

ニワトリ検体が測定可能な 鳥インフルエンザウイルス抗原迅速検出キット 「ポクテム トリインフルエンザ」の基本性能

齊藤 紀幸*1, 長谷川 武宏*2, 一口 毅*2

*1 シスメックス株式会社 研究開発企画本部：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒 651-2271)

*2 シスメックス株式会社 診断薬開発本部

SUMMARY

ニワトリ検体を測定対象とした動物用体外診断用医薬品「ポクテム トリインフルエンザ」(以下、本キット；シスメックス社)は、ヒト用のインフルエンザ迅速診断キットでのニワトリ検体測定時に発生した不具合を試薬組成変更により改善したキットである。高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1)、または低病原性鳥インフルエンザウイルス(H9N2)を感染させたニワトリから経日的に採取した検体を本キットとウイルス分離検査で測定した結果、どちらのウイルスにおいても、ウイルス分離検査で陽性と判定された時期と同じ時期から本キットでも陽性と判定できた。健常ニワトリ 301 羽から採取した気管拭い液と総排泄腔拭い液を測定した結果は、ウイルス分離検査および本キットで全検体陰性であった。本キットの最小検出感度は、 $3.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。本キットは、鳥インフルエンザに類似した疾病の原因病原体 11 株には反応せず、H1～H15 亜型 A 型インフルエンザウイルス 20 株に反応性を示し、インフルエンザウイルスに特異的であった。以上より、本キットは、操作の簡便性や迅速性という特徴を有した、ニワトリ検体中のインフルエンザウイルス抗原検出が可能な試薬であり、鳥インフルエンザの感染拡大防止などの防疫措置に迅速に対応するうえで有用なキットであると考えられる。

Key Words 鳥インフルエンザ, 迅速診断キット, イムノクロマトグラフィー, ポクテム

はじめに

インフルエンザウイルスには、A 型、B 型、C 型の 3 種があり、中でも A 型はヒトをはじめブタ、ウマ、アヒル、カモ、ニワトリなど多岐に亘る動物から分離され、人畜共通感染症として認識されている。

ニワトリに感染するインフルエンザウイルスは A 型インフルエンザウイルスのみであり、全身でウイルスの増殖を引起し短期間で死に至らしめることがある高病原性鳥インフルエンザウイルスと、産卵率の低下や下痢、神経症状および腫れなどの症状を引き起こす低病原性鳥インフルエンザウイルスが存在する。

特に、高病原性鳥インフルエンザウイルスである H5 型インフルエンザウイルスは、1997 年の香港での集団発生をはじめ、2003 年以降にベトナム、タイ、インドネシアなどのアジア諸国から中東、ヨーロッパにかけて世界各地で集団発生を引き起こしている。本邦においても 2004 年に山口、京都、2007 年に宮崎で発生しており、特に 2004 年の集団発生では養鶏業者に大きな被害をもたらした、社会問題にもなった。

ニワトリのインフルエンザウイルスの検査方法には、現在、気管あるいは総排泄腔(クロアカ)拭い

液をサンプルとする発育鶏卵を用いたウイルス分離検査法や核酸増幅法が一般的であり、特にウイルス分離検査法は「高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」では確定診断のための検査方法とされている¹⁾。これらの検査方法は感度の高い検査方法であるが、検査を行うために特別な設備が必要であり、また、時間もかかる。高病原性鳥インフルエンザウイルスによる平飼い養鶏場での感染例では、発生確認後4～5日の間に100%の致死率を示すこと²⁾が報告されており、被害を最小限に抑えるためにも、現場で迅速に鳥インフルエンザウイルス感染を検査できる簡易キットは有用と考えられる。「高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」にはヒト用として販売されている簡易キットを補助的検査として使用すること¹⁾が記載されており、また、各地方自治体で作成されている高病原性鳥インフルエンザ対策指針において、簡易キットでの検査を診断フローに入れている自治体もある³⁾。実際に2004年の京都、2007年の宮崎での発生例において、死亡鶏を簡易キットで検査して陽性となったこと^{4,5)}から鳥インフルエンザの疑いがあるとして鶏肉、鶏卵などの移動自粛による感染拡大防止策がとられた。このように鳥インフルエンザウイルスの検出において、簡易キットの有用性が実

証されようとしている。その反面ニワトリ検体に対する性能が保証された簡易キットが国内には未だなく、現場ではヒト検体を測定するためのインフルエンザ迅速診断キットを代用している。一部のヒト用のインフルエンザ迅速診断キットについてニワトリ検体を測定したときの性能は報告されているが^{6,7)}、キットとしてニワトリ検体に対する性能は保証されていない。

今回、我々はヒト用インフルエンザ迅速診断キット「ポクテム インフルエンザA/B」(以下、ヒト用キット；シスメックス社)で培ってきた技術をベースに、ニワトリ検体が測定できるように改良し、動物用体外診断用医薬品としての製造販売承認を取得した「ポクテム トリインフルエンザ」(以下、本キット；シスメックス社)を開発した。本稿ではその特徴と性能を報告する。

材料と方法

1. 本キットの測定方法

本キットの標準操作法に従って測定した(図1)。ニワトリから気管拭い液、または糞排泄腔拭い液を採取した滅菌綿棒を、直接検体抽出試薬に入れて綿棒についた検体を絞り出し抽出試料とした。抽出試

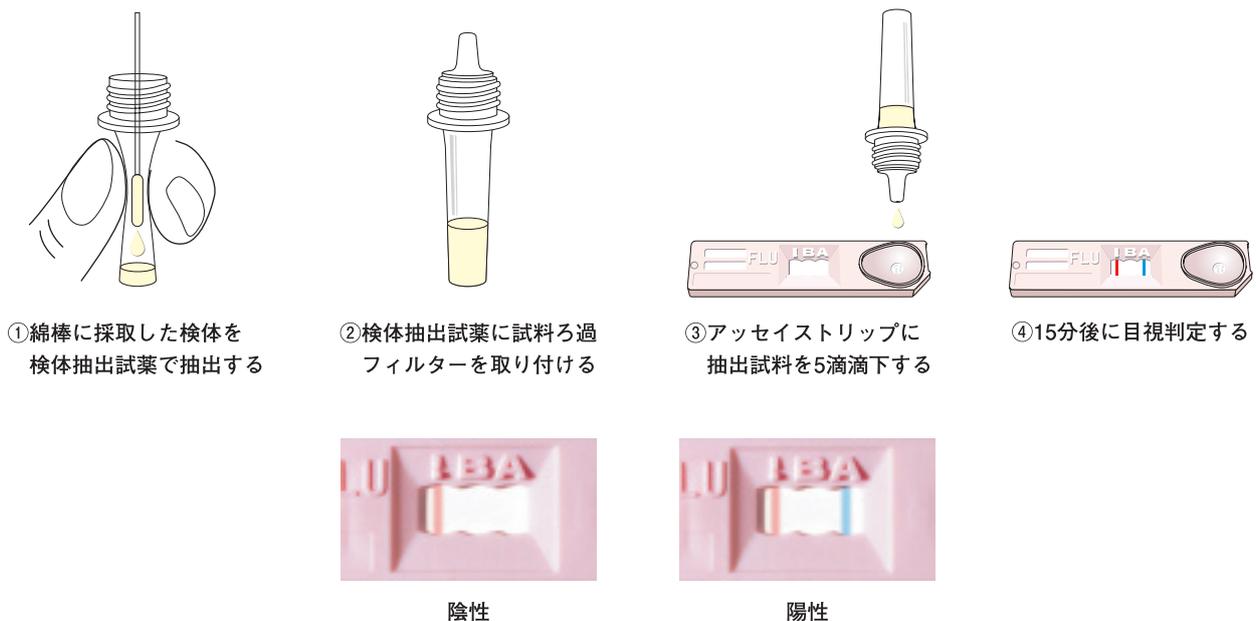


図1. ポクテム トリインフルエンザの標準操作法

料をキット付属の試料ろ過フィルターでろ過しながらアッセイストリップに5滴(約200 μ L)滴下し、抽出試料滴下15分後に判定を行った。判定は判定位置に青色のラインとコントロール位置に赤色のラインが出れば陽性、判定位置にラインが出ずコントロール位置に赤色のラインが出れば陰性とした。

培養したウイルスや細菌類の測定では、それら溶液150 μ Lを検体抽出試薬に入れて混合した混合液200 μ Lをアッセイストリップに滴下し、混合液滴下15分後に判定を行った。

2. ヒト用キットの測定方法

シスメックス社で製造販売しているキット(承認番号:21400AMZ00639000)を使用した。ニワトリの総排泄腔拭い液の測定では、付属の滅菌綿棒で検体を採取し、その後の操作は添付文書に記載されている鼻腔拭い液の測定方法に従って行った。

3. 培養細胞を用いたウイルス分離検査

滅菌綿棒で採取した検体をMEM輸送培地1mLに抽出し、その0.2mLをMDCK細胞に接種し、4日間の培養にて細胞変性の有無を確認した。培養後の確認試験はHA試験を実施した。また、ウイルス数の算出はMDCK細胞に対するTCID₅₀で算出した。

4. 発育鶏卵を用いたウイルス分離検査

滅菌綿棒で採取した気管拭い液、または総排泄腔拭い液を滅菌生理食塩水1mLに希釈し、これを検体とした。37℃、9日間前培養した発育鶏卵に検体200 μ Lを接種した。48時間35℃で培養し、4℃で一昼夜冷却した後、しょう尿膜液を採取した。採取したしょう尿膜液は再度9日間前培養した発育鶏卵に接種した。48時間35℃で培養し、4℃で一昼夜冷却した後、しょう尿膜液を採取した。このしょう尿膜液にインフルエンザウイルスが存在するかどうかをHA試験で調べた。本法は「高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針」に記載されているウイルス分離検査¹⁾と同じ方法である。本検査はシスメックス株式会社研究開発センターで実施した。

5. HA試験

国立感染症研究所から発行されている「病原体検出マニュアル」に記載されている方法⁸⁾に従って試験を実施した。

6. ヒト用キットでのニワトリ検体の測定

ヒト用キットでニワトリ検体の測定が可能かどうかを検討するため、4週齢SPF白色レグホン種に低病原性鳥インフルエンザウイルスA/Chicken/Y-55/01(H9N2)10^{8.8}EID₅₀/羽を経鼻接種し、ウイルス接種後から毎日総排泄腔拭い液を採取し、ヒト用キットで測定を行った。本実験は北海道大学大学院獣医学研究科BSL-3動物実験施設にて実施した。また、総排泄腔拭い液を測定したときのコントロールラインの発色について確認するため、50日齢レイヤーから総排泄腔拭い液検体をキット付属の滅菌綿棒で採取して測定を行った。

7. 本キットでの鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリ検体の測定

4週齢SPF白色レグホン種に高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Chicken/Yamaguchi/7/04(H5N1)10^{4.0}EID₅₀/羽を経鼻接種した。ウイルス接種後6日間まで毎日、死亡または安楽殺したニワトリから気管拭い液と総排泄腔拭い液を採取し、本キットでの測定およびウイルス分離検査に使用した。また、別群にて低病原性鳥インフルエンザウイルスA/Chicken/Y-55/01(H9N2)10^{8.8}EID₅₀/羽を経鼻接種し、ウイルス接種後8日間まで毎日、安楽殺したニワトリから気管拭い液と総排泄腔拭い液を採取し、本キットでの測定および発育鶏卵を用いたウイルス分離検査に使用した。本実験は北海道大学大学院獣医学研究科BSL-3動物実験施設にて実施した。

8. 鳥類から分離された各種亜型A型インフルエンザウイルス株との反応性

表1に示す鳥類から分離されたH1～H15亜型のA型インフルエンザウイルス株(北海道大学大学院獣医学研究科ウイルス病態部門保有株)20株について、本キットで測定した。

9. 鳥インフルエンザに類似した疾病の原因病原体との交差反応性

表2に示す鳥インフルエンザ類似疾病の原因病原体6種11株を本キットで測定した。ニューカッスル病ウイルス (Newcastle disease virus) B1株と鶏伝染性気管支炎ウイルス (Infectious bronchitis virus) KU株は株式会社微生物研究所製の生ワク

チン溶液を使用し、他の病原体は北海道大学大学院獣医学研究科ウイルス病態部門保有株を使用した。

10. ウイルス分離検査との最小検出感度の比較

A/Kitakyusyu/159/93の2倍希釈系列を検体として本キットでの測定とウイルス分離検査を行った。参考としてヒト用キットでも同じ2倍希釈系列の測定を行った。

表1. H1～H15亜型A型インフルエンザウイルスとの反応性

株名	亜型	濃度	判定
Duck/Tottori/723/80	H1N1	5.1×10 ⁻¹ HA 価 /mL	+
Duck/Hokkaido/17/01	H2N2	1.0×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Duck/Mongolia/4/03	H3N8	5.1×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Duck/Czechoslovakia/1/56	H4N6	2.1×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Chicken/Yamaguchi/7/04	H5N1	1.0×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Chicken/Suphanburi/1/04	H5N1	1.0×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Crow/Osaka/102/04	H5N1	1.3×10 ⁻¹ HA 価 /mL	+
Duck/Pennsylvania/10128/83	H5N2	2.6×10 ⁻¹ HA 価 /mL	+
Turkey/Massachusetts/3740/65	H6N2	1.0×10 ¹ HA 価 /mL	+
Turkey/England/73	H7N3	1.0×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Seal/Massachusetts/1/80	H7N7	2.0×10 ¹ HA 価 /mL	+
Turkey/Ontario/67	H8N4	2.6×10 ¹ HA 価 /mL	+
Turkey/Wisconsin/66	H9N2	1.0×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Chicken/aq-Y-55/01	H9N2	2.0×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Chicken/Germany/N/49	H10N7	4.1×10 ⁰ HA 価 /mL	+
Duck/England/56	H11N6	1.0×10 ¹ HA 価 /mL	+
Duck/Alberta/60/76	H12N5	1.0×10 ¹ HA 価 /mL	+
Gull/Maryland/704/77	H13N6	1.0×10 ² HA 価 /mL	+
Mallard/Astrakhan/263/82	H14N5	2.0×10 ¹ HA 価 /mL	+
Duck/Australia/341/83	H15N8	5.1×10 ⁰ HA 価 /mL	+

表2. 鳥インフルエンザ類似疾病病原体との交差反応性

病原体	株名	濃度	判定
Newcastle disease virus	NDV/duck/Mongolia/705/02	512HA 価 /mL	-
	B1	10 ⁸ EID ₅₀ /mL	-
Avian paramyxovirus (血清型2) (血清型4) (血清型5) (血清型7)	Chicken/California/Yucaipa/56	128HA 価 /mL	-
	Duck/Mississippi/320/75	1024HA 価 /mL	-
	Budgerigar/Kunitachi/74	128HA 価 /mL	-
	Dove/Tennessee/4/75	64HA 価 /mL	-
Infectious bronchitis virus	Beaudett-42	10 ^{4.8} TCID ₅₀ *1/mL	-
	KU	10 ⁵ EID ₅₀ /mL	-
Infectious laryngotracheitis virus	NS175	10 ^{5.5} TCID ₅₀ *1/mL	-
<i>Haemophilusparagallinarum</i>	HK-1	10 ⁷ CFU/mL	-
<i>Mycoplasmagallisepticum</i>	C5PT	10 ⁷ CFU/mL	-

*1 初代ニワトリ腎臓細胞を用いて測定を行った。

11. 農場で健常ニワトリから採取した検体を用いての特異性評価

本キットの特異性を検討するため、国内の2ヶ所の農場で計301羽の50日齢レイヤーから気管拭い液と総排泄腔拭い液を採取し、本キットでの測定およびウイルス分離検査を行った。

結果

1. ヒト用キットでのニワトリ検体の測定

低病原性鳥インフルエンザウイルス A/Chicken/Y-55/01 (H9N2) を感染させたニワトリから経日的に採取した総排泄腔拭い液をヒト用キットで測定した結果を表3に示す。ウイルス分離検査は全検体陰性であったが、ヒト用キットでは個体 No.3-2 で感染後1日目と3日目の検体が陽性となった。これらの検体には緑色の下痢便が含まれていた。また、健常ニワトリから採取した総排泄腔拭い液をヒト用キットで測定した結果を表4に示す。総排泄腔拭い液6検体中3検体でコントロールラインが発色しなかった。

表3. ヒト用キットでの低病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリの総排泄腔拭い液の測定

感染後の経過日数	個体 No.			
	3-1	3-2	3-3	3-4
0	-/*	-/-	-/-	-/-
1	-/-	+/-	-/-	-/-
2	-/-	-/-	-/-	-/-
3	-/-	+/-	-/-	-/-

*ヒト用キット/ウイルス分離試験

表4. 総排泄腔拭い液で見られたコントロールライン発色阻害

検体番号	コントロールラインの発色
A	+
B	+
C	+
D	-
E	-
F	-

2. 本キットでの鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリ検体の測定

高病原性鳥インフルエンザウイルス A/Chicken/Yamaguchi/7/04 (H5N1) を感染させたニワトリ検体の測定結果を表5に示す。ウイルス分離検査で陰性となった気管拭い液4例および総排泄腔拭い液4例とも、本キットでは陰性となり、非特異的な反応は確認されなかった。また、陽性と判定される時期については、ウイルス分離検査では感染後2日目から陽性となり、本キットでも同じく感染後2日目から陽性となった。総排泄腔拭い液の1検体を除いて、本キットとウイルス分離検査の結果は一致した。本キットとウイルス分離検査の結果が不一致であった総排泄腔拭い液は、感染後5日目のニワトリ15-3から採取された検体であり、ウイルス分離検査で陽性、本キットでは陰性であった。この検体のウイルス量を測定した結果、 $2.9 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。この検体以外のウイルス分離検査陽性検体のウイルス量は $6.1 \sim 7.9 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。

低病原性鳥インフルエンザウイルス A/Chicken/Y-55/01 (H9N2) を感染させたニワトリ検体の測定結果を表6に示す。ウイルス分離検査および本キットとも気管拭い液からのみウイルスを検出でき、総排泄腔拭い液からはウイルスを検出できなかった。ウイルス分離検査で陰性となった気管拭い液8例および総排泄腔拭い液16例のすべてで本キットは陰性と判定され、非特異的な反応は確認されなかった。また、陽性と判定される時期については、ウイルス分離検査では感染後1日目から気管拭い液でウイルスを検出することができ、その後4日目までウイルスを検出することができたが、5日目以降はウイルスを検出できなかった。本キットでの測定結果はウイルス分離検査とすべて一致し、ウイルス分離検査で陽性であった気管拭い液8例はすべて本キットでも陽性と判定された。ウイルス分離検査および本キットで陽性となった検体中のウイルス量は $3.4 \sim 3.8 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。

なお、コントロールラインの発色については、気管拭い液および総排泄腔拭い液とも全検体正常に発色が認められた。

表5. 高病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリの本キットとウイルス分離検査での測定結果

感染後の経過日数	個体 No.		気管拭い液	総排泄腔拭い液
1	13-1	安楽死	-/*	-/-
	13-2	安楽死	-/-	-/-
2	13-3	安楽死	-/-	-/-
	14-4	死亡	+/8.1	+/7.9
3	13-4	安楽死	-/-	-/-
	15-1	死亡	+/7.9	+/7.6
4	14-1	死亡	+/7.4	+/7.1
	14-2	死亡	+/7.6	+/7.4
	14-3	死亡	+/8.1	+/7.8
5	15-2	安楽死	+/7.1	+/6.1
	15-3	安楽死	+/5.6	-/2.9
6	15-4	死亡	+/7.4	+/7.1

*本キット / ウイルス分離試験 (log₁₀TCID₅₀/mL)

表6. 低病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリの本キットとウイルス分離検査での測定結果

感染後の経過日数	個体 No.		気管拭い液	総排泄腔拭い液
1	9-1	安楽死	+/3.6*	-/-
	9-2	安楽死	+/3.6	-/-
2	9-3	安楽死	+/3.8	-/-
	9-4	安楽死	+/3.8	-/-
3	10-1	安楽死	+/3.4	-/-
	10-2	安楽死	+/3.4	-/-
4	10-3	安楽死	+/3.4	-/-
	10-4	安楽死	+/3.4	-/-
5	11-1	安楽死	-/-	-/-
	11-2	安楽死	-/-	-/-
6	11-3	安楽死	-/-	-/-
	11-4	安楽死	-/-	-/-
7	12-1	安楽死	-/-	-/-
	12-2	安楽死	-/-	-/-
8	12-3	安楽死	-/-	-/-
	12-4	安楽死	-/-	-/-

*本キット / ウイルス分離試験 (log₁₀TCID₅₀/mL)

3. A型インフルエンザウイルス各種亜型との反応性

H1～H15亜型の鳥類から分離されたA型インフルエンザウイルスに対する反応性を検討した結果を表1に示す。本キットでは、試験したH1～H15亜型20株すべてで陽性と判定された。

4. 鳥インフルエンザに類似した疾病の原因病原体との交差反応性

本キットの交差反応性について、鳥インフルエンザと類似した症状を示す疾病の原因病原体11株を用いて検討を行った結果を表2に示す。今回測定した原因病原体11株について、本キットではすべて陰性であり、交差反応性は認められなかった。

5. ウイルス分離検査との最小検出感度の比較

本キットの最小検出感度について、発育鶏卵を用いたウイルス分離検査と比較した結果を表7に示す。A/Kitakyusyu/159/93を被検ウイルスとしたとき、本

キットの最小検出感度は3.3log₁₀TCID₅₀/mLであった。一方、発育鶏卵を用いたウイルス分離検査の最小検出感度は0.2log₁₀TCID₅₀/mLであり、その差は約1,300倍であった。参考として、同じ被検ウイルスの希釈系列を用いてヒト用キットの最小検出感度を検討した結果、本キットと同じ3.3log₁₀TCID₅₀/mLであった。

6. 農場で健常ニワトリから採取した検体を用いての特異性評価

国内2ヶ所の農場で、臨床的に健常と判断された白色レイヤー計301羽から採取した気管拭い液と総排泄腔拭い液を本キットとウイルス分離検査で測定を行った結果を表8に示す。気管拭い液および総排泄腔拭い液とも全検体ウイルス分離検査で陰性であり、本キットでも全検体陰性であった。

なお、コントロールラインの発色は気管拭い液および総排泄腔拭い液とも全検体正常に発色が認められた。

表7. 本キットとウイルス分離検査との最小検出感度の比較

希釈 倍率	ウイルス濃度		本キット	ウイルス分離 検査	(参考) ヒト用キット
	(log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	(TCID ₅₀ /mL)			
×1	4.8	63096	+	n.t.	+
×2	4.5	31623	+	n.t.	+
×4	4.2	15849	+	n.t.	+
×8	3.9	7943	+	n.t.	+
×16	3.6	3981	+	n.t.	+
×32	3.3	1995	+	n.t.	+
×64	3.0	1000	-	n.t.	-
×128	2.7	501	-	n.t.	-
...
×10,000	0.80	6.30	n.t.	+	n.t.
×20,000	0.51	3.20	n.t.	+	n.t.
×40,000	0.20	1.60	n.t.	+	n.t.
×80,000	-0.10	0.79	n.t.	-	n.t.
×160,000	-0.41	0.39	n.t.	-	n.t.

表8. 健康ニワトリ検体の測定

農場 A

気管拭い液

		ウイルス分離検査		
		陽 性	陰 性	
本 キ ット	陽 性	0	0	0
	陰 性	0	200	200
		0	200	200

総排泄腔拭い液

		ウイルス分離検査		
		陽 性	陰 性	
本 キ ット	陽 性	0	0	0
	陰 性	0	200	200
		0	200	200

農場 B

気管拭い液

		ウイルス分離検査		
		陽 性	陰 性	
本 キ ット	陽 性	0	0	0
	陰 性	0	101	101
		0	101	101

総排泄腔拭い液

		ウイルス分離検査		
		陽 性	陰 性	
本 キ ット	陽 性	0	0	0
	陰 性	0	101	101
		0	101	101

考 察

今回、ニワトリ検体に適用できるインフルエンザウイルス抗原迅速検出キットの開発にあたり、まずヒト用キットでのニワトリ検体測定の可能性を検討した。その結果、ヒト用キットで総排泄腔拭い液を測定した場合には、非特異反応やコントロールライン

の発色不良が発生することが確認された。ヒト用キットは、ヒトの鼻咽頭検体を測定するうえで最適な試薬組成になっているため、物性や成分が異なるニワトリ検体での性能は全く保証されていない。ニワトリ検体で発生した非特異反応の一因としては、判定ライン上に非特異的に吸着する検体成分の存在が考えられた。この非特異反応を回避するため本キット

では判定ラインに検体成分が吸着しないように試薬組成を改良した。その結果、表5、6および8に示すように、本キットではニワトリの総排泄腔拭い液および気管拭い液を測定した際の特異反応を回避することができた。また、表4に示すように、ヒト用キットでのニワトリの総排泄腔拭い液の測定においては、コントロールラインの発色不良も発生した。これはヒト用キットのコントロールライン反応系がアビジン-ビオチン反応であることに起因する。ヒトの鼻咽頭検体と異なりニワトリの総排泄腔拭い液には腸内細菌や卵成分が含まれる。腸内細菌はビオチンを産生し、卵成分にはアビジンが大量に含まれている。これらの成分によってアビジン-ビオチン反応は阻害され、コントロールラインの発色阻害が起こると考えられる。本キットではこのような阻害が起こらないようにするため、反応系を抗原-抗体反応に変更し、抗原にはニワトリ検体中に存在しないと考えられる物質ジニトロフェノールを用いた。この改良によって本キットでは、ニワトリ検体を測定したときもコントロールラインが正常に発色することが確認できた(表5、6、8)。図2にニワトリ検体に適用可能な本キットの改良点を示す。

ヒト用のインフルエンザ迅速診断キットは操作の簡便性や迅速性に優れたキットであり、その有用性から現在外来診療で広く使用されている。本キットも、その有用性を継承しており、測定に特別な技術や装置は必要なく操作ステップ数が少ないという簡便性や、測定開始から15分で結果判定ができるという迅速性を有している(図1)。ニワトリでのインフルエンザウイルス感染実験において、表5と6に示すように、高病原性鳥インフルエンザウイルス感染群と、低病原性鳥インフルエンザウイルス感染群両方において、ウイルス分離検査で検出できた同じ時期から本キットでもインフルエンザウイルスを検出することができた。この結果から、ウイルス分離検査と本キットを併せて検査することで、ウイルス分離検査の結果を待たずとも、本キットの検査結果に基づき、より早期に感染拡大防止措置をとることができると考える。

表5に示す高病原性鳥インフルエンザウイルスでの感染実験で、ウイルス分離検査では陽性であったが、本キットでは陰性となった例が総排泄腔拭い液において1例あり、この検体のウイルス量を調べると $2.9 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。本キットの最小検出

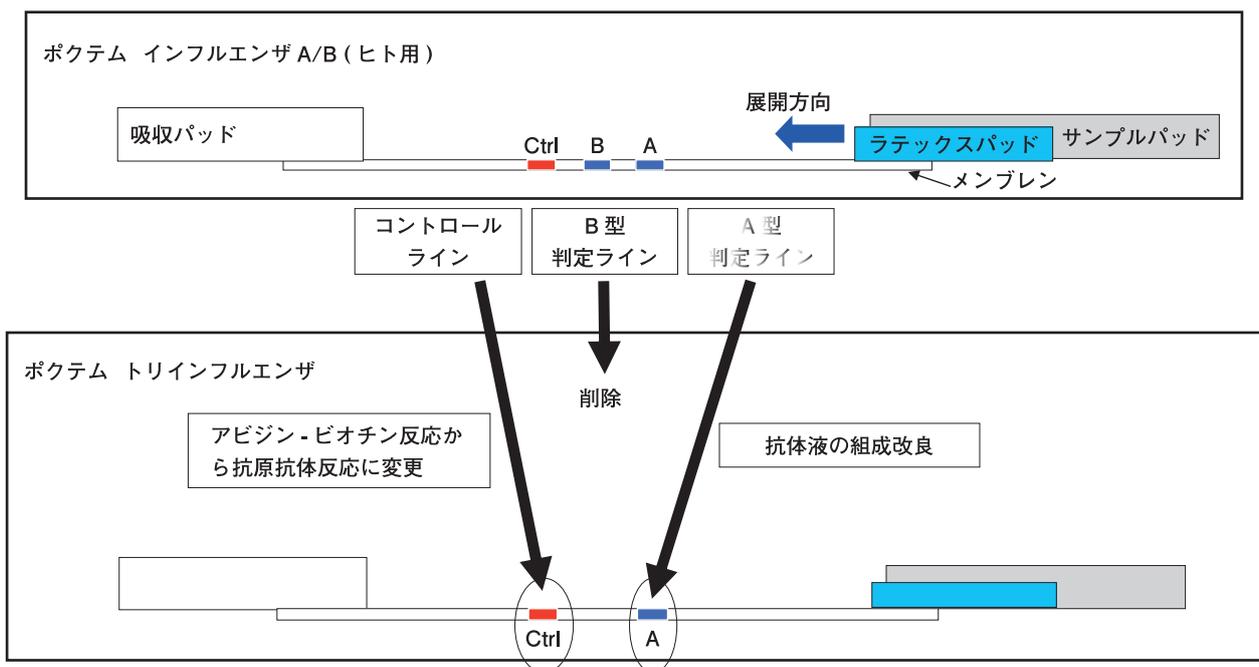


図2. ポクテム トリインフルエンザの改良点

感度は、表7に示すように、A/Kitakyusyu/159/93では $3.3\log_{10}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ であった。このことから、偽陰性の原因は検体中のウイルス量が本キットの最小検出感度以下であったためと考えられた。本キットの最小検出感度はヒト用のインフルエンザ迅速診断キットと同等であるが、鳥インフルエンザウイルスを検出するうえで標準法になっている発育鶏卵を用いたウイルス分離検査と比べると約1,300倍低い。ウイルス分離検査は検体中のウイルスを増殖させることにより検出するのに対して、本キットは検体中のウイルス抗原を直接検出することから、最小検出感度に差が生じる。よって、本キットを使用するときはこの点をよく理解したうえで、検体中のウイルス量が検出感度以下の場合は陰性と判定されることに留意する必要がある。

今回、検体として気管拭い液と総排泄腔拭い液を使用した。高病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリでは、表5に示すように、気管拭い液および総排泄腔拭い液の両検体種からウイルスを検出することができた。しかし、低病原性鳥インフルエンザウイルス感染ニワトリからは、表6に示すように、ウイルス分離検査および本キットとも気管拭い液からしかウイルスは検出できなかった。この差は両ウイルスでの感染様式の差によるものであり、高病原性鳥インフルエンザウイルスはウイルス感染が全身に広がるのに対して、低病原性鳥インフルエンザウイルスの感染は気管局所的であることに起因しているものと考えられる⁹⁾。

本キットは、鳥インフルエンザに類似した疾病の原因病原体には反応せず(表2)、インフルエンザウイルスについてはH1～H15亜型の株に反応する(表1)ことから、インフルエンザウイルスに特異的に反応するものである。ただし、本キットで陽性となった場合、そのニワトリがインフルエンザウイルスに感染していることが示唆されるが、その亜型までは特定できないことに留意する必要がある。よって、本キットを使用した後は、必ず臨床所見やウイルス分離検査などの高感度かつ亜型を特定できる検査を実施することが必要である。

近年、鳥インフルエンザウイルスに関する研究

においても、ヒト用のインフルエンザ迅速診断キットを使用するケースが散見され、鳥インフルエンザの補助検査としてその実績も報告されている^{4,5)}。今回、我々がニワトリ用として開発した「ポクテム トリインフルエンザ」は、操作の簡便性や迅速性という面で非常に有用であり、ニワトリ検体中のインフルエンザウイルス抗原検出が可能な試薬であることが確認できた。本キットは、日本で初めてニワトリ用のインフルエンザウイルス抗原迅速検出キットとして農林水産省から動物用体外診断用医薬品としての承認を受けたことから、鳥インフルエンザの感染拡大防止などの防疫措置に迅速に対応するうえで有用なキットであると考えられる。

参考文献

- 1) 農林水産大臣公表. 高病原性鳥インフルエンザに関する特定家畜伝染病防疫指針. 2004; 1-20.
- 2) Swayne DE. 鳥インフルエンザの現況, 米国の補償システムの成り立ちと現況. 養鶏の友. 2002; 8: 40-45.
- 3) 大阪府環境農林水産部. 大阪府高病原性鳥インフルエンザ防疫対策要領. 第二版. 2008; 10.
- 4) 高病原性鳥インフルエンザ感染経路究明チーム. 高病原性鳥インフルエンザの感染経路について. 2004; 7.
- 5) 高病原性鳥インフルエンザ感染経路究明チーム. 2007年に発生した高病原性鳥インフルエンザの感染経路について. 2007; 6-7.
- 6) Ryan-Poirier KA et al. Application of Directigen FLU-A for the detection of influenza A virus in human and nonhuman specimens. J. Clin. Microbiol. 1992; 30 (5): 1072-1075.
- 7) Davison S, Ziegler AF, Eckroade RJ. Comparison of an antigen-capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from field samples. Avian Dis. 1998; 42 (4): 791-795.
- 8) 小田切孝人 他. 病原体検出マニュアル. 東京: 国立感染症研究所; 2003. 853-895.
- 9) Gui-Rong Bai et al. Evaluation of the ESPLINE® INFLUENZA A&B-N kit for the diagnosis of avian and swine influenza. Microbiol. Immunol. 2005; 49 (12): 1063-1067.

Basic Performance of "POCTEM Avian Influenza" Rapid Detection Kit of Avian Influenza Viral Antigen in Chicken Specimens

Noriyuki SAITOU^{*1}, Takehiro HASEGAWA^{*2} and Takeshi IMOARAI^{*2}

^{*1}R&D Strategic Planning, Sysmex Corporation, 4-4-4, Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271

^{*2}Reagent Development, Sysmex Corporation

SUMMARY

We report the ability of a veterinary *in vitro* diagnosis kit "POCTEM Avian Influenza" which is intended for the detection of influenza A virus antigen in tracheal swab and cloaca swab of chickens. Some problems arose when chicken specimens were tested by the rapid detection kit for human influenza. "POCTEM Avian Influenza" solved these problems by altering the composition of the kit. Specimens were collected daily from the chicken infected with highly pathogenic avian influenza viruses (H5N1) or low pathogenic avian influenza viruses (H9N2) and were tested using both the kit and virus isolation. Viral antigens in chicken specimens were positive with the kit, which were shown around the same time as viral isolation. All the 301 tracheal and cloacal samples taken from apparently healthy chickens were negative using the kit, as well as viral isolation. The detection limit of the kit was $3.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$. Evaluation of the specificity of the kit showed that there was no cross reactivity with 11-strain of other microorganisms for avian influenza-like disease and there was a reactivity with 20-strain of H1-H15 subtypes influenza A viruses. This means the kit was reacted specifically with influenza A viruses. The kit can perform rapid and easy detection to check for influenza virus antigens from chickens and is useful to prevent the spread of avian influenza quickly.

Key Words Avian Influenza, Rapid Detection Kit, Immunochromatography, POCTEM
