

インフルエンザ迅速診断の 検体としての鼻かみ液の評価

浜本 芳彦*1, 浅井 定三郎*2, 谷村 政典*3

*1 浜本小児科：大阪府大阪市住之江区南港中 2-1-99 (〒 559-0033)

*2 あさいこどもクリニック

*3 谷村医院

SUMMARY

インフルエンザ迅速診断の検体として鼻かみ液が使用に耐えるか否かを、インフルエンザ迅速診断キットポクテム S インフルエンザおよびポクテム インフルエンザ A/B (シスメックス社)を用いて検討した。鼻かみ液と鼻腔拭い液との比較、ウイルス分離培養法や Real Time RT-PCR 法などの比較、ポクテムと他社キットとの比較、鼻かみ液量の多寡による成績差などを比較検討した結果、鼻をかめるかどうかという制約があるにしても、鼻かみ液を用いた迅速診断が可能なが認められた。

Key Words インフルエンザ, 迅速診断キット, ポクテム, 鼻かみ液

はじめに

インフルエンザ迅速診断キットの出現はインフルエンザ治療戦略を一変させ、それらキットの迅速性、特別の測定機器を必要としない簡便性や検出精度の高さなどが、エビデンスに基づいた発症早期の抗インフルエンザ薬の使用を可能にした。

診断キットと抗インフルエンザ薬の登場当初、わが国におけるその過剰使用が一部批判的になった時期もあるが、感染拡大の防止や致命率の低下というメリットを生んでいることは、2008/2009年のH1N1 新型インフルエンザの国際比較において明白に証明されている。わが国独自の国民皆保険制度がこれらの繁用を可能にしていることは紛れもない事実といえるが、インフルエンザ対策の総合的評価には、医療制度面も含めた複眼的視点も求められるのではないかと考えられる。

今回のパンデミックに際して、国内で流通した迅速診断キット数は3千万テストを遥かに超えている

と推定されるが、その妥当性については国内外の感染規模や死者数などを含めた今後の検証に待つところが大きいと言わねばならない。

しかしキットの総合的評価としては、検体採取法や発症後検出までの時間の影響、検体中ウイルス量に左右される検出限界の問題、感度／特異度の限界、非特異反応の混入や偽陽性／偽陰性の可能性、さらにこれらのファクターは流行株によって差が出かねないという問題も含めて検討する必要があるが残されている。

検体採取にはもっぱら鼻腔拭い液、鼻腔吸引液、咽頭拭い液が汎用されるが、採取法により感度と特異度に若干の差が認められるとはいえ、総じて良好な成績を示すことはすでに報告した¹⁻³⁾。

検体の採取にはより確実性が要求されることは言うまでもないが、拙劣な採取は鼻出血の誘因となるばかりか、患者にかなりの苦痛と恐怖心を与えることは避けられない。鼻をかむことによって得られた

鼻汁鼻かみ液（以下、鼻かみ液）が上記採取液と同等の成績を示し、代用可能ならば、被験者の負担を解消する上で評価に値する方法となりうることから、鼻かみ液が迅速診断に使用できるか否かを評価した。

材料と方法

1. 検査材料

2007/2009 シーズンに、あさいこどもクリニック、谷村医院、浜本小児科に来院した患者で、インフルエンザの疑いがあり、本人あるいは保護者に対してインフォームドコンセントの承諾が得られた 923 名（8 ヶ月～69 歳）と、ボランティア 7 名の合計 930 名を対象とした。

1) 鼻かみ液

鼻汁鼻かみ液採取用シートを配布し、次の要領で鼻かみ液を採取してもらった。

鼻汁鼻かみ液採取用シートの撥水面を上にして鼻にあてがい、鼻の穴の片方を横から押さえて完全に閉じ、その空いた片方の奥から鼻かみ液を送り出すように少しずつかみ、鼻かみ液を回収する。

ポクテム S インフルエンザおよびポクテム インフルエンザ A/B（ポクテム；シスメックス社）付属の綿棒 2 本および他社迅速診断キットの付属

綿棒の各綿球部分にまんべんなく付着させ、（綿棒）検体とした。採取できた鼻かみ液量を 3 区分し、不適区分は評価に使用しなかった（表 1）。

ポクテム付属綿棒の 1 本はポクテムの検体として使用し、もう 1 本はウイルス分離培養法および Real Time RT-PCR 法用検体に用いた。

2) 鼻腔拭い液

ポクテム付属の綿棒で患者の鼻腔から採取し、ポクテムの検体として使用した。判定結果が鼻かみ液と一致しなかった検体は、検体抽出試料の残りに Real Time RT-PCR 法を実施した。

2. 方法

1) 迅速診断キット

ポクテム インフルエンザ A/B（ポクテム A/B）およびポクテム S インフルエンザ（ポクテム S）を、添付文書に従い操作した。2 種類の他社迅速診断キット（着色粒子標識抗体法、酵素標識抗体法）を各キットの添付文書に従い操作した。

2) 比較対照法

ウイルス分離培養法を実施し、ポクテムとの判定結果が一致しなかった検体は、Real Time RT-PCR 法を実施してその結果を採用することとし、比較対照法とした。

表 1. 鼻かみ液量の区分

| 区分 | 症例数 | 内容 |
|-----|-----|---------------|
| 多い | 466 | 綿棒に充分量付着する |
| 少ない | 269 | 綿棒の球部の一部に付着する |
| 不適 | 195 | 綿棒にほぼ付着しない |

①ウイルス分離培養法

臨床検体からのウイルスの分離は定法に従って行った。検体をハンクス液に懸濁し、Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) 細胞に感染させた。感染細胞を4日間培養し、細胞変性効果(CPE)の出現を観察した。CPEが出現しなかった感染細胞は、凍結融解にて細胞を破碎後、その上清をさらに別のMDCK細胞に感染させ4日間培養した。ウイルスの型は型特異抗体を用いて免疫細胞染色法により決定した。

② Real Time RT-PCR 法

A型はF. Watzinger らの方法⁴⁾を参考にした手法に

従って Real Time RT-PCR 法を行った。B型は公開番号特開 2007-282592 の実施例に従って Real Time RT-PCR 法を行った。プライマーにはA型のMタンパク遺伝子、B型のNタンパク遺伝子に特異的な配列を用いた。増幅産物の増加は Real Time RT-PCR の解析ソフトを用いて確認した。

結 果

1. ポクテムと比較対照法の相関

鼻かみ液をポクテムと比較対照法で判定した結果の相関を表2-a, bに示す。

表2. ポクテムと比較対照法の相関

a

| | | 比較対照法 | | | | 合計 |
|-------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | A | B | A/B | — | |
| ポクテムS | A | 249 | 0 | 0 | 0 | 249 |
| | B | 0 | 127 | 0 | 0 | 127 |
| | A/B | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | — | 15 | 4 | 0 | 339 | 358 |
| 合計 | | 265 | 131 | 0 | 339 | 735 |

| | |
|---------|-------|
| A型陽性一致率 | 94.3% |
| A型陰性一致率 | 100% |
| A型一致率 | 98.0% |
| B型陽性一致率 | 96.9% |
| B型陰性一致率 | 99.8% |
| B型一致率 | 99.3% |
| 全体一致率 | 97.3% |

b

| | | 比較対照法 | | | | 合計 |
|---------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | A | B | A/B | — | |
| ポクテムA/B | A | 246 | 0 | 0 | 1 | 247 |
| | B | 0 | 127 | 0 | 0 | 127 |
| | A/B | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | — | 15 | 4 | 0 | 341 | 360 |
| 合計 | | 262 | 131 | 0 | 342 | 735 |

| | |
|---------|-------|
| A型陽性一致率 | 94.3% |
| A型陰性一致率 | 99.8% |
| A型一致率 | 97.8% |
| B型陽性一致率 | 96.9% |
| B型陰性一致率 | 99.8% |
| B型一致率 | 99.3% |
| 全体一致率 | 97.1% |

2. 鼻かみ液と鼻腔拭い液の相関

鼻かみ液と鼻腔拭い液をポクテムで判定した結果

の相関を表3-a, bに示す。判定が一致しなかった検体の比較対照法の判定結果を表3-cに示す。

表3. 鼻かみ液と鼻腔拭い液の相関

a. ポクテムS

| | | 鼻腔拭い液 | | | | 合計 |
|------|-----|-------|----|-----|----|-----|
| | | A | B | A/B | — | |
| 鼻かみ液 | A | 95 | 0 | 0 | 2 | 97 |
| | B | 0 | 18 | 0 | 0 | 18 |
| | A/B | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | — | 8 | 2 | 0 | 70 | 80 |
| 合計 | | 103 | 20 | 1 | 72 | 196 |

| | |
|---------|-------|
| A型陽性一致率 | 92.3% |
| A型陰性一致率 | 97.8% |
| A型一致率 | 94.9% |
| B型陽性一致率 | 90.5% |
| B型陰性一致率 | 100% |
| B型一致率 | 99.0% |
| 全体一致率 | 93.9% |

b. ポクテムA/B

| | | 鼻腔拭い液 | | | | 合計 |
|------|-----|-------|----|-----|----|-----|
| | | A | B | A/B | — | |
| 鼻かみ液 | A | 95 | 0 | 0 | 3 | 98 |
| | B | 0 | 18 | 0 | 0 | 18 |
| | A/B | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | — | 8 | 2 | 0 | 69 | 79 |
| 合計 | | 103 | 20 | 1 | 72 | 196 |

| | |
|---------|-------|
| A型陽性一致率 | 92.3% |
| A型陰性一致率 | 96.7% |
| A型一致率 | 94.4% |
| B型陽性一致率 | 90.5% |
| B型陰性一致率 | 100% |
| B型一致率 | 99.0% |
| 全体一致率 | 93.4% |

c. 判定不一致検体の比較対照法の判定結果

| 症例数 | ポクテム | | 比較対照法 | |
|-----|-------|------------|------------|------------|
| | 鼻かみ液 | 鼻腔拭い液 | 鼻かみ液 | 鼻腔拭い液 |
| 10 | 陰性 10 | A型 8, B型 2 | A型 8, B型 2 | NT |
| 2 | A型 2 | 陰性 2 | A型 2 | A型 1, 陰性 1 |
| *1 | A型 1 | 陰性 1 | 陰性 1 | 陰性 1 |

*ポクテムA/Bのみに見られた検体

3. 他社迅速診断キットとの比較

鼻かみ液をポクテムSと市販他社キットで判定した結果の比較を表4-a, bに示す。

4. 鼻かみ液量

採取した鼻かみ液量区分(多い, 少ない)別に、ポクテムと比較対照法の判定結果の一致率を表5に示す。

表4. 他社迅速キットとの相関

a. 着色粒子標識抗体法との比較

| | | 着色粒子標識抗体法 | | | | 合計 |
|-------|-----|-----------|----|-----|-----|-----|
| | | A | B | A/B | — | |
| ポクテムS | A | 122 | 0 | 0 | 11 | 133 |
| | B | 0 | 57 | 0 | 0 | 57 |
| | A/B | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | — | 1 | 9 | 0 | 136 | 146 |
| 合計 | | 123 | 66 | 0 | 147 | 336 |

| | |
|---------|-------|
| A型陽性一致率 | 99.2% |
| A型陰性一致率 | 94.8% |
| A型一致率 | 96.4% |
| B型陽性一致率 | 86.4% |
| B型陰性一致率 | 100% |
| B型一致率 | 97.3% |
| 全体一致率 | 93.8% |

不一致検体の比較対照法の判定結果

| 症例数 | ポクテム | 着色粒子標識抗体法 | 比較対照法 |
|-----|-------|------------|------------|
| 11 | A型 11 | 陰性 11 | A型 11 |
| 10 | 陰性 10 | A型 1, B型 9 | A型 1, B型 9 |

b. 酵素標識抗体法との比較

| | | 酵素標識抗体法 | | | | 合計 |
|-------|-----|---------|----|-----|-----|-----|
| | | A | B | A/B | — | |
| ポクテムS | A | 118 | 0 | 0 | 1 | 119 |
| | B | 0 | 68 | 0 | 2 | 70 |
| | A/B | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| | — | 7 | 5 | 0 | 200 | 212 |
| 合計 | | 126 | 73 | 0 | 203 | 402 |

| | |
|---------|-------|
| A型陽性一致率 | 94.4% |
| A型陰性一致率 | 99.6% |
| A型一致率 | 98.0% |
| B型陽性一致率 | 93.2% |
| B型陰性一致率 | 99.1% |
| B型一致率 | 98.0% |
| 全体一致率 | 96.0% |

不一致検体の比較対照法の判定結果

| 症例数 | ポクテムS | 酵素標識抗体法 | 比較対照法 |
|-----|-------|------------|------------------|
| 1 | A型 1 | 陰性 1 | A型 1 |
| 2 | B型 2 | 陰性 2 | B型 2 |
| 1 | AB型 1 | A型 1 | A型 1 |
| 12 | 陰性 12 | A型 7, B型 5 | A型 6, B型 5, 陰性 1 |

表5. 鼻かみ液量と比較対照法との一致率

| 比較対照法との一致率 | 鼻かみ液量の区分 | |
|------------|--------------------|--------------------|
| | 多い | 少ない |
| 陽性一致率 | 97.4% (258/265) | 90.8% (119/131) |
| 陰性一致率 | 100% (201/201) | 100% (138/138) |
| 全体一致率 | 98.5% (459/466) | 95.5% (257/269) |

考 察

鼻かみ液を咽頭拭い液や鼻腔拭い液、鼻腔吸引液の代用として使用できるかどうかには、これら採取法相互の成績の比較検討が不可欠である。採取手技の優劣による検出率の差は起こりにくいという利点がある一方、鼻かみ液の粘性や液に含まれる夾雑物の影響も考慮する必要がある。乳幼児が対象の場合は、鼻をかむという行為自体が困難で、十分な検体量を確保しにくいという難点も残されている。

鼻かみ液の、ポクテムとウイルス分離培養法等の比較対象法との一致率比較では、ポクテム S においては、A 型一致率が 98.0%、B 型一致率が 99.3% と良好な相関が認められた。一方、ポクテム A/B では、1 例の A 型不一致が追加になるだけで、ほぼ同様の結果が得られた。

鼻かみ液と鼻腔拭い液の相関をみると、ポクテム S とポクテム A/B の A 型一致率は、それぞれ 94.9%、94.4%、B 型一致率はいずれも 99.0% で良好な成績が認められた。

鼻かみ液と鼻腔拭い液の判定が一致しなかった症例の検討では、鼻かみ液では陰性と判定された症例のうち、鼻腔拭い液で A 型陽性が 8 例、B 型陽性が 2 例存在し、いずれも比較対照法で陽性が追認されている。逆に鼻かみ液で A 型陽性とされながら鼻腔拭い液では陰性と判定された 2 例のうち、比較対照法では A 型判定例が 1 例、陰性が 1 例であった。これは三田村らも指摘しているように、鼻かみ液の感度が鼻腔拭い液に比べて A 型、B 型ともやや低い⁵⁾ ことと関係があると推定される。

鼻かみ液の判定をポクテム S と他社の迅速診断キットと比較した検討では、着色粒子標識抗体法、酵素標識抗体法とも良好な相関が認められ、他社

キットとの間に優劣はないと判定された。

検体量の多寡が成績に及ぼす影響の検討では、多い 50% (466/930 例)、少ない 29% (269/930 例)、不適 21% (195/930 例) で、21% が液量不足で検査不適となった。鼻かみ液量の多い例での陽性一致率が 97.4%、陰性一致率が 100%、量の少ない例での陽性一致率が 90.8%、陰性一致率 100% で、鼻かみ液量の少ない例でやや成績が劣る結果となった ($p < 0.01$)。

ポクテムを用いた鼻かみ液の検討の結果、液量による成績差の更なる検討を要すると考えられるものの、ポクテム S、ポクテム A/B とも鼻腔拭い液、他社キットとの比較で有意差は認められず、鼻かみ液が鼻腔拭い液の代用として使用可能なことが実証された。

参考文献

- 1) 高橋和郎 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改良型「ポクテム インフルエンザ A/B」の評価. *Sysmex J.* 2005; 28: 3-13.
- 2) 高橋和郎 他. アッセイスティック型インフルエンザ迅速診断キットの評価. *Sysmex J.* 2007; 30: 126-137.
- 3) 浜本芳彦, 浅井定三郎. 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. *小児感染免疫.* 2007; 19(1): 19-25.
- 4) Watzinger F et al. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(11): 5189-5198.
- 5) 三田村敬子 他. 検査材料と迅速診断キット—「鼻かみ液」検体の検討. *インフルエンザ.* 2008; 9(2): 127-133.

Evaluation of the Availability of Nasal Discharge Used for the Influenza Virus Rapid Detection Kit (POCTEM)

Yoshihiko HAMAMOTO^{*1}, Sadasaburo ASAI^{*2} and Masanori TANIMURA^{*3}

^{*1}Hamamoto Children's Clinic, 2-1-99 Nankonaka, Suminoe-ku, Osaka 559-0033

^{*2}Asai Children's Clinic

^{*3}Tanimura's Clinic

SUMMARY

We evaluated utility of nasal discharge blowing from patient nose as a specimen for the rapid influenza virus detection kit (POCTEM, Sysmex Corporation) during influenza season in 2007-2009. Simultaneously nasal swab specimen were collected from the same patients who collected nasal mucus.

Both specimen were assayed by POCTEM, culture test, and PCR method test, respectively, and compared the results among them.

These results show that nasal discharge is useful for the specimen of POCTEM, except inconvenience the specimen can not gain from the patient who can not blow nose.

Key Words Influenza, Rapid Detection Kit, POCTEM, Nasal Discharge
