

酵素免疫測定法によるB型インフルエンザウイルス抗原 検出用キット（インフルB-AD「生研」）の評価

新潟県保健環境科学研究所ウイルス科

西川 眞

新潟大学医学部公衆衛生学

坂井 貴胤・斎藤 玲子・鈴木 宏

Evaluation of an Enzyme Immunoassay kit for the Detection
of Influenza Virus Type B

Makoto NISHIKAWA

*Niigata Prefecture Research Laboratory for
Health and Environmental Protection*

Takatsugu SAKAI, Reiko SAITO and Hiroshi SUZUKI

*Department of Public Health,
Niigata University School of Medicine*

We evaluated a Influenza Virus Type B detection kit (InfluB-AD "Seiken") by comparing it to virus isolation using 128 throat swab specimens and 52 nasal aspirate specimens from children with influenza-like symptoms. Influb-AD "Seiken" showed a sensitivity of 42.5% and specificity of 100% in the case of throat swabs, and a sensitivity of 80.0% and specificity of 96.9% in the case of nasal aspirates. As this new test can detect Influenza Virus Type B within three hours and shows high sensitivity, we conclude that it will be useful for diagnostic purpose in clinical laboratories especially with respect to making treatment decisions.

Key words: Influenza, rapid diagnose, RT-PCR

インフルエンザ, 迅速診断, RT-PCR

はじめに

インフルエンザは、冬季に流行するインフルエンザウイルスに起因する呼吸器感染症である¹⁾。ここ数年でイ

ンフルエンザを巡って大きな変革を迎え、これまで防戦一方であった本疾患感染症戦略は、新たな段階を迎えている。それらは、予防法としての高齢者などのハイリスクグループを対象としたワクチン接種であり²⁾⁻⁵⁾、迅

Reprint requests to: Hiroshi SUZUKI
Department of Public Health,
Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi-Dori,
Niigata 951-8510, JAPAN

別刷請求先：〒951-8510 新潟市旭町通1-757
新潟大学医学部公衆衛生学 鈴木 宏

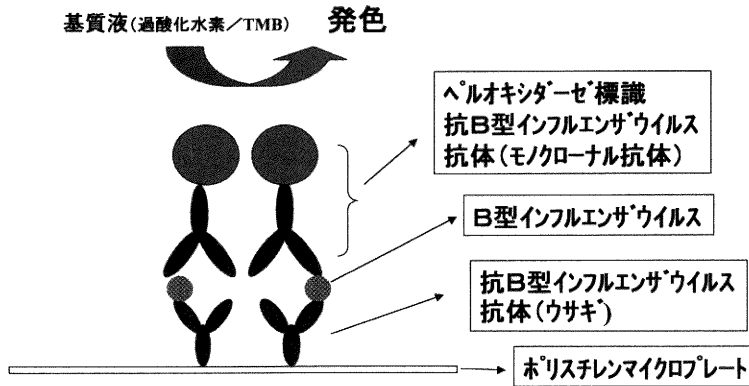


図1 原理図

速診断法の開発導入^{6),7)}，それと連動しての抗インフルエンザウイルス剤による治療である⁸⁾⁻¹⁰⁾。

これまでインフルエンザウイルス感染に於いては臨床診断が主流であり，多数の呼吸器ウイルスとの鑑別は困難であった。しかも，確定診断としてのウイルス分離法や血清学的診断法は，結果が得られるまでに2週間以上かかり，研究的要素が強かった。しかし，迅速診断法が市販され，市中の先生方にとっては短時間にインフルエンザA型，B型を確実に診断し，A型のみのアマンタジン，A型，B型の両者に効果があるノイラミニダーゼ阻害剤による治療法も可能になり，迅速診断法への関心が急激に強まった。

本邦にはこれまで，単独のB型インフルエンザウイルス抗原検出キットは無かった。このたび，酵素免疫測定法によるB型インフルエンザウイルス抗原検出キット，インフルB-AD「生研」(デンカ生研)を検討する機会を得，ウイルス分離と比較検討したので，ここに報告する。

材料及び方法

1) 検体

2001年1月から5月までの間に新潟県内のインフルエンザ様症状を呈した小児患者より，インフルエンザウイルスが分離された咽頭ぬぐい液128例，鼻腔吸引液52例を，合計180例の検体を検査対象とした。

2) ウイルス分離

咽頭拭い液の場合は，患者から綿棒で採取した検体を2 mLの0.5%ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液で浮遊後，鼻腔吸引液の場合は吸引カテーテルで採取した

検体約0.1 mLを2 mLの0.5%ウシ血清アルブミン添加リン酸緩衝液と混合後，それぞれを3,000回転，20分間遠心後，上清をMardin-Darby canine kidney (MDCK)細胞に接種し，34℃で2週間培養後細胞変性効果を確認し，インフルエンザウイルスHI試薬「生研」(デンカ生研製)を用いたHI試験により型を同定した。

3) 検出用キット

B型インフルエンザウイルス検出用としてインフルB-AD「生研」(本キット)を用いた。原理は図1に示したとおり，96ウェルマイクロプレートに固相したB型インフルエンザウイルスの核蛋白に対するポリクローナル抗体(ウサギ)で検体中のB型インフルエンザウイルスを捕獲し，ペルオキシダーゼと結合させたB型インフルエンザウイルスに共通な核蛋白に対するマウスモノクローナル抗体で検出する抗原サンドイッチEIA法である。実際の使用には，アッセイフローチャート(図2)の順に検査を施行した。

4) RT-PCR¹¹⁾

ウイルス分離で用いたと同様の検体200 μLを材料として，RNAを抽出，逆転写酵素でcDNAを作製後，nested PCRにて増幅し，アガロースゲル電気泳動でB型インフルエンザウイルスRNAの特異的バンドを確認し，陽性と判断した。

結 果

咽頭拭い液においては，感度42.5% (17/40)，特異性100% (88/88)であった(結果1)。一方，鼻腔吸引液においては，感度80.0% (16/20)，特異性96.9% (31/32)であった(結果1)。鼻腔吸引液に於いてのみ

ウイルス分離陰性、本品診断キット陽性の 1 例が見られたが、RT-PCR 法にて B 型インフルエンザウイルス遺伝子が検出され、診断キットの結果と同じであった。なお、A 型インフルエンザウイルスが分離された例は全て陰性と判定され、特異性が明確に示された。

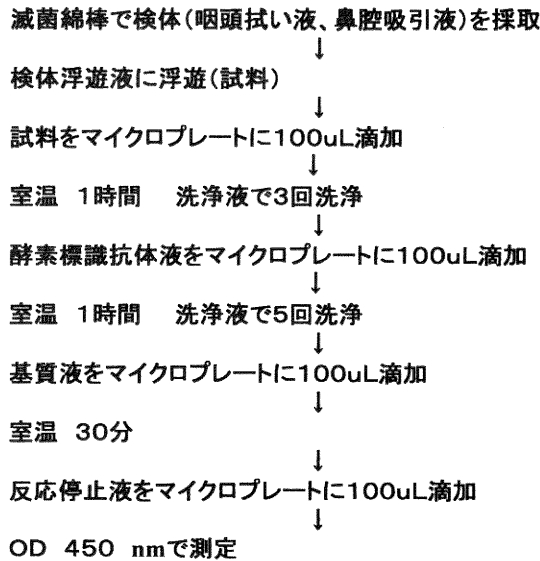


図 2 アッセイフローチャート

考 察

今回検討したインフル B-AD「生研」は、マイクロプレートを用いた抗原サンドイッチ法で、咽頭拭い液においては感度 42.5 %、特異性 100 %、鼻腔吸引液においては、感度 80.0 %、特異性 96.9 %であり、特異度はいずれの検体においても良好な結果が得られたが、咽頭拭い液からの検体は低い感度を示した。これまで市販されている A 型インフルエンザウイルスの診断試薬についても今回同様、咽頭拭い液より鼻腔吸引液の方の感度が高いとされている^{6), 7)}。従って、実際の検査に際し、鼻腔からと咽頭からの検体採取での選択に於いては、咽頭からでは特異度は高いが感度は低め、鼻腔からでは特異度は比較的低いが高感度との特徴に留意する必要がある。なお、いずれにしても A 型インフルエンザウイルスが分離された例では全て陰性と判定され、特異性が明確に示されていた。

鼻腔吸引液において、1 例のみウイルス分離で陰性であったが本キットで陽性、RT-PCR でも B 型インフルエンザウイルスの遺伝子が検出され、検体採取時期や保存・輸送における問題が考えられた。しかし、この原因は不明であった。

本キットでの測定時間は約 3 時間と、市販されている既存の迅速診断法と比較し、多めの時間と人手を要し、クリニックなどで使用するには不向きな点はあるが、多数検体を処理する病院の検査室で使用するには便利である。勿論、従来のウイルス分離と比べれば大幅に迅速化

表 1

		ウイルス分離			計		
		B型陽性	A型陽性	陰性			
(1) 咽頭拭い液の場合							
本品	陽性	17	0	0	17	感度(%)	42.5
	陰性	23	50	38	111	特異性(%)	100.0
計		40	50	38	128		
(2) 鼻腔吸引液の場合							
本品	陽性	16	0	1	17	感度(%)	80.0
	陰性	4	16	15	35	特異性(%)	96.9
計		20	16	16	52		

されている特徴はある。

以上の成績から、本キットはB型インフルエンザウイルス感染の診断に有用である事が示された。また、治療に際し、既存のA型インフルエンザウイルス検出キットと併用してのA、B型の鑑別は、抗ウイルス剤の選択への情報となり、より適切な対応を可能にすると思われる。さらには、治療に当たって最重要とされる、発症48時間以内の治療開始への貴重な手段になると思われる^{4),10)}。

文 献

- 1) 鈴木 宏： かせ病原診断の進歩と現状。臨床と研究, 71: 3039~3043, 19994.
- 2) 山腰雅宏、鈴木幹三、山本俊信、その他： 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, 70: 449~455, 1996.
- 3) 菅谷憲夫： インフルエンザ対策－ワクチンとアマンタジン。日本医事新報, 900: 37~43, 1999.
- 4) 鈴木 宏、斎藤玲子、押谷 仁、増田寛樹： インフルエンザウイルス（ワクチン接種と抗インフルエンザウイルス剤）。化学療法の領域, 16: 315~31, 2000.
- 5) 鈴木 宏、押谷 仁、斎藤玲子、関 奈緒、田邊直仁： 高齢者へのインフルエンザワクチン接種とその効果－A. 高齢者施設での使用－。日本胸部臨床, 59: 662~669, 2000.
- 6) 山崎雅彦、木村和弘、渡辺寿美、その他： 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, 73: 1064~1068, 1999.
- 7) 三田村敬子： インフルエンザ迅速診断の有用性。臨床と研究, 77: 2239~2244, 2000.
- 8) 斎藤玲子、増田寛樹、押谷 仁、鈴木 宏、川崎 聡、佐藤博： 新潟県内高齢者施設に於ける A 型インフルエンザウイルスのアマンタジン耐性株 (Ser-31-Asn 遺伝子型, genotype) 出現頻度。感染症誌, 74: 646~652, 2000.
- 9) 斎藤玲子、押谷 仁、鈴木 宏： アマンタジン耐性インフルエンザウイルス、特に本邦のアマンタジン耐性株出現状況。臨床検査, 45: 884~887, 2001.
- 10) Hayden, F.G., Osterhaus, A., Treanor, J.J., et al.: Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza virus infections, N Engl J Med, 337: 874~880, 1997.
- 11) 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, 71: 522~526, 1997.

(平成13年 9月13日 受付)