

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

高橋 和郎^{*1}，馬場 宏一^{*2}，
浜本 芳彦^{*3}，岡本 健治^{*4}，谷村 政典^{*5}，奥野 良信^{*1}

*1 大阪府立公衆衛生研究所感染症部：大阪市東成区中道1-3-69（〒537-0025）

*2 医療法人 宏知会ばば小児科

*3 浜本小児科

*4 岡本医院

*5 谷村医院

SUMMARY

スティック型の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，以下ポクテムS）について，基礎的あるいは臨床検体を用いて性能を評価した。ポクテムSは比較に用いた従来型キットポクテム インフルエンザA/B（以下ポクテム）に比べ，結果判定に必要な所要時間が15分から10分に短縮された。A，B型のワクチン株を用いたポクテムSの検出感度はポクテムや他の高感度な市販キットのそれと同等であった。また，ポクテムSはポクテムと同様に，すべてのHA亜型ウイルス（27株）とB型ウイルス（5株）に型特異的に反応し，これら以外の18種の呼吸器感染ウイルスや25種の細菌類とは交差反応性を認めなかった。インフルエンザ様症状を示した患者からの臨床検体を用いて，ポクテムを対照に結果の相関性を検討し，A，B型ともに両キット間に高い一致性を認めた。ウイルス分離との相関性の検討では，2種（鼻腔吸引液，鼻腔拭い液）のいずれの臨床検体においても，A型，B型ともに90%を超える高い検出感度（陽性一致率）を示した。特異性（陰性一致率）については，鼻腔吸引液でのA型，鼻腔拭い液でのB型では高い特異性を示したが，他の場合はやや低い特異性であった。この原因はポクテムSで陽性でありウイルス分離が陰性である例があるためであるが，その大部分はRT-PCR法ではウイルス遺伝子が陽性であったことから，これを考慮するとポクテムSは満足できる特異性を示すと考えられる。次に，RT-PCR法との性能評価比較試験では，A型陽性一致率は85～90%とウイルス分離の場合に比べ予想通りやや低値を示したが，高い特異性を示した。以上より，スティック型のポクテムSは現行のポクテムと同等の感度と特異性を有し，判定時間が10分とより短縮され，臨床領域でのインフルエンザの迅速診断法として有用であると考えられる。

Key Words インフルエンザ，迅速診断キット，イムノクロマトグラフィー，スティック型

はじめに

現在，インフルエンザの診断には数種類の迅速診断キットが使用され，患者の診断に威力を発揮している¹⁻¹¹⁾。我々は2005年に，迅速診断キットの1つであるポクテム インフルエンザA/B（以下ポクテム）の

改良型（シスメックス株式会社）の性能を評価し報告した¹²⁾。その後，反応時間の短縮を目的に，従来のカセット型をスティック型に改変し試験管内で反応するキット（ポクテムS）に改良された。今回その性能を再評価したので報告する。

材料と方法

1. 検体

1) インフルエンザウイルス株

インフルエンザA型ウイルス (以下A型) 27株およびインフルエンザB型ウイルス (以下B型) 5株を, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cellに感染させ, 細胞全体に細胞変性効果を認めた時点で回収, 遠心し細胞上清を採取して - 80 に保存しストックウイルス液を調製した。ストックウイルス液の感染価は, ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ染色法を用いたフォーカス計数法¹³⁾により決定した (単位: Focus Forming Unit ; FFU)。

2) 交差反応性試験用ウイルスおよび細菌類

呼吸器疾患に関連し, ポクテムSの測定対象以外のウイルス18株を細胞培養にて増殖させストッ

クウイルス液を調製した。また同様な細菌類25株を各々の増殖培地で増殖させ, ストック液を調製し (表1), 交差反応性を試験した。

3) 臨床検体採取対象患者

本研究課題は本人あるいは保護者に対して研究内容を説明し, インフォームドコンセントの了承が得られた患者から検体を採取した。2004年~2005年シーズンまたは2005年~2006年シーズンに, ばば小児科および浜本小児科, 岡本医院, 谷村医院の4施設に, かぜ様症状を呈して受診し, 次の3点の基準を満たす患者を対象患者とした。

- ・ 38 以上の発熱がある。
- ・ 発症 (発熱) から3日以内である。
- ・ 臨床的所見からインフルエンザウイルス感染の疑いがある。

表1. ポクテムSとの交差反応性試験に用いたウイルス株および細菌類

ウイルス	細菌類
Adenovirus Type 1	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus Type 2	<i>Escherichia coli</i>
Adenovirus Type 3	<i>Enterococcus faecalis</i>
Adenovirus Type 4	<i>Haemophilus influenzae</i>
Adenovirus Type 5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Adenovirus Type 6	<i>Listeria monocytogenes</i>
Adenovirus Type 7	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Coxsackievirus Type A9	<i>Proteus vulgaris</i>
Coxsackievirus Type B5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Coxsackievirus Type B6	<i>Serratia marcescens</i>
Echovirus Type 2	<i>Staphylococcus aureus</i>
Echovirus Type 3	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Echovirus Type 6	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Echovirus Type 11	<i>Streptococcus group C</i>
Echovirus Type 25	<i>Streptococcus group F</i>
Echovirus Type 30	<i>Streptococcus group G</i>
Mumps virus	<i>Streptococcus mutans</i>
Respiratory syncytial virus	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus pyogenes (Group A)</i>
	<i>Streptococcus sanguis</i>
	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
	<i>Mycoplasma fermentans</i>
	<i>Mycoplasma hominis</i>
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
	<i>Bordetella pertussis</i>

4) 検体採取方法

採取した臨床検体は、鼻腔吸引液313例、鼻腔拭い液246例である。

鼻腔吸引液は、吸引トラップにポクテムS付属の綿棒を浸漬して綿棒に採取した。鼻腔拭い液は、ポクテムS添付文書に従いキット付属の綿棒に採取した。綿棒に採取した検体を、操作法に従い検体抽出試薬で抽出して使用した(図1)。

採取した検体は速やかに検査に供し、保存する場合は綿棒に採取した状態で冷蔵24時間以内とした。同時に別の綿棒に採取した検体を生理食塩水またはハンクス液で抽出して2分割し、一部をウイルス分離・タイピング検査に供した。残りは-20℃に凍結保存して必要に応じてRT-PCR検査に供した。その内、鼻腔吸引液13例、鼻腔拭い液11例はウイルス分離試験が成立しなかった。

2. 迅速診断方法

ポクテムSは着色ラテックスを用いたイムノクロマト法を原理とする抗原検出キットである。その操作法を図1に示す。このポクテムSの対照キットとしてポクテムおよび市販の5キット(キットA~E)を使用した。対照キットは、それぞれのキットの添付文書に従って抗原検出検査を行った。

3. インフルエンザウイルスの分離

インフルエンザ疑いの臨床検体からのウイルス分離は定法に従って行った。鼻腔吸引液および鼻腔拭い液をMDCK細胞に添加して培養し、CPEが出現すればウイルスをさらに増殖させストックウイルス液を作製した。ウイルスの型は型特異抗体を用いて酵素抗体法により決定した。

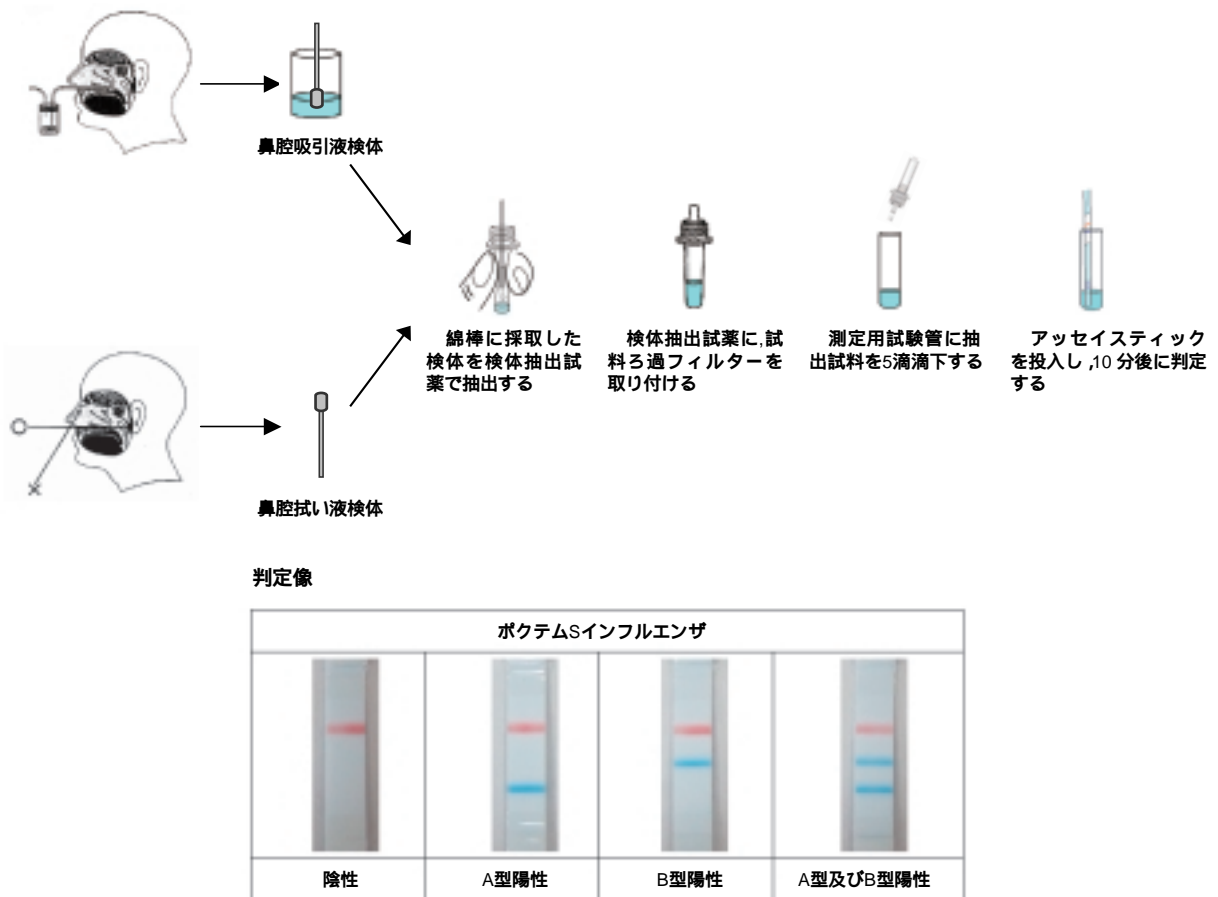


図1. ポクテムSインフルエンザの標準測定方法

4. RT-PCR法によるインフルエンザウイルス遺伝子の検出

2004年～2005年シーズンのインフルエンザ臨床検体のうち、ポクテムSとウイルス分離の結果との間に乖離が認められたものに関しては、定法に従って nested RT-PCR法¹⁴⁾による追加解析を行った。プライマーにはA・B型のヘマグルチニン遺伝子に特異的な配列を用いた。増幅産物はアガロース電気泳動を行い、A、B型特異プローブを用いてサザンプロットを行って確認した。この方法の検出感度は、A/Kitakyushu/159/93 (H2N2) 株を用いた場合 4.4×10^{-1} FFU/mL であり、B/Johannesburg/5/99株を用いた場合 3.0×10^{-1} FFU/mL である。一方、2005年～2006年シーズンのインフルエンザ臨床検体に関しては、定法に従って Real Time RT-PCR法による追加解析を行った。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。この方法の検出感度は、培養ウイルスを用いて検討した結果、 10^{-1} FFU/mLであった。

5. 性能評価方法

1) 結果判定に必要な反応時間の検討

臨床検体 (A型陽性12例、B型陽性14例) の抽出試料を検体として、操作法に従ってポクテムSで測定し、ポクテムとポクテムSのA型、B型それぞれの陽性ラインの出現時間を比較した。出現時間は反応開始後、最初に肉眼的に発色を認めた時間とした。また、ポクテムおよびポクテムSは反応開始後にメンブレン上が青く染色され、時間と共に青みが消え、明瞭な陽性ラインが出現する。そこで同時に、臨床検体40例の抽出試料を検体として、操作法に従って、ポクテムSで測定し、ポクテムとポクテムSの青いバックグラウンドの反応開始からの消失時間を比較した。

2) 検出感度の決定

A型2株およびB型2株のストックウイルス液を2倍系列希釈した検体を、ポクテムSとポクテムおよび市販5キット (A～E) の操作法に従い、付属の綿棒で採取して測定し検出限界を決定し比較した。この検出感度の決定は2回行い確認した。

3) 反応性の検討

A型27株およびB型5株のストックウイルス液を 2×10^4 FFU/mL に調製し、その150 μ L を検体抽出試薬0.8mLに加えてよく混和しポクテムS測定用の検体 (抽出試料) とした。抽出試料を操作法に従って測定した。

4) ウイルスと細菌類に対する交差反応性試験

主に咽喉炎や上気道炎を起こすA型およびB型以外のウイルス18株、および細菌類25株のストック液を 1×10^6 個以上に調製し、その150 μ L をポクテムSの検体抽出試薬0.8mLに加え、よく混和して抽出試料とし、操作法に従って測定した。

5) 相関性試験

臨床検体 (鼻腔吸引液313例、鼻腔拭い液246例) をポクテムSおよびポクテム (対照) を用いて、各診断キットの操作法に従って測定し判定結果を比較した。また、ポクテムS判定結果とウイルス培養結果およびポクテムS判定結果と Real Time RT-PCR法の測定結果を比較した。

結 果

1. 判定結果に必要な反応時間の検討

A型陽性12例、B型陽性14例の臨床検体を用いて、ポクテムSの反応開始後に経時的に陽性ラインが出現する累積陽性率を算出し、**図2**に示した。A型については、検討に用いたすべての臨床検体を結果判定するのに必要な反応時間は、ポクテムでは少なくとも10分を要したが、ポクテムSでは7分に短縮された (**図2-a**)。B型については、ポクテム、ポクテムSそれぞれ7分、8分であった (**図2-b**)。また、ポクテムおよびポクテムSは反応直後、メンブレン全体が青色に染まり、反応時間が経つにつれ、その青色のバックグラウンドは消失していき、陽性ラインが出現してくる。**図2-c**に示すように、バックグラウンド消失時間がポクテムでは13分必要であったが、ポクテムSでは10分に短縮された。

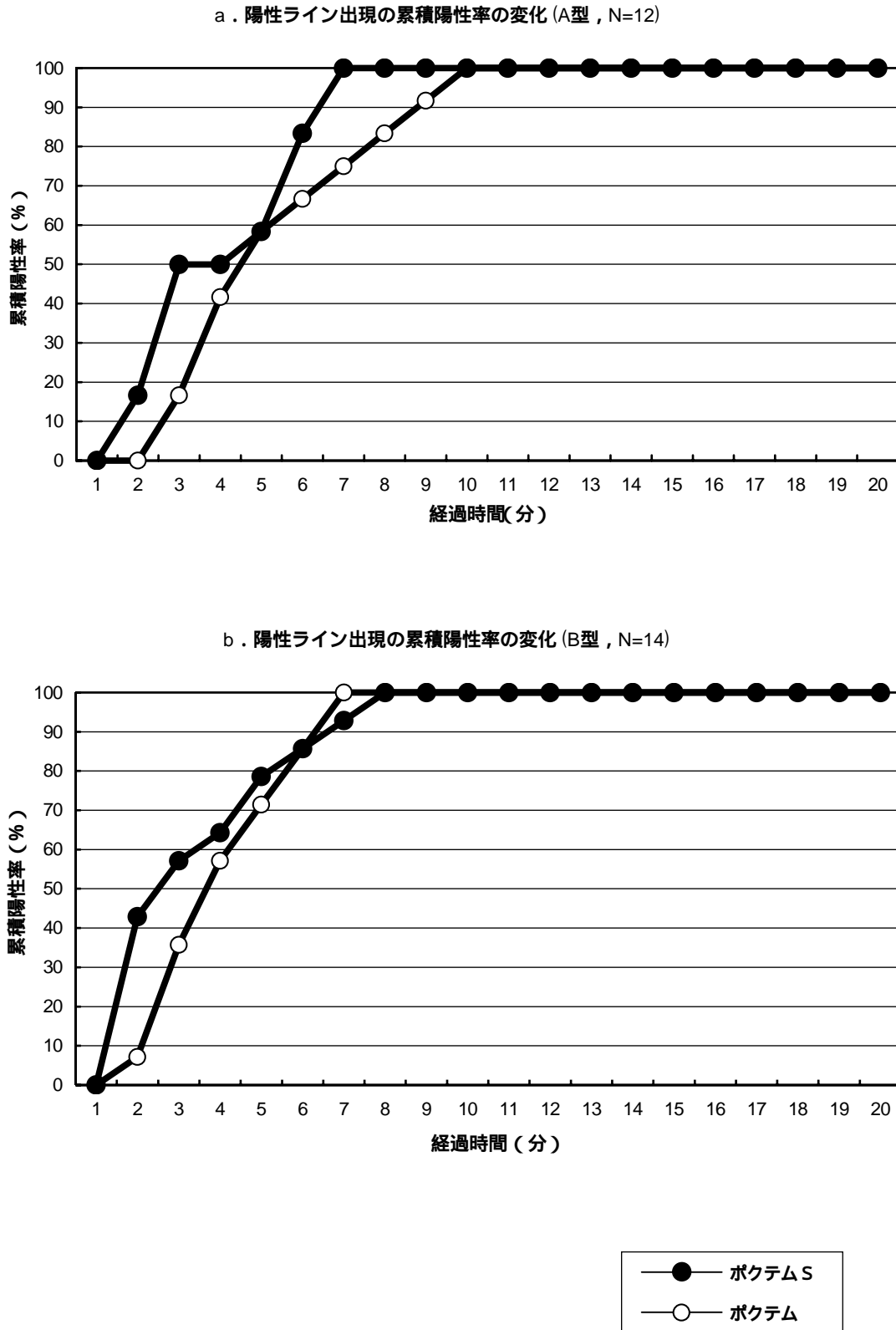


図2. ポクテムSの結果判定に必要な反応時間の検討

ポクテムSでA型陽性であった鼻腔吸引液または鼻腔拭い液12検体(a)及びB型が陽性であった鼻腔吸引液または鼻腔拭い液の検体それぞれ14検体(b)を用いて、ポクテムSおよびポクテムで同時に反応させ、経時的に陽性と判断した検体の累積陽性率を示す。また、鼻腔吸引液または鼻腔拭い液検体40検体(A型陽性12検体, B型陽性14検体, 陰性14検体)を用いて、反応後のバックグラウンドが消失した検体の累積消失率を経時的に示す(c)。

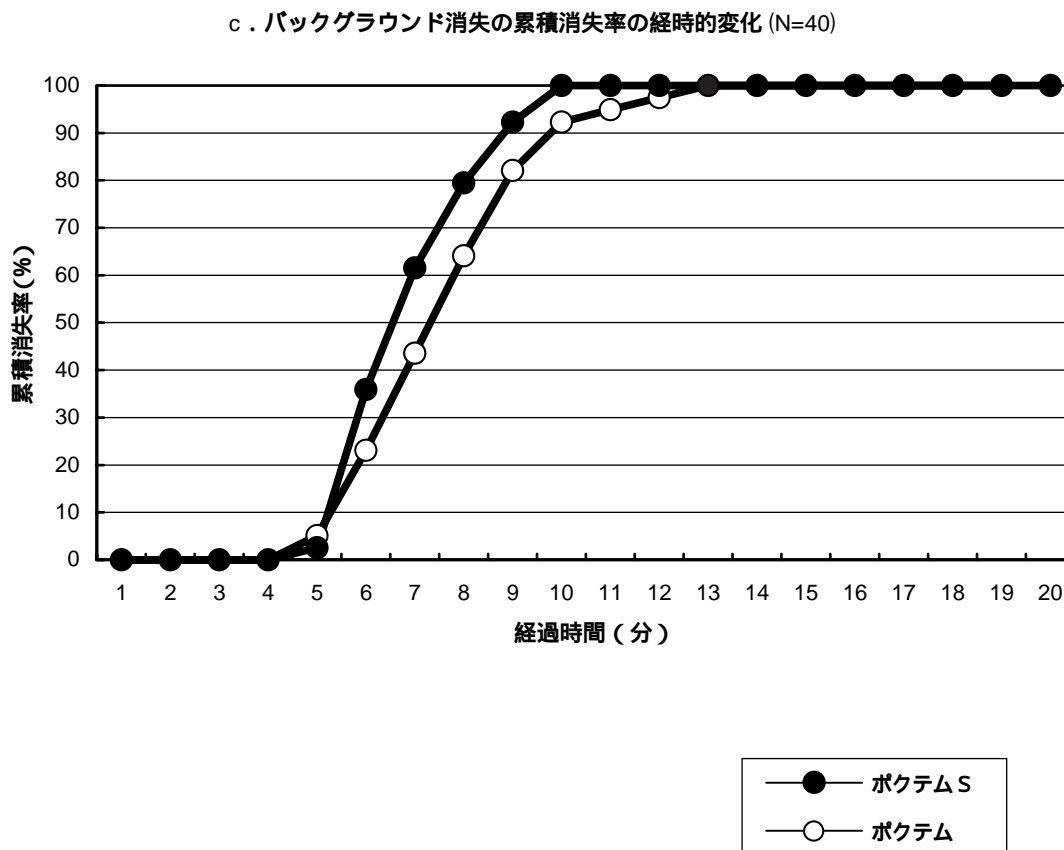


図2. ポクテムSの結果判定に必要な反応時間の検討

ポクテムSでA型陽性であった鼻腔吸引液または鼻腔拭い液12検体(a)及びB型が陽性であった鼻腔吸引液または鼻腔拭い液の検体それぞれ14検体(b)を用いて、ポクテムSおよびポクテムで同時に反応させ、経時的に陽性と判断した検体の累積陽性率を示す。また、鼻腔吸引液または鼻腔拭い液検体40検体(A型陽性12検体、B型陽性14検体、陰性14検体)を用いて、反応後のバックグラウンドが消失した検体の累積消失率を経時的に示す(c)。

2. 培養ウイルスに対する検出感度の決定

ポクテムSおよびポクテム，市販の5種のキットにおける4株のインフルエンザウイルスに対する検出感度の測定結果を表2に示す。ポクテムSでは，A型においてはA/Panama/2007/99 (H3N2) およびA/New Caledonia/20/99 (H1N1) を被検ウイルスとして用いた場合，検出限界は共に 1.3×10^3 FFU/mLであった。また，B型においてはビクトリア系統株のB/Shangdong/7/97 および山形系統株のB/Yamanashi/166/98を被検ウイルスとして用いた場合，検出限界はそれぞれ 3.8×10^2 FFU/mL， 5.0×10^3 FFU/mLであった。対照キット

との比較については，A型のA/Panama/2007/99 (H3N2) に対して，対照キットのうち最も高い検出感度であったキットCに比べ1/2の検出感度であったが，ポクテムとは同等の検出感度を示した。A/New Caledonia/20/99 (H1N1) に対しては，対照キットで最も高い検出感度であったキットCと同等の検出感度を示した。B型のB/Shangdong/7/97とB/Yamanashi/166/98については，対照キットで最も高い検出感度であったポクテムおよびキットCと同等の検出感度であった。

表2. 各種迅速診断キットにおけるインフルエンザウイルスに対する検出感度

+ : 陽性, - : 陰性, NT : 未検査

インフルエンザウイルス株	感染力価 (FFU/mL)	ポクテムS	ポクテム	A	B	C	D	E
A/Panama/2007/99 (H3N2)	1.0×10^4	NT	NT	NT	+	NT	+	NT
	5.2×10^3	NT	NT	NT	+	NT	+	+
	2.6×10^3	+	+	+	+	NT	-	+
	1.3×10^3	+	+	-	-	+	NT	-
	6.5×10^2	-	-	-	NT	+	NT	NT
	3.3×10^2	-	-	NT	NT	-	NT	NT
A/New Caledonia/20/99 (H1N1)	2.0×10^4	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	1.0×10^4	NT	NT	NT	+	NT	+	+
	5.0×10^3	+	+	+	+	+	+	+
	2.5×10^3	+	+	-	+	+	-	-
	1.3×10^3	+	-	-	-	+	NT	NT
	6.3×10^2	-	NT	NT	NT	-	NT	NT
B/Shandong/7/97 (ビクトリア系)	6.0×10^3	NT	NT	NT	+	NT	+	NT
	3.0×10^3	NT	NT	NT	+	NT	-	+
	1.5×10^3	+	+	+	-	NT	-	+
	7.6×10^2	+	+	-	-	+	NT	+
	3.8×10^2	+	+	-	-	+	NT	-
	1.9×10^2	-	-	NT	NT	-	NT	NT
B/Yamanashi/166/98 (山形系)	8.0×10^4	NT	NT	NT	+	NT	+	NT
	4.0×10^4	NT	NT	NT	+	NT	-	+
	2.0×10^4	NT	NT	+	-	+	-	+
	1.0×10^4	+	+	-	-	+	NT	-
	5.0×10^3	+	+	-	-	+	NT	NT
	2.5×10^3	-	-	NT	NT	-	NT	NT

3. 種々のインフルエンザウイルス株に対する反応性の検討

A型27株およびB型5株に対するポクテムSの反応性の結果を表3に示す。ポクテムSでは、A型のH1からH15までのすべての亜型27株とB型の5株すべてが型特異的に検出可能であった。

4. 種々の呼吸器系ウイルスと細菌類に対する交差反応性の検討

A型およびB型インフルエンザウイルス以外の主に咽頭炎や上気道炎を起こすウイルス18株および細菌類25株(表1)に対しては、ポクテムSの反応性はすべて陰性であり、交差反応性は認められなかった。

表3. インフルエンザウイルス株に対するポクテムSの反応性の試験成績

株名	判定
A/Beijing/262/95(H1N1)	A
A/New Caledonia/20/99(H1N1)	A
A/Bangkok/10/83(H1N1)	A
A/Yamagata/120/86(H1N1)	A
A/Yamagata/32/89(H1N1)	A
A/PR/8/34(H1N1)	A
A/Okuda/57(H2N2)	A
A/Wyoming/3/03(H3N2)	A
A/Aichi/2/68(H3N2)	A
A/Sydney/5/97(H3N2)	A
A/Panama/2007/99(H3N2)	A
A/Fukuoka/C29/85(H3N2)	A
A/Sichuan/2/87(H3N2)	A
A/Kitakyusyu/159/93(H3N2)	A
A/Budgreiger/Aichi/1/77(H3N8)	A
A/Duck/Czechoslovakia/1/56(H4N6)	A
A/Turkey/Ontario/7732/66(H5N9)	A
A/Shearwater/Australia/1/72(H6N5)	A
A/Tufted duck/Shimane/124R/80(H7N7)	A
A/Turkey/Ontario/6118/68(H8N4)	A
A/Turkey/Wisconsin/66(H9N2)	A
A/Chicken/Germany/N/49(H10N7)	A
A/Duck/England/56(H11N6)	A
A/Duck/Alberta/60/76(H12N5)	A
A/Gull/Maryland/704/77(H13N6)	A
A/Mallard/Astrakhan/263/82(H14N5)	A
A/Duck/Australia/341/83(H15N8)	A
株名	判定
B/Lee seed/40	B
B/Shandong/7/97	B
B/Yamanashi/166/98	B
B/Johannesburg/5/99	B
B/Shanghai/361/02	B

5 . 相関性試験

1) ポクテムとの相関性

臨床検体 (鼻腔吸引液313例, 鼻腔拭い液246例) に対するポクテムSとポクテムとの判定結果の相関を表4に示す。ポクテムSでの結果は2種の臨床検体において, ポクテムの結果と100%の一致を示した。

2) ウイルス分離との相関

上記臨床検体におけるポクテムSとウイルス分離との判定結果の相関を表5に示す。ウイルス分離の結果は, 鼻腔吸引液300検体で, ウイルス分離陽性は, A型, B型それぞれ91株, 52株であった。ウイルス分離陰性は157検体であった。鼻腔拭い液検体235検体では, A型, B型それぞれ99株, 47株が分離され, 89検体が陰性であった。

ポクテムSとウイルス分離との結果の相関について, 鼻腔吸引液ではA型の陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ92.3%, 95.7%であり, B型のそれらは98.1%, 89.5%であった。鼻腔拭い液ではA型の陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ92.9%, 83.8%であり, B型のそれらは97.9%, 98.4%であった。

不一致が認められた検体について, RT-PCR法

による追加解析を行って補正したウイルス分離の結果を表6に示す。ウイルス分離の結果は, 鼻腔吸引液300検体で, ウイルス分離陽性は, A型, B型それぞれ97株, 78株であった (A型, B型両陽性1検体)。ウイルス分離陰性は126検体であった。鼻腔拭い液検体235検体では, A型, B型それぞれ117株, 49株が分離され, 69検体が陰性であった。

ポクテムSとウイルス分離との結果の相関について, 鼻腔吸引液ではA型の陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ93.8%, 99.0%であり, B型のそれらは98.7%, 100%であった。鼻腔拭い液ではA型の陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ94.0%, 96.6%であり, B型のそれらは100%, 100%であった。

3) RT-PCRとの相関

次に, ポクテムSとReal Time RT-PCRの結果の相関を表7に示す。鼻腔吸引液ではA型の陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ84.7%, 96.4%であり, B型のそれらは80.0%, 100.0%であった。鼻腔拭い液ではA型の陽性一致率, 陰性一致率はそれぞれ88.5%, 92.5%であり, B型のそれらは100%, 100%であった。

表4 . ポクテムSとポクテムとの相関性

	鼻腔吸引液	鼻腔拭い液
A型陽性一致率	100% (94/94)	100% (118/118)
A型陰性一致率	100% (219/219)	100% (128/128)
A型全体一致率	100% (313/313)	100% (246/246)
B型陽性一致率	100% (79/79)	100% (51/51)
B型陰性一致率	100% (234/234)	100% (195/195)
B型全体一致率	100% (313/313)	100% (246/246)
全体一致率	100% (313/313)	100% (246/246)

表5 . ポクテムSとウイルス分離との相関性

	鼻腔吸引液	鼻腔拭い液
A型陽性一致率	92.3% (84/91)	92.9% (92/99)
A型陰性一致率	95.7% (200/209)	83.8% (114/136)
A型全体一致率	94.7% (284/300)	87.7% (206/235)
B型陽性一致率	98.1% (51/52)	97.9% (46/47)
B型陰性一致率	89.5% (222/248)	98.4% (185/188)
B型全体一致率	91.0% (273/300)	98.3% (231/235)
全体一致率	85.7% (257/300)	86.0% (202/235)

表6 . ポクテムSとウイルス分離 + RT-PCR 法との相関性

	鼻腔吸引液	鼻腔拭い液
A型陽性一致率	93.8% (91/97)	94.0% (110/117)
A型陰性一致率	99.0% (201/203)	96.6% (114/118)
A型全体一致率	97.0% (291/300)	95.3% (224/235)
B型陽性一致率	98.7% (77/78)	100% (49/49)
B型陰性一致率	100% (222/222)	100% (186/186)
B型全体一致率	99.7% (299/300)	100% (235/235)
全体一致率	97.0% (291/300)	95.3% (224/235)

表7 . ポクテムSとRT-PCR との相関性

	鼻腔吸引液	鼻腔拭い液
A型陽性一致率	84.7% (61/72)	88.5% (92/104)
A型陰性一致率	96.4% (53/55)	92.5% (49/53)
A型全体一致率	89.8% (114/127)	89.8% (141/157)
B型陽性一致率	80.0% (4/5)	100% (2/2)
B型陰性一致率	100% (122/122)	100% (155/155)
B型全体一致率	99.2% (126/127)	100% (157/157)
全体一致率	89.0% (113/127)	89.8% (141/157)

考 察

今回評価したスティック型の迅速診断キットの主たる特徴は、従来のポクテム（15分で判定）と比較して結果判定が10分で可能となった点である。実際、ポクテムSではA、B型ともに反応後3分でラインが検出されはじめ、A型では7分、B型では8分後に陽性ラインの出現は完了した（図2）。特にA型での出現時間が短縮改善された。バックグラウンドの消失時間も3分短縮された。総合的に判定時間が5分短縮され、外来診察において、より迅速な医療サービスが可能となることが期待される。

ワクチン株を用いたポクテムSの検出感度は、A、B型ともにポクテムのそれとほぼ同等であり、他の

高感度な市販キットと比較しても同等な感度であった（表2）。また、特異性に関しては、ポクテムSはA型のH1からH15までのすべての亜型27株とB型の5株すべてが型特異的に検出可能であり（表3）、A型およびB型インフルエンザウイルス以外の主に咽頭炎や上気道炎を起こすウイルスや細菌類（表1）に対する反応性はすべて陰性であり、交差反応性は認められなかった。ゆえに、既知のウイルスや細菌を用いて行った結果、ポクテムSの感度と特異性はポクテムのそれと同等であると結論づけられる。実際、ポクテムSとポクテムに用いている抗インフルエンザ抗体は同一のものであり、反応システムもカセット型かスティック型かの違いだけで他の構成要素は同一のシステムである。

臨床検体を用いたポクテムSとポクテムとの性能評価比較試験では、2種の臨床検体（鼻腔吸引液、鼻腔拭い液）全てにおいて、ポクテムSとポクテムの結果は100%の一致を示した（表4）。従って、臨床検体の検査においても、ポクテムSは従来のポクテムと同等の性能を有すると考えられる。同じ臨床検体を用いて、ポクテムSとウイルス分離との結果の相関性を検討した（表5）。2種（鼻腔吸引液、鼻腔拭い液）のいずれの臨床検体においても、A型、B型ともに90%以上の高い検出感度（陽性一致率）を示した。特異性（陰性一致率）については、90%以上と鼻腔吸引液でのA型、鼻腔拭い液でのB型では高い特異性を示したが、他の場合は満足できる特異性ではなかった。この原因を明らかにするために、ポクテムSで陽性でありウイルス分離が陰性であった検体について、真に感染し陽性であるのかを確認するために、RT-PCR法でウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、鼻腔吸引液でのウイルス分離についてA型が陰性であった9例中7例、また、B型が陰性であった26例すべてにおいてRT-PCR法では型特異的にウイルス遺伝子を検出した。鼻腔拭い液でのウイルス分離についてA型が陰性であった22例中18例、また、B型が陰性であった3例すべてにおいてRT-PCR法では型特異的にウイルス遺伝子を検出した。この結果により、ポクテムSで陽性でありウイルス分離が陰性であった検体の大部分はウイルス遺伝子陽性であり、感染が確認され、これを考慮するとポクテムSは満足できる特異性を示すと考えられる（表6）。ポクテムSのみ陽性であった例の解釈については種々の可能性が考えられる。ポクテムSが偽陽性である可能性を完全には否定できないが、ポクテムSが正しくウイルス分離が陰性であった理由として、検体中の感染性のあるウイルスが少量である（死滅したウイルスを含めた抗原量は相対的に多い）、検体の移送中の温度変化、培養状態の変化などが考えられる。また、RT-PCR法が陰性であった理由として、PCR法の反応過程を阻害する物質が抽出された核酸中に存在した可能性が考えられる。今回はPCR法を行う上でinternal controlを用いた阻害物質の有無を確認する方法を行わなかった。今後考慮する必要があると考えられる。

また、鼻腔吸引液でポクテムS陰性、ウイルス培養A型陽性となった1例および鼻腔拭い液でポクテムS陰性、ウイルス培養B型陽性となった1例については、それぞれRT-PCR法の結果、陰性を示した。これら2例はRT-PCR法の結果が再現された。この解釈として、2例は比較的発症初期であるため、迅速診断法より1000倍感度の高いウイルス分離で陽性となったと考えられる。ウイルス分離法より100倍感度の高いRT-PCR法で陰性となった理由は、上述の阻害物質の存在が最も考えられる。

次に、最も感度が高いと考えられるRT-PCR法とポクテムSとの性能評価比較試験を、2005/2006シーズンの臨床検体を用いて行った（表7）。A型陽性一致率は2種の臨床検体（鼻腔吸引液、鼻腔拭い液）において、85～90%とウイルス分離の場合に比べ予想通りやや低値を示した。鼻腔吸引液においてポクテムSでA型陽性、RT-PCR陰性の2検体はポクテムや市販の1キットでも陽性であった。このRT-PCRでの偽陰性の理由は核酸抽出液中のPCR反応阻害物質の存在によることが最も考えられる。B型については検体数が非常に限られるため、その評価は困難である。

以上より、スティック型のポクテムSは現行のポクテムと同等の特異性と感度を有し、判定時間10分とより短縮され、また、インフルエンザおよびRSVの両方を測定する際に、ポクテムSシリーズでは検体抽出試薬が共通化されていることから、検体採取が1回で済み、患者苦痛の軽減や医療従事者の作業を削減できるという点からも、外来診療において有用性が期待される。

参考文献

- 1) 池松秀之, 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. 感染症学雑誌, 73: 1153 ~ 1158, 1999.
- 2) 後藤郁男, 他: A型インフルエンザ迅速診断キット(ディレクティジェンFluA)の検出感度と特異性に関する研究. 臨床とウイルス, 28: 248 ~ 252, 2000.
- 3) 山崎雅彦, 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

- 学雑誌, 73 : 1064 ~ 1068, 1999.
- 4) 三田村敬子, 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研究. 感染症学雑誌, 73 : 1069 ~ 1073, 1999.
 - 5) 渡邊寿美, 他 : インフルエンザウイルス迅速診断キットの検討. 感染症学雑誌, 73 : 1199 ~ 1204, 1999.
 - 6) 山崎雅彦, 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. 感染症学雑誌, 74 : 1032 ~ 1037, 1999.
 - 7) 清水英明, 他 : A 型・B 型を鑑別できるインフルエンザウイルス迅速診断キットの感度と特異性. 感染症学雑誌, 74 : 1038 ~ 1043, 1999.
 - 8) 三田村敬子, 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. 感染症学雑誌, 74 : 12 ~ 16, 2000.
 - 9) 川上千春, 他 : イムノクロマトグラフィー法による A, B 型インフルエンザウイルス迅速診断キットの検討. 感染症学雑誌, 75 : 792 ~ 799, 2001.
 - 10) 山崎雅彦, 他 : 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. 感染症学雑誌, 75 : 1047 ~ 1053, 2001.
 - 11) 三田村敬子, 山崎雅彦, 川上千春 : 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評価. インフルエンザ, 3 : 105 ~ 109, 2002.
 - 12) 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, 28 : 3 ~ 13, 2005.
 - 13) Okuno Y, et al.: Rapid focus reduction neutralization test of influenza A and B viruses in microtiter system. J Clin. Microbiol., 28 : 1308 ~ 1313, 1990.
 - 14) Zhang W, et al.(Eds)In : Diagnostic Molecular Microbiology : Principle and Applications, pp.381 ~ 382, American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 1993.

Evaluation of the New Stick-type Rapid Influenza Detection Kit, POCTEM S Influenza

Kazuo TAKAHASHI^{*1}, Koichi BABA^{*2}, Yoshihiko HAMAMOTO^{*3}, Kenji OKAMOTO^{*4},
Masanori TANIMURA^{*5} and Yoshinobu OKUNO^{*1}

^{*1} Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health,
1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025

^{*2} Baba Children's Clinic

^{*3} Hamamoto Children' Clinic

^{*4} Okamoto Clinic

^{*5} Tanimura Clinic

SUMMARY

We evaluated the ability of a new stick-type rapid influenza detection kit, POCTEM S Influenza (POCTEM S) from a basic and clinical point of view. POCTEM S in comparison with a present kit (POCTEM Influenza A/B) shortened the reaction time to 10 min from 15min. Compared with the POCTEM and a highly sensitive commercial kit, POCTEM S demonstrated an equivalent sensitivity with the use of vaccine strains of A and B type. Similarly with the POCTEM it reacted with 27 strains of all HA subtypes of influenza A viruses and all 5 strains of influenza B viruses in a type-specific manner, and exhibited no cross-reactivity with other 18 viruses of respiratory tract infection and 25 bacteria which mainly infect pharynx and upper respiratory tract. With clinical specimens collected from patients with influenza-like illness, POCTEM S showed a high concordance in both A and B type viruses with the POCTEM. The performance of POCTEM S was evaluated with clinical specimens in comparison with virus isolation. POCTEM S showed high sensitivity in detecting both A and B type viruses in both nasal aspirates and nasal swabs. It also exhibited high specificity in detecting A virus in nasal aspirates and B virus in nasal swabs, however, in the other cases the specificity was not so high. This slightly low specificity attributes to the presence of small cases of positive rapid test and negative virus isolation. Confirmation test of these inconsistent cases by RT-PCR demonstrated type-specific influenza virus genomes in most of the cases, suggesting that POCTEM S really has a high specificity in both type of viruses. Compared with the results of RT-PCR method the sensitivity in detecting A type virus was 85-90%, but POCTEM S showed a high specificity. These results suggest that the new stick-type kit (POCTEM S) works more rapidly and has an equivalent performance in the sensitivity and specificity in comparison with POCTEM and it will be useful for the rapid diagnosis of influenza in clinical settings.

Key Words Influenza, Rapid Detection Kit, Immunochromatography, Stick-type
