

Respiratory Syncytial Virus 迅速診断キットの評価

高橋 和郎*¹, 浜本 芳彦*², 浅井 定三郎*³, 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 浜本小児科

*³ あさいこどもクリニック

SUMMARY

スティック型の Respiratory syncytial virus (以下 RSV) 迅速診断キット (ポクテム S RSV, 以下ポクテム S) について、基礎的に、および臨床検体を用いて性能を評価した。その結果、代表的な RSV 株を用いたポクテム S の検出感度は $1 \sim 6 \times 10^4$ TCID₅₀/mL であり、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 A, B サブグループそれぞれ 5, 3 株すべてに反応し、これら以外の 22 種の呼吸器ウイルスや 25 種の細菌類とは交差反応性を認めず、RSV 特異的に反応した。RSV 感染が疑われた患者からの臨床検体 (鼻腔吸引液, 鼻腔ぬぐい液) を用いて、優良な性能を有する市販キットを対照に反応結果の相関性を比較検討したところ、双方の検体において両キットの結果に高い一致性を認めた。以上より、スティック型のポクテム S は現行市販キットと同等の特異性と感度を有し、臨床領域での有用性が期待される。

Key Words Respiratory Syncytial Virus, 迅速診断キット, イムノクロマトグラフィー

はじめに

Respiratory syncytial virus (以下 RSV) は、主に乳幼児や高齢者において、特に冬に流行する呼吸器感染症の原因微生物である^{1, 2)}。特に、幼弱な乳児、基礎疾患を有する乳児、呼吸器系の基礎疾患を有する患者、免疫抑制状態の患者などでは重症化しやすく、時に死に至る場合もある³⁾。また、施設内や院内感染の原因となる場合もあり、迅速で適切な治療と感染予防対策のためにも早期診断が重要である。RSV 感染症の診断には種々の方法が用いられてきたが、近年、イムノクロマト法による迅速な抗原検出キットが数種類開発され、操作が簡便で、判定も容易であるため、臨床において広く使用されてきた⁴⁻⁷⁾。今回、

シスメックス株式会社がスティック型の RSV 迅速診断キット (ポクテム S RSV) を開発したので、基礎的観点よりその性能を評価し、さらに、臨床検体を用いて、最も優良な性能を有する市販キットとの反応結果を比較し、その性能を評価したので報告する。

材料と方法

1. 検体

1) RSV 株

RSV 8 株を、Human cervical carcinoma cell (HeLa) に感染させ、培養フラスコから細胞が剥離し始め

た時点で上清を回収して、- 80 に保存しストックウイルス液を調製した。ストックウイルスの感染価は、ウイルス液の10ⁿ 希釈系列を作成し、この希釈液をHeLa細胞に接種し、この時、感染細胞の50%に細胞変性効果(CPE)が認められる希釈倍率を10ⁿ TCID₅₀/mLとした。

2) 交差反応性試験用ウイルスおよび細菌類

種々の呼吸器ウイルス株22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、呼吸器に感染する細菌類25株を各々の増殖培地で増殖させ調製した(表1)。

3) 臨床検体採取対象患者

2005年~2006年シーズンに浜本小児科およびあさいこどもクリニックの2施設に、かぜ様症状を呈して受診し、RSV感染の疑いがある患者を対象とした。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。

4) 検体採取方法

採取した臨床検体は鼻腔吸引液102検体、鼻腔拭い液105検体である。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。また、鼻腔吸引液の残りはNALC Bufferで10倍希釈したものを- 20 で保存し、RT-PCRに供した。鼻腔拭い液に関しては、同時に別の綿棒で採取した検体を生理食塩水で抽出し、これを- 20 で保存し、必要に応じてRT-PCR検査に供した。

表1. 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 Type1	<i>Candida albicans</i>
Adenovirus Type2	<i>Escherichia coli</i>
Adenovirus Type3	<i>Enterococcus faecalis</i>
Adenovirus Type4	<i>Haemophilus influenzae</i>
Adenovirus Type5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Adenovirus Type6	<i>Listeria monocytogenes</i>
Adenovirus Type7	<i>Moraxella catarrhalis</i>
Adenovirus Type19	<i>Proteus vulgaris</i>
Adenovirus Type21	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Adenovirus Type37	<i>Serratia marcescens</i>
Influenzavirus A/H1N1(A/New Caledonia/20/99)	<i>Staphylococcus aureus</i>
Influenzavirus A/H3N2(A/Panama/2007/99)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Influenzavirus B/ビクトリア系(B/Shandong/7/97)	<i>Streptococcus agalactiae</i>
Influenzavirus B/山形系(B/Shanghai/)	<i>Streptococcus group C</i>
Coxsackievirus Type A3	<i>Streptococcus group F</i>
Coxsackievirus Type A4	<i>Streptococcus group G</i>
Coxsackievirus Type B4	<i>Streptococcus mutans</i>
Coxsackievirus Type B5	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Echovirus Type4	<i>Streptococcus pyogenes (Group A)</i>
Echovirus Type7	<i>Streptococcus sanguis</i>
Echovirus Type16	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Echovirus Type19	<i>Mycoplasma fermentans</i>
	<i>Mycoplasma hominis</i>
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>
	<i>Bordetella pertussis</i>

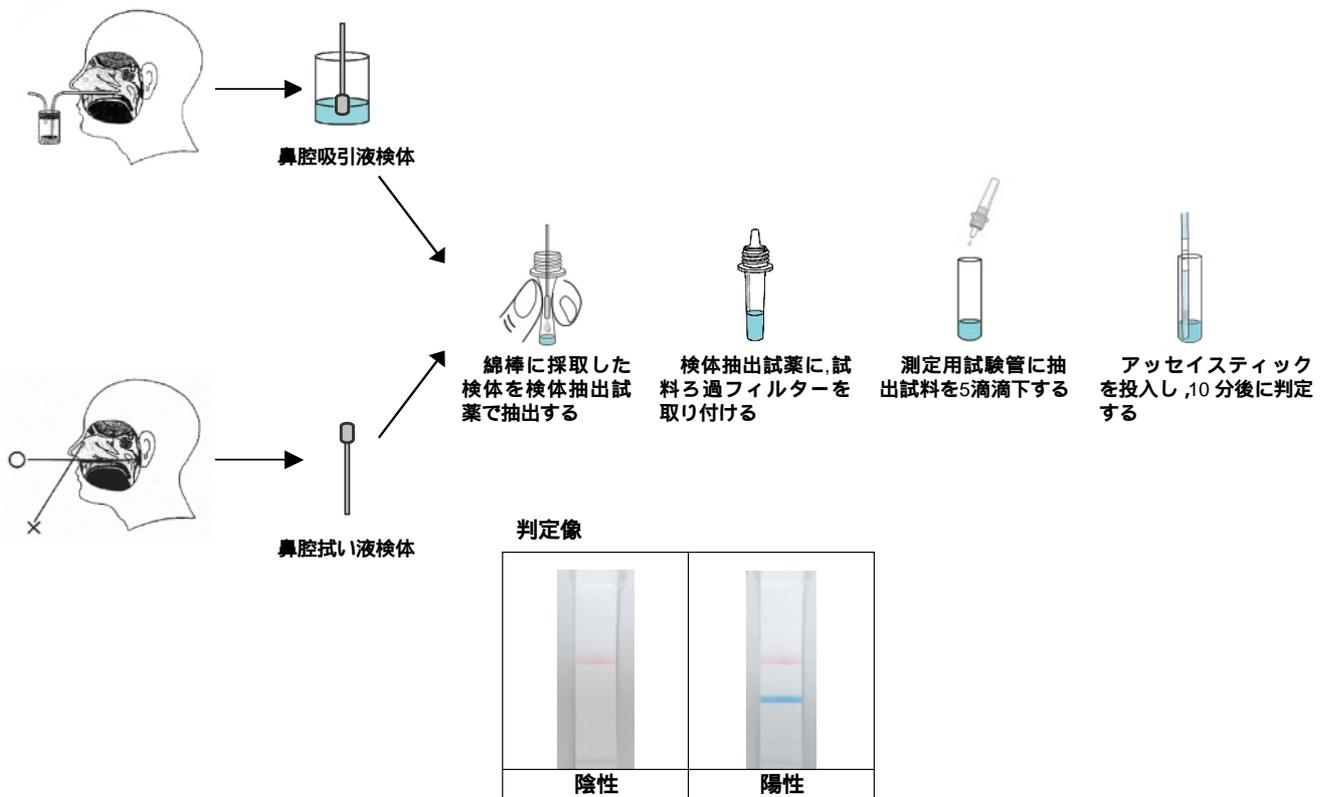


図1．ポクテムS RSVの標準測定方法

2．迅速診断方法

1) ポクテムS RSV

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。

2) 対照RSVキットによる検査

対照キットとして、市販の2キット(キットX, Y)を使用した。対照キットは、それぞれのキットの操作法に従って抗原検出検査を行った。

3．リアルタイムRT-PCR法によるRSV遺伝子の検出

ポクテムSと市販キットXとの相関性試験において不一致が認められた検体に関して、定法に従ってリアルタイムRT-PCR法を用いて確認を行った。プライマーには、RSVのLタンパクに特異的な配列を用いた。増幅産物の増加はリアルタイム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株を用いて検討した結果、Long株に

対して 1×10^{-1} TCID₅₀/mL, Wild Type株に対して 3.2×10^{-3} TCID₅₀/mLであった。

4．性能評価方法

1) 検出感度の決定

RSVサブグループAの2株およびサブグループBの1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と対照キット(X, Y)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。

2) 反応性の検討

RSV 8株のストックウイルス液を 6.3×10^4 TCID₅₀/mLに調製し、その150 μ LをポクテムSの検体抽出試薬0.8mLに加えてよく混和し、測定検体(抽出試料)とした。抽出試料を操作法に従ってポクテムSで測定した。

3) 呼吸器系ウイルスと細菌類に対する交差反応性試験

主に咽頭炎や上気道炎を起こすRSV以外の呼吸器系ウイルス22株, および細菌類25株の調整液をウイルスは 1×10^5 TCID₅₀/mL以上に, 細菌類は定量可能なものは 1×10^6 CFU/mL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, よく混和して測定検体(抽出試料)とした。抽出試料を操作法に従ってポクテムSで測定した。

4) 相関性試験

臨床検体(鼻腔吸引液102例, 鼻腔拭い液105例)をポクテムSおよび市販キットX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。

Long株およびA2株を被検ウイルスとして用いた場合, 検出限界はそれぞれ, 6.3×10^4 TCID₅₀/mLおよび 1×10^4 TCID₅₀/mLであった。また, サブグループBにおいては295株を被検ウイルスとして用いた場合, 検出限界は 8.0×10^3 TCID₅₀/mLであった。対照キットとの比較については, Long株, A2株, 295株との反応性において, 対照キットで最も高い検出感度であった市販キットXと同等の感度を示した。

2. 種々のRSV株に対する反応性の検討

種々のRSV 8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はサブグループAの5株, サブグループBの3株すべてを検出した。

3. 各種呼吸器系ウイルスと細菌類に対する交差反応性の検討

主に咽頭炎や上気道炎を起こすRSV以外の呼吸器系ウイルス22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。

結果

1. RSVに対するポクテムS RSVの検出感度の決定

ポクテムSおよび市販の2種のキットにおける3株のRSV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, サブグループAにおいては

表2. 各種迅速診断キットにおけるRSVに対する検出感度

+ : 陽性, - : 陰性, NT : 未検査

	RSV株	感染力価 (TCID ₅₀ /mL)	RSVキット	キットX	キットY
サブグループA	Long	1.3×10^5	NT	NT	+
		6.3×10^4	+	+	-
		3.1×10^4	-	-	-
		1.6×10^4	-	-	-
		7.8×10^3	-	-	-
	A2	8.0×10^4	+	NT	NT
		4.0×10^4	+	NT	+
		2.0×10^4	+	+	+
		1.0×10^4	+	+	+
		5.0×10^3	-	-	-
サブグループB	295*	6.4×10^4	+	+	+
		3.2×10^4	+	+	+
		1.6×10^4	+	+	+
		8.0×10^3	+	+	+
		4.0×10^3	-	-	-

*臨床分離株

表3 . RSV 株に対する反応性の試験成績

	株名	判定
サブグループA	Long	+
	A2	+
	2003-120922*	+
	2004-154*	+
	2004-164*	+
サブグループB	Wild Type	+
	9320	+
	295*	+

*臨床分離株

表4 . ポクテムSと市販キットXとの相関性

	鼻腔吸引液	鼻腔拭い液
陽性一致率	100% (50/50)	100% (51/51)
陰性一致率	100% (52/52)	98.1% (53/54)
全体一致率	100% (102/102)	99.0% (104/105)

4 . 相関性試験

臨床検体（鼻腔吸引液 102 例，鼻腔拭い液 105 例）に対するポクテムSと市販キットXとの相関を表4に示す。鼻腔吸引液を対象にした場合，ポクテムSと市販キットXの結果は完全に一致した。また，鼻腔拭い液に対しても，市販キットXの結果と高い一致率を示した。ポクテムSで陽性，市販キットで陰性であった不一致検体1例は，より検出感度の高いRT-PCR法により確認検査を行った結果，陽性であったことが確認された。

考 察

本評価研究において，新たに開発されたスティック型のイムノクロマト法によるRSV迅速診断キットの感度，特異性およびすでに市販されているキットとの性能比較について評価した。検出感度については，代表的なRSV株であるLong，A2株（サブグループA）と295株（サブグループB）に対して，共におよそ $1 \sim 6 \times 10^4$ TCID₅₀/mLであった。また，市販のキットの中で最も感度が高いと評されるキットX，Yと同等の感度を示した。特異性に関しては，サブグループA，Bの臨床分離株を含む8株すべてが検出可能であり（表3），RSV以外の主に咽頭炎や上気道炎

を起こす呼吸器系ウイルスや細菌類（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（表4）。ゆえに，ポクテムSの感度と特異性は市販の優良な性能をもつキットのそれと同等であると結論づけられる。

臨床検体を用いたポクテムSと市販キットXとの性能評価比較試験では，鼻腔吸引液において，結果は100%の一致を示した。また，鼻腔拭い液の場合も非常に高い一致率であった。ポクテムSで陽性，対照キットで陰性であった不一致検体1例は，RT-PCR法では陽性であり，偽陽性反応ではないことが確認された。従って，臨床検体の検査においても，ポクテムSは優良な性能をもつ市販キットXと同等の性能を有すると考えられる。

以上より，今回評価したスティック型のRSV迅速診断キットの判定時間は10分と比較的短時間で判定可能であり，現行市販キットと同等の特異性と感度を有し，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) Ralph D. Feigin, et al.: Textbook of Pediatric Infectious Diseases, W B Saunders Co, USA, 2003.
- 2) Hall CB.: Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. N Engl J Med, 344 : 1917 ~ 1928, 2001.
- 3) Falsey AR., Walsh EE.: Respiratory Syncytial Virus Infection in Adults. Clinical Microbiol. Rev., 13 : 371 ~ 384, 2000.
- 4) 七種美和子, 他 : イムノクロマトグラフィーを用いた Respiratory syncytial virus 診断キットの検討. 感染症学雑誌, 77 : 443 ~ 450, 2003.
- 5) 林 国樹, 他 : 新たに開発された respiratory syncytial virus 診断キットの性能比較. 感染症学雑誌, 79 : 276 ~ 282, 2005 .
- 6) Ohm-Smith MJ., et al.: Evaluation of the Binax NOW, BD Directigen, and BD Directigen EZ Assay for Detection of Respiratory Syncytial Virus. J Clin. Microbiol., 42 : 2996 ~ 2999, 2004.
- 7) Kuroiwa Y., et al.: Comparison of an Immunochromatography Test with Multiplex Reverse Transcription-PCR for Rapid Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infections. J Clin. Microbiol., 42 : 4812 ~ 4814, 2004.

Evaluation of the New Rapid Respiratory Syncytial Virus Detection Kit

Kazuo TAKAHASHI^{*1}, Yoshihiko HAMAMOTO^{*2},
Sadasaburou ASAI^{*3} 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} Hamamoto Children's Clinic

^{*3} Asai Children's Clinic

SUMMARY

We evaluated the ability of the new stick-type rapid respiratory syncytial virus (RSV) detection kit (POCTEM S RSV, POCTEM S) from a basic and clinical point of view. Compared with the highly sensitive commercial kits, POCTEM S using representative strains demonstrated an equivalent sensitivity ($1\sim 6 \times 10^4$ TCID₅₀/mL). It reacted with all 5 strains of subgroup A and 3 strains of subgroup B, whereas, it exhibited no cross-reactivity with other 22 viruses of respiratory tract infection and 24 bacteria and 1 fungus which mainly infect pharynx and upper respiratory tract. With clinical specimens (nasal aspirates and nasal swabs) collected from patients with RSV-like illness, POCTEM S showed a high concordance with the commercial kit. These results suggest that the new stick-type RSV rapid detection kit has an equivalent performance in the sensitivity and specificity in comparison with the most potent commercial kit and it will be useful for the rapid diagnosis of RSV infection in clinical settings.

Key Words Respiratory Syncytial Virus, Rapid Detection Kit, Immunochromatography