidence interval					NPV	88.7%	83.3%
					(95%CI)	(81.4—96.1%)	(74.3—92.3%)
					Efficiency	88.1%	77.2%
					(95%CI)	(81.8—94.4%)	(69.0—85.4%)

インフルエンザも A 香港型インフルエンザと同様に重要で、入院となることも少なくないため⁸⁾⁹⁾、A 型と B 型両方のインフルエンザが検出できる迅速検出キットの有用性が高いことは、これまでのインフルエンザ迅速検出キットの使用経験^{3)~7)}からも明らかであった。QV の A 型、B 型の感度に有意差は見られず ($p=0.059$)、流行期を通して一定の検査精度が期待できるものと思われる。

QV と OIA との比較では、鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液での感度、特異度、陽性反応の中率、陰性反応の中率、一致率は、いずれも両者の間に有意差はみられなかった。咽頭ぬぐい液のみ、QV での B 型に対する感度、特異度、一致率が高く、有意差を認めたが、咽頭ぬぐい液の検体数が少なく、それぞれを別の綿棒で検査しているため、検体が同一ではないことも影響している可能性があり、検体数を増やして再度検討が必要である。

QV、OIA とともに鼻腔吸引液での感度が最も高く、咽頭ぬぐい液での感度は低い結果となり、酵素免疫法での結果と同様の傾向を示した^{1)~5)7)}。

これまでの成人におけるインフルエンザウイルス迅速診断の報告では、咽頭ぬぐい液が用いられている¹⁰⁾。今回の検討では、16 歳以上の内科患者の鼻腔吸引液 29 検体と、鼻腔ぬぐい液 5 検体が含まれていたが、鼻腔吸引液と鼻腔ぬぐい液を併せての感度は、小児 (16 歳未満) で 88.6% (124/140) に比べて、16 歳以上では 90.0% (27/30) となり、成人でも高い感度が示された。咽頭ぬぐい液での

感度 (76.5%) と比べても高く、成人でも鼻腔吸引液あるいは、鼻腔ぬぐい液を検体に用いることによって、より検出率が高くなる可能性が示唆された。

現在国内では、一般臨床向けのインフルエンザ迅速診断キットとして、A 型インフルエンザに対するディレクティジェン Flu A (日本ベクトン・ディッキンソン)、インフル A—クイック「生研」(デンカ生研)の 2 種類と、A 型、B 型を同時にまとめて検出するインフルエンザ OIA (第一化学薬品)、ジースタットフルー A & B (ニチレイ)の計 4 種類が市販されている。これらのキットの結果判定に要する時間は 10 分から 30 分で、数種類の反応試薬を一定の時間で加えるなどの手間がかかるものもあり、診療中に外来で検査を行うにはやや難しい場合もある。QV では、早いものでは 1 分程度で陽性反応がみられ、遅くとも 10 分で最終判定が可能である。判定の際に、テストストリップ上の判定ラインの着色が淡いために、判定に迷う例が数例みられたが、ほとんどの検体では着色は良好で判定は容易であった。操作手技全般での簡便性は、これまでのキットに比べて非常に優れており、外来診療における検査も可能なキットといえる。

わが国でも、老人に対するインフルエンザワクチン接種の補助化などの動きがあり、ハイリスク者に対する予防対策が進んでいるが、ノイラミダーゼ阻害剤の出現により、今後はインフルエンザを積極的な治療の対象としてとらえるようにな

ると考えられる。インフルエンザの治療については、既に A 型インフルエンザに対する適応が認可されているアマンタジンに加え、成人では A 型、B 型両方のインフルエンザに有効なノイラミニダーゼ阻害剤が 2 種類発売されており、QV はノイラミニダーゼ阻害剤の投与適応を決定する際には特に有用である。迅速検査を医師自身が行わなければならないような医療環境であっても、検査の簡便性から臨床での使用は容易であり、適正な抗インフルエンザ薬の投与が可能になるものと思われる。また、小児用のノイラミニダーゼ阻害剤¹¹⁾も近く認可される見通しであり、将来的には小児におけるインフルエンザ迅速診断キットとしても有用性が期待される。

文 献

- 1) 三田村敬子, 菅谷憲夫, 荏澤真理, 高橋浩治, 清水英明, 平位芳江: 小児科入院患者から見た A 香港型インフルエンザの流行と迅速診断. 感染症誌 1998; 72: 883—9.
- 2) 清水英明, 渡邊寿美, 川上千春, 平位芳江, 木村和弘, 菅谷憲夫, 他: 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. 感染症誌 1998; 72: 827—33.
- 3) 山崎雅彦, 木村和弘, 渡邊寿美, 込山 修, 御宿百合子, 山本敬一, 他: 鼻咽頭吸引液を検体とした Optical Immunoassay 法によるインフルエンザ迅速診断. 感染症誌 1999; 73: 1064—8.
- 4) 三田村敬子, 菅谷憲夫, 清水英明, 荏澤真理, 高橋浩治, 平位芳江, 他: Optical Immunoassay による A, B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの臨床的検討. 感染症誌 1999; 73: 1069—73.
- 5) 渡邊寿美, 清水英明, 川上千春, 今井光信: インフルエンザウイルス抗原迅速検出キットの検討. 感染症誌 1999; 73: 1199—204.
- 6) 三田村敬子, 山崎雅彦, 菅谷憲夫, 木村和弘, 荏澤真理, 高橋浩治, 他: ノイラミニダーゼ活性を利用した A, B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの臨床的検討. 感染症誌 2000; 74: 12—6.
- 7) 山崎雅彦, 木村和弘, 三田村敬子, 渡邊寿美, 込山 修, 山本敬一, 他: インフルエンザウイルス A, B 型を区別して検出可能な迅速診断キットの臨床的検討. 感染症誌 2000; 74: 1032—7.
- 8) Sugaya N, Nerome K, Ishida M, Nerome R, Nagae M, Takeuchi Y, *et al.*: Impact of influenza virus infection as a cause of pediatric hospitalization. J Infect Dis 1992; 165: 373—5.
- 9) Sugaya N, Mitamura K, Nirasawa M, Takahashi K: The impact of epidemics of influenza and respiratory Syncytial virus on paediatric admissions to an urban general hospital. J Med Virol 2000; 60: 102—6.
- 10) 池松秀之, 鍋島篤子, 鍋島茂樹, 角田恭治, 前田尚康, 鄭 湧, 他: 一般成人及び高齢者におけるインフルエンザ迅速診断キットの有用性についての検討. 感染症誌 1999; 73: 1153—8.
- 11) Whitley RJ, Hayden FG, Reisinger KS, Young N, Dutkowski R, Ipe D, *et al.*: Oral Oseltamivir treatment of influenza in children. Pediatr Infect Dis J. 2001; 20: 127—33.
- 12) 国立感染症研究所: インフルエンザ 1999/2000 シーズン. 病原微生物検出情報 2000; 21: 260—1.

Clinical Evaluation of an Immunochromatography Test for Rapid Diagnosis of Influenza

Masahiko YAMAZAKI¹⁾, Keiko MITAMURA²⁾, Kazuhiro KIMURA³⁾, Osamu KOMIYAMA³⁾,
Mari NIRASAWA²⁾, Keiichi YAMAMOTO³⁾, Masataka ICHIKAWA³⁾, Kenichi SOMEYA¹⁾,
Takako NAKANO¹⁾, Yoko HASHIMOTO⁴⁾, Noriko HAGIWARA⁴⁾, Tamiko MAEZAWA⁴⁾,
Sumi WATANABE⁵⁾, Hideaki SHIMIZU⁶⁾ & Norio SUGAYA²⁾

¹⁾Department of Pediatrics, Hadano Red Cross Hospital

²⁾Department of Pediatrics, Nippon Kokan Hospital

³⁾Department of Pediatrics, Isehara Kyodo Hospital

⁴⁾Department of Laboratory, Isehara Kyodo Hospital

⁵⁾Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory

⁶⁾Kawasaki City Institute of Public Health

We evaluated a rapid diagnostic kit that detects influenza type A and B viral antigens by immunochromatography, Quick Vue[®] Influenza Test (Quidel Corp., San Diego, CA, USA), with 425 specimens collected from patients with influenza-like symptoms at three hospitals between January and March 2001. The specimens included 184 nasal aspirates, 140 nasal swabs, and 101 throat swabs. The test correctly identified 179 of the 204 culture positive specimens and 203 of the 221 culture negative specimens; the sensitivity and specificity compared with the culture were 87.7% and 91.9%, respectively. The sensitivity of the test was 92.6% (112/121) for nasal aspirates, 83.7% (41/49) for nasal swabs, and 76.5% (26/34) for throat swabs, which is similar to the results for conventional rapid enzyme immunoassay kits for influenza virus infection. The sensitivity and specificity of the QuickVue[®] Influenza Test were equivalent to those of Flu OIA[®] (BioStar, Inc., Boulder, CO, USA), with the agreement of 84.2%. Although the QuickVue[®] Influenza Test does not differentiate between influenza A and B viruses, the easy-to-use kit detects both types in the physician's office, allowing physicians to make a decision on prescription of neuraminidase inhibitor therapy during the initial visit.