

形造っているものと、ウイルスゲノムにコードされたタンパク質からなる殻が剥きだしになってその中に核酸（DNAまたはRNA）を含むタイプがある。いずれの場合も、外皮に存在する特定のタンパク質 [インフルエンザウイルスではヘマグルチニン（HA）] が宿主細胞膜上の特定分子を受容体として結合することから感染が開始する。その後、ウイルスの種類によって幾つかの異なる感染経路が存在するが、最終的にウイルスゲノムが宿主細胞の細胞質内さらには核内まで到達して、ゲノムの複製が起こり、更にウイルスタンパク質が合成される。細胞内で増殖したウイルスは、ウイルス粒子として細胞外に放出されたのち、周囲の未感染細胞に再感染して拡散する場合と、粒子が細胞外に出ることなく細胞間での融合（syncytiaの形成）を通して感染拡大を実現するタイプがある。ウイルスに対して中和活性を示す抗体は、ウイルスが宿主細胞に感染する時に機能する上述したウイルス粒子外皮分子の特定部分（中和エピートプ）に結合する。ウイルス感染細胞が未感染細胞と融合する場合も、このウイルス由来分子は感染細胞膜上に発現しており、融合を仲介する。中和抗体は、このウイルス分子と受容体の結合を物理的に阻止する機能を示すことで、ウイルスの感染能を失わせる。1個のインフルエンザウイルス粒子上には1000個のHA分子が存在し、1ウイルス粒子あたり中和抗体が約30個結合するとウイルス感染が阻害される。抗体量と中和能の相関関係を解析すると、“one hit curve”（抗体濃度を2倍にすると、2倍のウイルスが失活する）が得られる。これらの古典的実験結果は、HA分子の中に約1/30の率でそこに抗体が結合するとウイルスの感染能を失うcriticalな部位があることを示唆しているが、ウイルス失活の詳細な分子機構は明らかにされていない。中和活性を示す抗体とHAの複合体の立体構造解析は、HA分子の中で受容体と結合する部分が中和エピートプであることを示しており、抗体がHAと受容体の結合を阻害することを示す。

VZV、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、いずれの場合もAIMSライブラリーから強力なウイルス中和活性を示す抗体が複数個得られた⁹⁾。詳細な解析をした結果、得られた抗体はヒト体内でウイルス中和抗体として機能した分子そのものであると判断された。AIMSライブラリーは数10名のヒトのBリンパ球由来であるが、この3種のウイルスは多くのヒトにとって感染経験があると予想され広く存在するものである。この研究結果を通して幾つかの点が明らかになった。1) 強いウイルス中和活性を示す抗体はウイルス粒子上または感染細胞膜上の分子に強く結合できるが、その分子を可溶化すると抗体との結合性が極端に弱まる。換言すれば、中和エピートプを有するウイルス分子の立体構造は、可溶化により壊れやすい。2) 抗体はH鎖とL鎖が一組となって抗原特異性が決まる。しかし抗体ライブラリーを作製する際には、多数のBリンパ細胞から集団のままmRNAを抽出し、H鎖およびL鎖はそれぞれ別々にライブラリー化したのちランダムに組み合わせて巨大ライブラリー化する。そこで抗体ライブラリーをスクリーニングしてもin vivoに存在した抗体を真に反映した組み合わせからなるものが得られない危惧があった。しかし、in vivoで成熟した抗体を産

生する細胞は相対的に増えていること（その結果、その成熟抗体をコードする遺伝子の転写物も相対的に多い）、L鎖レパートリーの大きさは数百種類程度と比較的小さいことから 10^{10} - 10^{11} のクローンからなるAIMSライブラリーからはin vivoで機能した抗体を単離できる（図4）。

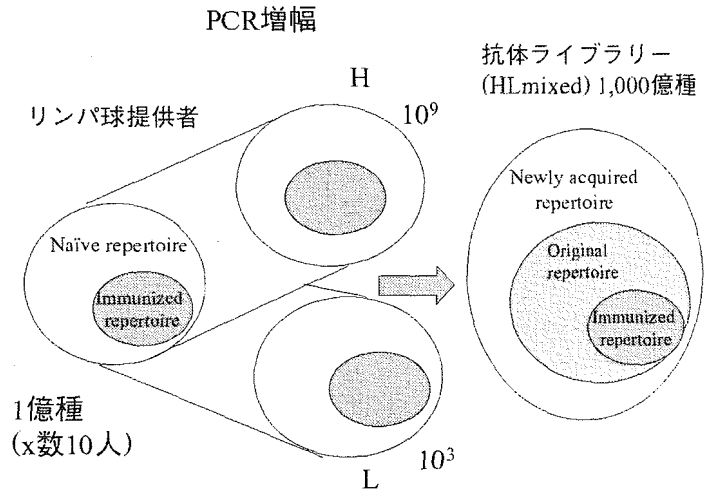


図4. 抗体レパートリーの相関関係
ヒト体内では抗体はナイーブレパートリーと成熟抗体レパートリーからなる。抗体ライブラリー作製に際しては、H鎖L鎖それぞれを別々に増幅させたのち、組み合わせて作製する。

単離したVZV中和抗体は、その中でもとりわけ中和力の強い2種類について臨床試験を開始できる段階にある（図5、図6）。ロタウイルスの場合は、幾つかの型が存在するが、中和可能な型の異なる3種類の抗体を混合することで殆ど全ての型のウイルスを中和できる。共同研究者である谷口のグループは、動物実験で経口投与することにより大腸性下痢を予防できることを示した。インフルエンザウイルスに関しては、毎年のように起

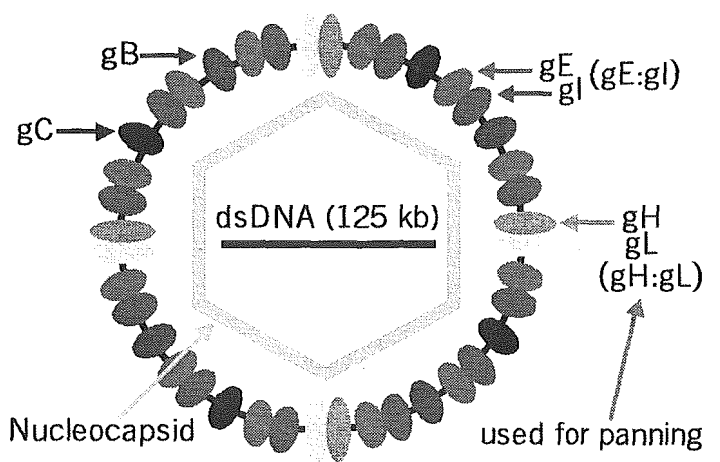


図5. VZV粒子の構造
VZV中和抗体単離に際しては、表面タンパク質であるgH:gL複合体を抗原として用いた。

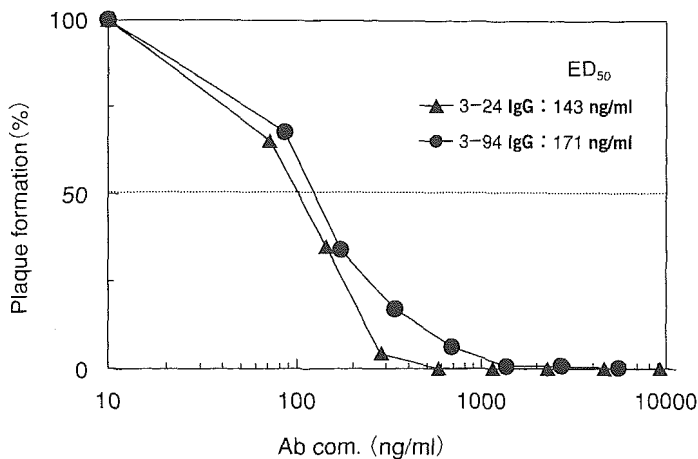


図6. VZV中和抗体のウイルス中和力
3-24, 3-94 IgG型抗体は、非常に強い中和力を示す。

この抗原性の変化 (antigen-drift) の問題があり、単離した抗体も種特異性 (strain-specificity) が高い。そこで抗体を治療薬として開発するには、中和可能な範囲がなるべく広い抗体単離のための工夫が必要となる。B型肝炎ウイルスに関しては、筆者のグループでは未だ中和活性を示す抗体単離に成功していない。

2. 病原菌毒素

病原菌毒素に関して、ジフテリア毒素 (DT), 破傷風毒素 (TT), ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離を試みた。DT, TTは百日咳毒素 (PT) と共に日本人では幼児期に3種混合ワクチン接種を受けている人が多く、AIMSライブラリーの中に中和抗体が含まれていることが予想された。その期待通り、DTおよびTTに対して強く結合する抗体が多数単離された。単離された抗体はそのアミノ酸配列に基づき分類できる。とりわけH鎖CDR3の塩基配列が完全に一致する、もしくはわずかの変異導入で説明できる関係にある場合は、同一人物由来で更に1個の抗体産生細胞が増殖し、変更を導入された産物と推定できる。DT, TTそしてインフルエンザウイルスの核タンパク質 (NP) に対して得られた抗体集団について、次のような共通点が観察された。それぞれ明らかに特定の数個のBリンパ球由来の抗体で、様々な異なる部位数個に変異が導入されたと推定される多数の抗体集団が得られた。DT, TTの場合、その抗体の抗原結合力は極めて強い ($K_d=0.1-1nM$)。DTに関しては、Vero細胞を用いて毒素の細胞への吸着、侵入、酵素活性のどの段階を抗体が阻止するか解析すると、吸着を阻止することが示された。更にウマ血清やヒト血清 (両方ともポリクローン抗体) の毒素中和抗体価測定系を用いて解析したところ充分強い中和活性を示すクローンが含まれていた。上述したウイルス中和抗体の場合は、得られた多種類の中和抗体を相互比較してみても変異導入で説明できる単一Bリンパ球由来と考えられる組み合わせの抗体は得られていない。そこでDT, TT, NPに対する抗体の性質 (中和活性を示すものと示さないもの両方が共存している) は、複数回 (DTPワクチンでは通常4回) のワク

チン接種により産生が誘導された抗体の特徴ではないかと推定している。ウイルスが感染した場合は、中和力の強い抗体を産生できるようになった少数の細胞が選別されるしくみがある。トキシイドワクチン (NPはインフルエンザワクチンに大量に含まれていることから同じ現象が起こった) を何回か接種すると、抗毒素抗体産生が誘導されその結合力は高まる (成熟した抗体が出現する) が、中和活性の強弱による特定のクローンの選別が働かない。将来的に毒素中和薬としてモノクローン抗体を用いる場合に、本来ポリクローン抗体である抗血清の力価測定系をそのままモノクローン抗体検定に用いてよいか、今後の検討課題である。ウマ抗血清で用いられている力価をモノクローン抗体で達成しようとするとグラム単位で患者に用いることになる。経験的に $K_d=0.1-1nM$ より強い結合力を示す抗体は通常期待できない。AIMSライブラリーをスクリーニングする際に、トキシイド (ワクチンとして用いるためにトキシンをホルマリン処理して無毒化したもの) でなくトキシンを抗原に実施したが得られる抗体の性質に大差なかった。

ボツリヌス毒素に対する中和抗体単離も筆者のグループで成功しているが、その詳細は解析中である。

3. ヘビ毒

ハブやマムシのような毒を持つヘビに咬まれた場合、従来より抗毒素抗体を高濃度に有するウマ血清を治療に用いている。ウマ血清は特效薬であるがアナフィラキシーショックを含めた様々な副作用が問題となり、ヒト抗体に変更したいという強い医学的要請がある。そこで筆者らは抗ハブ毒中和抗体単離を試みることにした。ヘビ毒は多成分からなる混合物であるが、ハブの場合は出血因子 (HR-1, HR-2) が同定、精製されているので最初の標的として抗HR-1, 抗HR-2抗体単離を試みた。最初AIMSライブラリーを用いたが、得られたHR-1とHR-2に結合する抗体は弱い結合力を示すが毒素中和活性を持たなかった。共同研究者である野崎博士が、「長年にわたってハブを飼育しハブ毒の抽出精製を担当している人 (この人は生涯で5回ハブにかまれている) を紹介しましょう。その人が成分献血 (リンパ球画分) をしてくれるので、それを材料にして抗体ライブラリーを作製してはどうか」と提案された。このアイデアは素晴らしかった。あるヒトの血清中に特定の抗原に対する抗体が含まれていることが判明した場合に、その抗体を産生している細胞を確実に回収する方法はこれまで確立していなかった。その細胞が体内のどの部分に存在するか定かでない。しかし成分採血という手段をとると、全身に散在するBリンパ球全てのレパートリーを反映した多数の細胞を得ることが可能で、その中には目的とする細胞が確実に含まれている。作製したライブラリーの中には抗HR-1抗体, 抗HR-2抗体, 更には様々なハブ毒に含まれる成分に対する抗体が含まれていた。そして抗HR-1抗体は、強い毒素 (出血) 中和活性を示した。この抗体は臨床試験を開始すべき段階にある。この研究により、特定の性質をした抗体を有する人がボランティアとして成分採血に協力してくれるなら、その抗体をモノクローン化する技術が確立した。

4. 癌

筆者の研究室では、厚生労働省研究費に支えられて以上のような様々な感染症に対する中和抗体を単離するプロジェクトを実施した(している)。同時に、平成11年度から5年間、文部科学省科学技術振興調整費によるゲノムフロンティア開拓研究として「ポストゲノム時代のタンパク質機能解析ツールとして抗体を利用する方法の開発」を行った。そのプロジェクトの中で線虫(C.elegans)母系遺伝子約800種の発現パターンをタンパク質レベルで解析する試薬として抗体を調製した。ゲノムサイエンスは、多数の対象を網羅的に扱うことを特徴とする。このプロジェクトを立案した頃には、AIMSライブラリーにどのような抗原に対しても特異的に結合する抗体が必ず含まれていると確信していた。そこで多数の抗原に対してAIMSライブラリーを抗体のマスターソースとして用いることにより、一網打尽に抗体を単離できると予想した。研究を続ける中でこの考えの甘さ(抗体ライブラリーの中に目的とする抗体が含まれることと、それを単離できることとは別問題である)が明らかになったが、解決法を模索する中で新しい展望が開けた。

抗原を用いて動物を免疫すると、その動物の中に出現する抗体は、免疫応答成立過程で起こる様々な現象の産物である。例えば抗原はアジュバンドと共に免疫する、小分子(ハプテン)はタンパク質(キャリアー)に結合させる必要がある、体内に導入された分子は、様々なプロセッシングを受ける等。それと比較して特定抗原を用いて抗体ライブラリーをスクリーニングする操作は抗体が得られる原理が全く異なる。ファージ粒子上に存在する抗体が用いた抗原と物理的に抗原抗体複合体を作り、洗浄プロセス(複合体を作らなかったファージや、非特異吸着したファージを除くために必要)でその複合体が破壊されなかったファージ粒子(抗原抗体反応は平衡反応であるので、複合体形成反応と解離反応が同時に起こっている。洗浄すると解離反応のみが起こり続けることになる)のみを回収することができる。この単純な事実に気付くのに長期間の悪戦苦闘を必要とした。上述したVZVの例では、精製抗原(gH:gL複合体)を用いてAIMSライブラリーをスクリーニングして得た中和抗体がELISAでは弱い結合力しか示さないのに、その抗体の単離に成功した。一方、ELISAでは強い結合力を示す抗体がウイルス中和活性を示さなかった。何故このようなことが起こったかを推定すると、AIMSライブラリーの中にVZV中和抗体が多数存在したからである。スクリーニングに用いるパニング法とELISAは、本質的に同じ原理に基づいておりプラスチック表面に抗原を付着させてその後抗原-ファージ抗体複合体を作らせる。中和活性を示さないがELISAで強い結合力を示す抗体が多数存在するとすれば、それらのみが得られたはずである。このような研究の紆余曲折の中で、ファージ抗体ライブラリーを上手に利用する上で最も重要な点に気付いた。「ファージ抗体ライブラリーは、単離した抗体を使用する時点で対象とする抗原が形作っているであろう立体構造をそのまま反映した抗原を用いてスクリーニングするのが、使用目的に合致した性質の抗体を得る上で最適である。」「抗原抗体反応は平衡反応である。

AIMSライブラリーは、どのような抗原分子に対する抗体もほぼ確実に含んでいる。そこで抗原とファージ粒子集団を混合すれば、一定頻度で必ず複合体ができているはずで、スクリーニング法として洗浄プロセス(複合体が破壊される段階)を経ることなく複合体を単離する方法を開発しよう。」

in vivo抗体レパートリーに二重性があることは上述したが、AIMSライブラリーはそれを反映した抗体レパートリーの構成になっている。多くの人が感染-発病-治癒の経験があると予想される疾病に対する中和抗体単離の成功例は既に記述したが、残りの大部分のナイーブレパートリーを構成する抗体の利用法が問題であった。ゲノムプロジェクトとして多数の抗原に対する抗体のソースとして用いる試みは、調製した抗原がナチュラルな立体構造をしていないことがネックとなって挫折した。治療用抗体の対象となり得る疾患を想定してみる。薬剤として体内に投与された抗体は、通常の状態では分泌分子もしくは細胞膜上に発現した分子に結合する。そこでサイトカインやそのレセプターまたは癌特異抗原が治療用抗体の標的と考えられ、現在、開発が進められている。そこで筆者らは発想を大転換し、特定の既知抗原を標的として抗体を単離するのではなく、標的抗原を捜すために抗体ライブラリーを用いるという考えに到達した。より具体的には、癌細胞膜上に存在する事実上全ての分子(エピトープ)に対する抗体を網羅的に単離する。続いてその抗体を用いた組織染色により癌細胞特異的な染色パターンを示す抗体を探し出す。抗体を用いた免疫沈降(IP)またはアフィニティクロマトグラフィーにより抗原を精製し、マスマスペクトロメーター解析によりその抗原を同定するというのが基本戦略である。このアイデアの最も根幹をなす「細胞膜上の全てのエピトープに対する抗体を単離する技術開発(図7にスキームを示す)」にはほぼ2年前(平成14年秋)に成功した。

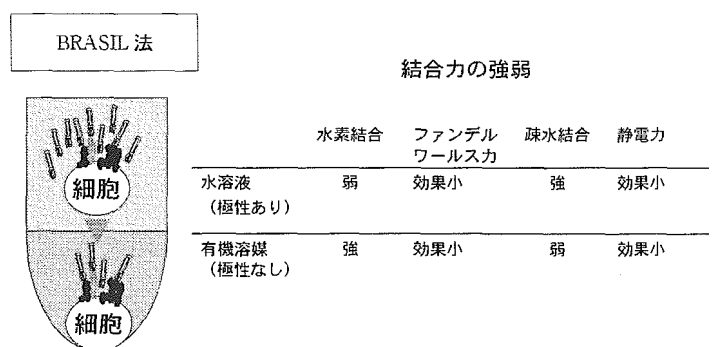


図7. 細胞上の抗原に対する抗体を網羅的に単離する原理
水溶液中で細胞と抗体ファージを混合し、遠心法によって抗原抗体複合体を細胞と共に有機溶媒層下に沈殿させる。水溶液の環境から有機溶媒への変換で水素結合が強まり、多数の抗体を洗浄過程を経ることなく回収できる。

癌治療用抗体はハーセプチンとリツキサンの成功例があり、開発の参考となる。最初、肺癌および乳癌でHer2遺伝子を含むDNAが増幅していることが発見され、Her2遺伝子の異常大

量発現が発癌の原因であることが示された。このHer2タンパク質を標的とするヒト化抗体がハーセプチンである。Bリンパ細胞は全てCD20分子を発現している。リツキサンは抗CD20マウス/ヒトキメラ抗体であり、非ホジキン型Bリンパ腫の治療薬として使われるリツキサンは、腫瘍細胞のみを殺す訳ではなく、正常B細胞を含めた全てのCD20発現細胞が殺される。しかし、治療後正常Bリンパ細胞は、造血幹細胞の分化によって再生するので治療中の感染症対策を充分に行えば副作用の問題は解決できる。この2例に示されるように従来型の創薬コンセプトは、標的探索がそれまで知られた事実に基づき論理的である。しかしゲノムサイエンスがもたらした膨大な情報量に基づくゲノム創薬が抗体分野に持ち込まれた。

典型的なアプローチが、基本的にヒト全遺伝子を解析できるDNAマイクロアレイを用いた転写物の網羅的解析法で、癌細胞由来のmRNAと正常細胞由来のmRNAを対象に、質的または量的差を示す遺伝子を見出す方法である。データの多くは公表されていないが、間違いなく世界中で多くのグループが試みており莫大なデータが蓄積されていると推定される。そしてその中から各癌ごとに10数種を越える癌特異抗原が抗体標的候補として挙げられているであろう。

筆者の研究グループでは全く別のアプローチをとっている。肝癌を例にすれば、様々な肝癌由来細胞を抗原にして既に2000種を越える細胞膜上分子に結合するモノクローン抗体を単離した。それをプローブにして手術除去した肝癌組織の切片を用いた組織染色を行い、八百数十例の抗体の中で数10種類が癌組織特異的染色像を与えることを見出している(図8)。その中で癌治療用抗体の候補となり得る条件は、(1)抗体によって認識される抗原が、何故癌特異抗原となっているか、質的および量的視点から説明できる、(2)IgG化した抗体が、標的抗原を発現する癌細胞に対してADCC [antibody-dependent cell cytotoxicity:細胞膜上で抗原抗体複合体が形成されると、ナチュラルキラー(NK細胞)等がそれを認識して細胞を殺す因

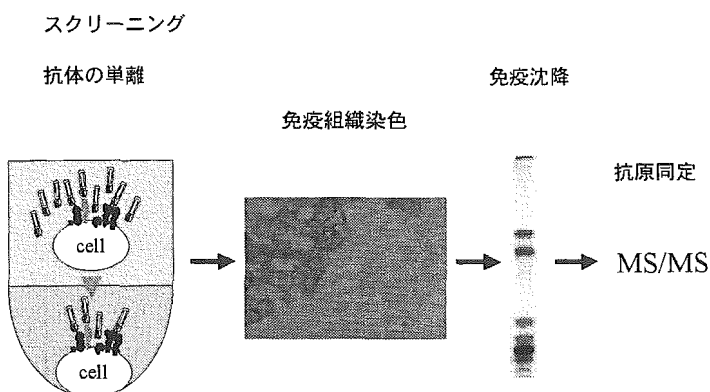


図8. 癌特異抗原の同定と癌治療用抗体単離の方法

1) 癌細胞を抗原にして膜タンパクに対する多数のモノクローン抗体を単離する。2) 手術除去した癌細胞に対する免疫組織染色で癌特異的染色像を与える抗体を選別する。3) 抗体を用いた免疫沈降で、抗原を分離する。4) マススペクトロメーターによる解析で癌特異抗原を同定する。

子を分泌する]による致死効果を示す、(3)手術除去した癌細胞のヌードマウス(またはSCIDマウス)中での増殖をIgG抗体が抑制する。

DNAマイクロアレイを用いたアプローチおよび筆者のグループのアプローチを遂行する中で抱えている現段階での最大の問題は、候補となり得る抗原数もしくは抗体数が多すぎてIgG化が追いつかない点である。更に動物を用いたモデル実験を前臨床試験と位置づけるとすれば、ヒトを対象とする臨床試験実施には、1抗体についてGMPおよびGCPレベルで必要量調製するのに最低2-3億円必要と推定されており、この問題を如何に乗り越えるか道を見出さないと「宝の持ち腐れ」となってしまう。

以上の2方向からの網羅的アプローチが癌治療用抗体単離に結びつくとなれば、癌に対する抗体を用いたテーラーメイド医療が現実のものとなる。その場合最大の問題は、抗体調製に要する莫大な費用をどうするかとなり、安価な抗体調製法の開発が求められている。

抗体治療薬開発可能分野

1. 自己免疫疾患

TNF α に対する抗体(レミケード)が、関節リウマチに劇的な治療効果をもたらすことが示されている。サイトカインは数多く同定されているが、ネットワークを作っており、その最上流に位置するTNF α やIL-1の働きを抑制するとその下流にある多くのサイトカインの働きも抑制され、免疫系の異常亢進が原因である自己免疫疾患に治療効果をもたらすと考えられている。ここで議論しようとするのは、そのような原理に基づく抗体治療薬ではなく、自己抗原に対する抗体の出現が発病の原因と推定されているが、その抗原の実態がわからない各種自己免疫疾患に関してである。例えば、「高安動脈炎」等の血管炎は、血管内皮細胞の特定分子に対する抗体の出現が原因である可能性が高い。「川崎病」では γ グロブリン大量投与により冠動脈瘤の形成を阻止できるが、その際 γ グロブリンの中の何かが特定抗原の機能を抑制しているかもしれない。ヒトゲノムシーケンスが完了し、全ヒト遺伝子総数が予想以上に少ない(2万-2万5千)ことが判明した。細胞膜タンパク質がそのうちの20%としても4-5千種となる。筆者らの研究グループではこの全膜タンパク質に対するモノクローン抗体単離が現実的に可能な課題であると考えている。その抗体をセットとして準備し抗体チップを作製すれば、今まで未同定だった様々な抗原もしくは自己抗体を結果として単離できる。今後難治性疾患として患者数の増大が予想される自己免疫疾患の治療法の道を開くと推定している。

2. 神経変性疾患

アルツハイマー病、クロイツフェルトヤコブ病、更にハンチントン病を代表とするポリグルタミンを原因とする各種神経変性症は、全てタンパク質凝集体の形成と神経細胞死が密接に関係(一部因果関係も示されている)する病気と推定されており、

現在治療法が存在しない。動物実験レベルではこの凝集体形成を阻害する抗体投与またはその抗体産生を誘導するワクチンに治療効果があることが報告されている。本格的に抗体治療が行われるのは遠い将来と思われるが、抗体開発の対象疾患として巨大ジャンルである。

展望

本総説は7年余にわたって各種疾患治療薬としてのヒト抗体単離を実施した筆者が、現時点(平成16年秋)で考えるこの分野の概観である。薬は、小分子からなり経口投薬可能なものがより望まれる。注射を必要とし高価な抗体が長期に渡って薬の主角となるとは想像し難いが、今後10-20年間、創薬の重要な一角を占めるのは間違いない。本小文では、筆者らのグループで用いているファージ抗体ライブラリーを基本技術としたヒト抗体単離調製戦略を中心に論じているが、その技術的詳細は書いていない。技術的なことについては既に幾つも実験書が出版されている。ファージ抗体ライブラリー作製には基本特許が存在し、その特許料が高額に設定されていること、一方で大学院生を研究グループの核とする小グループがアカデミック研究を進める技術としては多くの単純労働を必要とする点から向いていない、等の理由でその高いポテンシャルと比較して技術的発展が遅れた分野である。筆者のグループでは10数名の人が数年にわたって本プロジェクトに取り組み、本文で記述したような結論に到達した。詳細に読んで頂くと、何が問題であり如何なる点を考慮すべきかご理解頂けると思う。筆者はCAT社の特許が終了した後は、ファージディスプレイ技術を用いる研究者が飛躍的に増加し、ゆくゆくは現在の細胞融合技術を凌駕すると確信している。本文がファージ抗体ライブラリーの可能性を正しく予言したものであれば幸いである。

謝辞

本総説は藤田保健衛生大学総合医科学研究所免疫学研究部門で実施されている「抗体プロジェクト」の成果に基づいて書かれているが、多くの共同研究者の協力による。AIMSライブラリーは赤堀泰、伊庭善孝、森野和彦、篠原みどりの4名が作製した。VZV中和抗体単離は富山医科薬科大学医学部・白木公康教授との共同研究で、鈴木和宏、赤堀泰が担当した。ロタウイルス中和抗体単離は本学谷口孝喜教授との共同研究でウイルス学教室の守口匡子が実施した。ジフテリア毒素および破傷風毒素の中和抗体単離は国立感染症研究所の高橋元秀博士との共同研究で柿田麻衣が担当した。ボツリヌス毒素中和抗体単離は同じく高橋元秀博士との共同研究で東成見が担当している。インフルエンザウイルス中和抗体単離は大阪公衆衛生研究所・奥野良信教授との共同研究で廣野ゆかり、岡田潤が担当している。ハブ毒中和抗体単離は沖縄衛生研究所の野崎真敏博士との共同研究で東成見が担当している。抗癌抗体研究は本学医学部消化器外科の杉岡篤助教授、森田美和研究員と我々のグループとの共同研究として開始し、現在は以下のメンバーが参加している。医学部(杉岡篤、森田美和、宮川秀一、星長清隆、白木良一、

溝口良順、加藤良一)、黒澤研究室(赤堀泰、伊庭善孝、濱田進、黒澤仁)、COE関係(住友万里子、村松千穂、松田一起、江口恵子)。自己免疫疾患については本学吉田俊治教授との共同研究で、三浦恵二、玉熊桂子が担当している。このように多数のメンバー参加による巨大プロジェクトとして実施されている。更に本研究は、プロジェクト開始当初から(株)医学生物学研究所(MBL; 数納幸子会長、西田克彦社長)の全面的支援を受け、平成11年5月には治療用ヒト抗体開発を目的としたベンチャー会社、(株)抗体研究所(IFA)がMBLの子会社として設立された。現在9名の研究者がIFAに所属して黒澤研究室で共同研究を実施している。

引用文献

1. Koehler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256:495-497.
2. Kameyama K, Imai K, Ito T, Taniguchi M, Miura K, Kurosawa Y. Convenient plasmid vector for construction of chimeric mouse/human antibodies. *FEBS Lett* 1989; 244:301-306.
3. Carter P, Presta L, Gorman CM, Ridgway JBB, Henner D, Wong WLT, Rowland AM, Kotts C, Carver ME, Shepard HM. Humanization of an anti-p185 HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89:4285-4295.
4. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-581.
5. Karpus A, Dremucheva A, Czepulkowski BH. A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001;98: 1799-1804.
6. Medez MJ, Green LL, Corvalan JRF, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Frickson KL, Luna J, Ray CMN, Abderrahim H, Kirshenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jabovits A. Functional transcript of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nature Genet* 1997;15: 146-156.
7. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, Hoogenbom HR. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:433-455.
8. Ichihara Y, Matsuoka H, Kurosawa K. Organization of human immunoglobulin heavy chain diversity gene loci. *EMBO J.* 1988;7:4141-4150.
9. Higo-Moriguchi, K, Akahori Y, Iba Y, Kurosawa Y, Taniguchi K. Isolation of human monoclonal antibodies that neutralize human rotavirus. *J. Virol.* 2004;78:3325-3332.

Variation of the Conserved Neutralizing Epitope in Influenza B Virus Victoria Group Isolates in Japan

Naoko Nakagawa,^{1*} Ritsuko Kubota,² and Yoshinobu Okuno²

*Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4-6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe, 650-0046 Japan,¹
and Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69,
Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka, 537-0025 Japan²*

Received 26 December 2004/Returned for modification 3 February 2005/Accepted 28 April 2005

For almost 20 years, the neutralizing-epitope site specific for influenza B virus Victoria group isolates was conserved at the “tip” of the hemagglutinin molecule; however, it was not detected in half of the isolates from the 2002-2003 epidemic in Japan. Amino acid substitutions (D164E or N165K) were observed at the “tip,” and the epitope was altered. The viral antigenicities were affected, and human antibodies did not substantially inhibit the hemagglutination in the hemagglutination inhibition tests. It is suspected that such variants will be important in future epidemics.

There are influenza epidemics every winter in Japan, as in European and North American countries. Over the past 20 years, influenza B virus has caused epidemics in humans, as have the H1 and H3 subtypes of influenza A virus. Recent isolates of influenza B virus strains are divided into two large lineages in a phylogenetic tree: one group is represented by B/Victoria/2/87 and the other by B/Yamagata/16/88 (2). B/Victoria group strains were dominant in the 1980s, while B/Yamagata strains became dominant in the early 1990s (2, 4, 5, 12, 14, 15). In Japan, B/Victoria reemerged and was epidemic in the 1996-1997 season and then again in the 2002-2003 season. In hemagglutination inhibition (HI) tests, all of the 2002-2003 isolates reacted poorly to the standard immune ferret serum prepared against the 1997 isolate. The new isolates obtained oligosaccharide chains near the receptor binding region (11). In addition, half of the isolates did not react to B/Victoria-specific neutralizing monoclonal antibody (MAb), which suggested the alternation of the long-conserved neutralizing epitope. We investigated the variation of the amino acid sequence of the hemagglutinin (HA) molecule, along with the influence on viral antigenicities.

MAbs 10B8 and 10D7 were obtained from mice immunized with B/Victoria group strains B/Nagasaki/1/87 (6–8) and B/Kobe/1/2002, respectively. Ascitic fluids of mice injected with hybridoma cells were used as sources of MAbs. Every year, standard sera are provided by the National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan, including the immune ferret serum against B/Shangdong/7/97 for the 2002-2003 and 2003-2004 seasons and the hyperimmune sheep serum against B/Brisbane/32/2002 for the 2004-2005 season. Human sera, collected from six individual adults before the beginning of the 2002-2003 season, were utilized. Escape mutants were induced by incubating the strains with MAbs, by modifying the method previously described (1, 3, 8, 10). Briefly, 1×10^5 focus-forming units/ml virus was incubated for 1 h at 30°C in the presence

of 10 μ l of MAb. The virus-MAb mixture was inoculated to MDCK cells in 24-well plates and incubated at 35°C for 3 days. HI tests with MAb on each well were performed separately to identify the escape mutants. The results of the HI tests are expressed as the reciprocals of the antibody dilutions (13). Direct sequencing of the viral nucleotide was performed as described previously (7–11). Briefly, reverse transcriptase PCR products were sequenced with a DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ) and were analyzed by an ABI Prism 310 automatic sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA).

Formerly, we reported that MAb 10B8 possessed neutralizing and HI activities against all B/Victoria isolates in the 1996-1997 season in Osaka Prefecture, Japan, along with the representative strains isolated during the previous seasons (6, 8). There are two immunodominant antigenic sites in influenza B virus HA, which correspond to antigenic site A (the “loop”) and site B (the “tip”) of influenza A virus HA (1). The epitope site of 10B8 was at the “tip” of the HA1 molecule, which had been conserved in B/Victoria isolates since the mid-1980s (8). After the 1996-1997 season, B/Victoria was isolated sporadically. At the end of the 2001-2002 season, five B/Victoria isolates (DDBJ accession no. AB081570, AB081571, AB083182, AB083183, and AB196144) were obtained in Kobe City, Japan, which is situated 20 km to the west of Osaka Prefecture. They did not react to 10B8 in the HI tests (Fig. 1). Genetic analysis clarified a single amino acid substitution at the “tip” (D164E) (Fig. 1). To obtain MAbs that possess HI activities against the new isolates, we immunized mice with B/Kobe/1/2002. Thereafter, MAb 10D7 was established. Though HI titers of 10D7 were lower than those of 10B8, 10D7 reacted to the 1996-1997 and the 2001-2002 isolates to almost the same degree. Genetic analysis of laboratory-induced escape mutants (B/Kobe/1/2002-V1 and -V2) clarified that the epitope of 10D7 situates also at the “tip” (DDBJ accession no. AB196142 and AB196143) (Fig. 1).

In the 2002-2003 season, there was an epidemic of B/Victoria and 33 strains were isolated from clinical specimens in Kobe City. However, they were divided into three groups according to the HI titers to MAbs 10B8 and 10D7 (Fig. 1). In HI

* Corresponding author. Mailing address: Department of Microbiology, Kobe Institute of Health, 4-6, Minatojima-nakamachi, Chuo-ku, Kobe, 650-0046 Japan. Phone: 81-78-302-6260. Fax: 81-78-302-0894. E-mail: nknkgw@h2.dion.ne.jp.

	"tip"										HI titers																								
	4	8	116	121	164	170	199	351	356	10B8	10D7																								
B/Osaka/983/1997	C	T	G	I	T	-	-	H	-	I	-	-	D	N	N	K	T	A	T	-	-	A	-	-	A	I	A	G	F	L	25600	800			
B/Kobe/1/2002	-	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<100	1600
B/Kobe/1/2002-V1	-	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<100	<100
B/Kobe/1/2002-V2	-	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<100	<100
Group 1																																			
B/Kobe/1/2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25600	800
Group 2																																			
B/Kobe/2/2003	-	-	-	-	-	-	-	R	-	N	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<100	1600
Group 3																																			
B/Kobe/28/2003	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<100	<100

FIG. 1. Comparisons of deduced amino acid sequences of the HA1 regions and HI titers of the clinical isolates. Sequences of amino acid residues 4 to 356 are shown. These sequences are compared with those of B/Osaka/983/1997 (DDBJ accession no. AB029628), a classical strain isolated in the 1996-1997 season. The results of the HI tests are expressed as the reciprocals of the antibody dilutions (13). The tests were performed three times separately, and the results were consistent.

tests, hemagglutination of group 1 strains (14 strains) was inhibited by both MAbs, similarly to the 1996-1997 isolates, while hemagglutination of group 2 strains (18 strains) was inhibited only by 10D7, similarly to the 2002-2003 isolates. There was only one strain in group 3, and its hemagglutination was not inhibited by either MAb. Genetic analysis clarified that group 1 isolates (represented by B/Kobe/1/2003, B/Kobe/25/2003, and B/Kobe/26/2003 [DDBJ accession no. AB126835, AB126839, and AB126840, respectively]) had the same amino acid sequence at the "tip" as the old isolates, while group 2 isolates (represented by B/Kobe/2/2003, B/Kobe/3/2003, and B/Kobe/4/2003 [DDBJ accession no. AB126836, AB126837, and AB126838, respectively]) had the same sequence as the 2001-2002 isolates (D164E). B/Kobe/28/2003 (DDBJ accession no. AB126841) showed another amino acid substitution at the "tip" (N165K).

In contrast to the antigenicities of influenza A virus, those of influenza B virus were relatively stable (4, 5). For example, the neutralizing-epitope site at the "tip," strictly specific for B/Victoria, had been conserved since the 1980s (6). It is suggested that established and accumulated human immunity began to induce naturally occurring antigenic variants. As reported previously, the first B/Victoria variants after the reemergence appeared in the 1996-1997 season (7) and became major in the 2002-2003 season (11). One amino acid substitution in the HA1 region (A199T) created an N-linked glycosylation site near the receptor binding site, and the virus gained extra oli-

gosaccharide chains (11). Consequently, all 2002-2003 isolates reacted poorly to the immune ferret serum against B/Shangdong/7/97. Then, the second variants appeared already in the 2002-2003 season. They were detected since they reacted heterogeneously to MAbs 10B8 and 10D7. They showed an amino acid substitution at the conserved neutralizing epitope (Fig. 1). Therefore, their antigenicities were further analyzed (Table 1). The serum against B/Brisbane/32/2002 was provided as the standard serum for the 2004-2005 season. Group 1 isolates reacted to it well. The HI titers of group 1 strains were as high as 1,280, while those of group 2 strains were 320 and that of the group 3 strain was 40. The idea was confirmed further with data from adult human sera collected before the beginning of the 2002-2003 season. In HI tests, five of six human sera (designated A through F in Table 1) showed HI titers of 40 to 160 to group 1 isolates, which were as high as those to the classical strain isolated in the 1996-1997 season. No human serum inhibited hemagglutination of group 2 and 3 isolates as much. Thus, their antigenicities are distinct from those of group 1 isolates. Single amino acid substitutions at the "tip" play important roles. It is suspected that established human antibodies, raised against B/Victoria isolates in previous seasons, are not able to prevent infection by the new variants.

The conserved neutralizing epitope of B/Victoria was finally altered, and the new variants appeared in the 2002-2003 season. These new variants may be important in B/Victoria epidemics in the near future, as the former variants from the

TABLE 1. Results of HI tests of polyclonal antibodies^a

Virus strain	Ferret anti-B/Shangdong/7/97 serum	Sheep anti-B/Brisbane/32/2002 serum	HI titer					
			A	B	C	D	E	F
B/Kobe/1/2003	40	1,280	40	40	80	40	<10	160
B/Kobe/2/2003	20	320	<10	<10	<10	<10	<10	<10
B/Kobe/28/2003	40	40	<10	<10	10	<10	<10	<10
B/Osaka/983/97	320	2,560	80	80	40	80	<10	80
B/Shangdong/7/97	320	ND						
B/Brisbane/32/2002	ND	1,280						

^a The results of the HI tests are expressed as the reciprocals of the antibody dilutions (13). The tests were performed three times separately, and the results were consistent. ND, not done.

1996-1997 season with an extra oligosaccharide chain became major in the 2002-2003 season (11). Then, the scale of the epidemics will be positively modified. This information is expected to benefit public health management, especially from the perspective of selecting suitable strains for vaccines.

We thank T. Iwamoto for his valuable advice on nucleotide sequencing.

REFERENCES

- Berton, M. T., C. W. Naeve, and R. G. Webster. 1984. Antigenic structure of the influenza B virus hemagglutinin: nucleotide sequence analysis of antigenic variants selected with monoclonal antibodies. *J. Virol.* **52**:919-927.
- Kanegae, Y., S. Sugita, A. Endo, M. Ishida, S. Senya, K. Osako, K. Nerome, and A. Oya. 1990. Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J. Virol.* **64**:2860-2865.
- Lambkin, R., L. McLain, S. E. Jones, S. L. Aldridge, and N. J. Dimmock. 1994. Neutralization escape mutants of type A influenza virus are readily selected by antisera from mice immunized with whole virus: a possible mechanism for antigenic drift. *J. Gen. Virol.* **75**:3493-3502.
- Lindstrom, S. E., Y. Hiromoto, H. Nishimura, T. Saito, R. Nerome, and K. Nerome. 1999. Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J. Virol.* **73**:4413-4426.
- McCullers, J. A., G. C. Wang, S. He, and R. Webster. 1999. Reassortment and insertions-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J. Virol.* **73**:7343-7348.
- Nakagawa, N., A. Maeda, T. Kase, R. Kubota, and Y. Okuno. 1999. Rapid detection and identification of two lineages of influenza B strains with monoclonal antibodies. *J. Virol. Methods* **79**:113-120.
- Nakagawa, N., R. Kubota, A. Maeda, T. Nakagawa, and Y. Okuno. 2000. Heterogeneity of influenza B virus strains in one epidemic season differentiated by monoclonal antibodies and nucleotide sequences. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3467-3469.
- Nakagawa, N., R. Kubota, T. Nakagawa, and Y. Okuno. 2001. Antigenic variants with amino acid deletions clarify a neutralizing epitope specific for influenza B virus Victoria group strains. *J. Gen. Virol.* **82**:2169-2172.
- Nakagawa, N., R. Kubota, S. Morikawa, T. Nakagawa, K. Baba, and Y. Okuno. 2001. Characterization of new epidemic strains of influenza B virus by using neutralizing monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* **65**:745-750.
- Nakagawa, N., R. Kubota, T. Nakagawa, and Y. Okuno. 2003. Neutralizing epitope specific for influenza B virus Yamagata group strains are in the "loop." *J. Gen. Virol.* **84**:769-773.
- Nakagawa, N., R. Kubota, A. Maeda, and Y. Okuno. 2004. Influenza B virus Victoria group with a new glycosylation site was epidemic in Japan in the 2002-2003 season. *J. Clin. Microbiol.* **42**:3295-3297.
- Nerome, R., Y. Hiromoto, S. Sugita, N. Tanabe, M. Ishida, M. Matsumoto, S. E. Lindstrom, T. Takahashi, and K. Nerome. 1998. Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch. Virol.* **143**:1569-1583.
- Okuno, Y., K. Tanaka, K. Baba, A. Maeda, N. Kunita, and S. Ueda. 1990. Rapid focus reduction neutralization test of influenza A and B viruses in microtiter system. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1308-1313.
- Rota, P., T. R. Wallis, M. W. Harmon, J. S. Rota, A. P. Kendal, and K. Nerome. 1990. Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* **175**:59-68.
- Yamashita, M., M. Krystal, W. M. Fitch, and P. Palese. 1988. Influenza B virus evolution: co-circulating lineages and comparison of evolutionary pattern with those of influenza A and C viruses. *Virology* **163**:112-122.

Laboratory and Epidemiology Communications

Isolation of Influenza Virus Type AH3 from a Traveler Returning from Vietnam in July 2005 in Osaka, Japan

Tetsuo Kase*, Saeko Morikawa, Yoshinobu Okuno, Fusako Ito¹ and Kiyosu Taniguchi²

Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, Osaka 537-0025,

¹Osaka Prefectural Government, Osaka 540-8570 and

²Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 162-8640, Japan

Communicated by Ichiro Kurane

(Accepted October 25, 2005)

On 28 June 2005, the World Health Organization announced that an additional case of human infection with AH5N1 avian influenza was confirmed in Vietnam and that the new case brought the total, in Vietnam, since mid-December 2004, to 60 cases, of which 18 had been fatal. A man who visited Vietnam from 4 July 2005 returned to Osaka, Japan, on 8 July. As he felt a fever beginning on 7 July, he saw a doctor soon after his flight to Japan. He was diagnosed with influenza type A infection using a rapid influenza test. Although he declared that he was traveling around a coast area and that he had not been near chickens in Vietnam, the doctor reported this case to the Izumi Health Center of Osaka Prefecture,

because they could not completely deny the possibility that his influenza was caused by highly pathogenic avian influenza (HPAI). On the afternoon of 8 July, the gargle from the patient was transported to the Osaka Prefectural Institute of Public Health. The specimen was inoculated onto Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells. Simultaneously, viral RNA was extracted with QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN K.K., Tokyo, Japan) for analysis by RT-PCR. To obtain an amplicon on a part of the HA1 region of the HA gene in influenza A virus, we used primer pairs as follows: 5'-CAGATGCAGACACAATATGT-3' and 5'-AAACCGGC AATGGCTCCAAA-3' for H1, 5'-CAGATTGAAGTGACTA ATGC-3' and 5'-GTTTCTCTGGTACATTCCGC-3' for H3 and 5'-CATACCCAACAATAAAGAGG-3' and 5'-GTGTTT ATTTTGTTAATGAT-3' for H5 (1,2). We carried out RT-PCR with Ready-to-Go RT-PCR Beads (Amersham, Biosciences UK Ltd., Buckinghamshire, UK) and by using a DNA thermal cycler (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn., USA)

*Corresponding author: Mailing address: Department of Infectious Diseases, Osaka Prefectural Institute of Public Health, 1-3-69 Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan. Tel: +81-6-6972-1321, Fax: +81-6-6972-2393, E-mail: kase@iph.pref.osaka.jp

Table 1. The HI test results of isolated virus against reference antisera

	Antisera					
	A/Moscow/ 13/98	A/New Caledonia/ 20/99	A/Wyoming/ 03/2003	A/Panama/ 2007/99	B/Brisbane/ 32/2002	B/Johannesburg/ 5/99
Antigen						
A/Moscow/13/98(H1N1)	1,280	nt	nt	nt	nt	nt
A/New Caledonia/20/99(H1N1)	nt	320	nt	nt	nt	nt
A/Wyoming/03/2003(H3N2)	nt	nt	2,560	nt	nt	nt
A/Panama /2007/99(H3N2)	nt	nt	nt	1,280	nt	nt
B/Brisbane/32/2002	nt	nt	nt	nt	10,240	nt
B/Johannesburg/5/99	nt	nt	nt	nt	nt	>20,480
Isolated virus						
A/Osaka/27/2005	<10	<10	1,280	<10	<10	<10

nt: not tested.

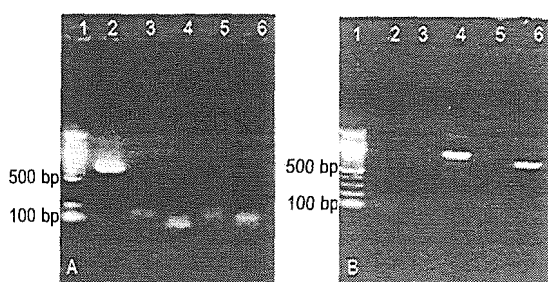


Fig. 1. RT-PCR for a part of the HA1 region of the HA gene in influenza A virus. (A) The RT-PCR products from the extract of the gargle were electrophoresed in 1% agarose gel. Lane 1, marker; lane 2, positive control and primer pairs for H5; lane 3, primer pairs for H1; lane 4, primer pairs for H3; lane 5, primer pairs for H5; lane 6, negative control and primer pairs for H5. (B) The RT-PCR products from the extract of the culture fluid showing the CPE were electrophoresed in 1% agarose gel. Lane 1, marker; lane 2, negative control and primer pairs for H5; lane 3, primer pairs for H1; lane 4, primer pairs for H3; lane 5, primer pairs for H5; lane 6, positive control and primer pairs for H5.

consisting of 1 cycle at 42°C for 30 min, 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of 94°C for 30 sec, 45°C for 30 sec, and 72°C for 1 min. However, no PCR products were detected from the extract of the gargle (Figure 1A).

On 11 July, as we observed the cytopathic effects (CPE) in the MDCK cells inoculated with the specimen, we performed a hemagglutination (HA) test with the supernatant of viral culture using erythrocytes of chickens and humans (blood group O). The fluid agglutinated human erythrocytes but not chicken ones. We performed a hemagglutination inhibition (HI) test with human erythrocytes against the reference antisera provided by the National Institute of Infectious Diseases (NIID). As shown in Table 1, the isolate was reacted with anti-A/Wyoming/03/2003 (H3N2) serum only. We also carried out RT-PCR with the culture fluid showing CPE by the method described above. The RT-PCR products were specific for H3 (Figure 1B). The RT-PCR product was purified in an agarose gel and sequenced directly with BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits with AmpliTaq DNA Polymerase, FS (PE Applied Biosystems, Foster City, Calif., USA) by using an ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). A BLAST search showed that the sequence of the isolate possessed 98% homology with A/New York/10/2004 (H3N2). These results indicated that the isolated virus was a human influenza virus type AH3 [named

A/Osaka/27/2005(H3)].

According to the Infectious Disease Surveillance Center, NIID, influenza epidemic seasons in Vietnam are from June to August and from December to March in usual years. In July 2005, an influenza epidemic occurred in Vietnam. As there was no influenza virus activity in Osaka in this month, it is concluded that the patient was infected with influenza virus type AH3 in Vietnam. This is one of the cases in Japan. Some papers have already reported that influenza virus type AH3 was isolated from travelers when they came back to Japan from abroad (3-5). Since HPAI is spreading in Vietnam and its neighbor countries now, it is important that we examine whether influenza of returnees from these countries is conventional human influenza or HPAI, even if patients have no history of contact with humans or chickens infected with HPAI. Furthermore, the examination should include detection of viral antigens, amplification of viral RNA and viral isolation for definite diagnosis.

This article appeared in the Infectious Agents Surveillance Report, vol. 26, p. 222, 2005 in Japanese.

REFERENCES

1. Stockton, J., Ellis, J. S., Saville, M., Clewley, P. and Zambon, M. C. (1998): PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J. Clin. Microbiol.*, 36, 2990-2995.
2. Laboratory of Influenza, Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases (2004): Detection of AH5 avian influenza virus genome by RT-PCR (in Japanese).
3. Satoh, K., Hata, M., Sakae, K., Kumatani, N., Simizu, N., Yanai, Y. and Hashimoto, M. (2004): Isolation of influenza virus type AH3 from three overseas travelers, August-September 2004. *Aichi Infect. Agents Surveillance Rep.*, 25, 290 (in Japanese).
4. Simizu, H., Okuyama, K., Hirai, Y. and Ogawa, M. (2003): Isolation of influenza virus type AH3N2 from a returnee from Taiwan, July 2003. *Kawasaki City Infect. Agents Surveillance Rep.*, 24, 258 (in Japanese).
5. Iki, S., Satoh, C. and Nagano, H. (2003): Isolation of influenza virus type AH3 from a returnee from Shanghai, August 2003. *Hokkaido Infect. Agents Surveillance Rep.*, 24, 259 (in Japanese).

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

高橋 和郎*1, 加瀬 哲男*1, 森川 佐依子*1, 岡本 健治*2,
浜本 芳彦*3, 馬場 宏一*4, 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 丁目 3-69 (〒537-0025)

*2 岡本医院

*3 浜本小児科

*4 医療法人宏知会ばば小児科

SUMMARY

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」について基礎的および臨床検体を用いた性能を評価した。その結果, 改良キットは現行キットに比べ発色強度が向上し, 判定に必要な所要時間が短縮されていることが確認された。市販の5種のキットを対象に, A, B型のワクチン株を用いた検出感度の比較では, 同等あるいはやや優れた感度を示した。また, 改良キットは現行キットと同様に, 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21種のウイルスや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計281検体を用いて, 市販キットA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。同じ臨床検体を用いて, ウイルス分離との相関性を検討した。3種(鼻腔吸引液, 鼻腔拭い液, 咽頭拭い液)の臨床検体において, 改良キットはA型, B型ともに高い感度を示した。特異性も全般に高い値を示したが, 一部の場において, 改良キットで陽性, ウイルス分離が陰性の検体がみられ, やや低い値を示した。しかし, これらの不一致例をnested RT-PCR法で確認したところ, すべての検体で型特異的にウイルス遺伝子を検出し, 改良キットの結果が偽陽性でなく型特異的に正確に検出していることが判明した。以上より, 改良キットは感度, 特異性ともに他の市販キットと同等か, やや優れた性能を有し, 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, ポクテム

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外来診療において使用されており, その発売より現在に至るまで患者の診断に威力を発揮してきた¹⁻¹⁰⁾。我々は2002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(シスメックス社, 以下ポクテム)の性能を評価し報告した¹⁰⁾。その後, 同キットの改良がなされ, 今回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株及びインフルエンザB型ウイルス(以下, B型)5株のストックウイルス液を, Madin-Darby Canine Kidney(MDCK)cellに感染させ, 細胞全体に細胞変性効果(CPE)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) A型およびB型以外のウイルス株及び細菌類

A型およびB型以外のウイルス21株(表1)を細胞培養にて増殖させストックウイルス液を調整した。また細菌類25株(表1)を各々の増殖培地で増殖させ、ストック液を調製し実験に供した。

3) 臨床検体

①対象患者

2004年~2005年シーズンに岡本医院, 浜本小児科およびばば小児科の3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。

本研究課題は大阪府立公衆衛生研究所の倫理委員会において承認されている。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承諾が得られた患者から検体を採取した。

②検体採取

採取した臨床検体は, 鼻腔吸引液180例, 鼻腔拭い液84例, 咽頭拭い液17例である。

鼻腔吸引液は, 吸引トラップにキット付属の綿棒を浸漬して, 綿棒に採取した。鼻腔拭い液および咽頭拭い液は, キット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, 操作法に従いポクテムの検体抽出試薬で抽出してポクテム測定用検体(抽出試料)とした。対照検査キット用検体として, それぞれキット毎に1本ずつ綿棒を使用した。

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

表1. ポクテムとの交差反応性の検討に用いたウイルス株と細菌類

ウイルス	細菌類
Adenovirus Type 1	Candida albicans
Adenovirus Type 2	Escherichia coli
Adenovirus Type 3	Enterococcus faecalis
Adenovirus Type 4	Haemophilus influenzae
Adenovirus Type 5	Klebsiella pneumoniae
Adenovirus Type 6	Listeria monocytogenes
Adenovirus Type 7	Moraxella catarrhalis
Coxsackievirus Type A9	Proteus vulgaris
Coxsackievirus Type B5	Pseudomonas aeruginosa
Coxsackievirus Type B6	Serratia marcescens
Echovirus Type 2	Staphylococcus aureus
Echovirus Type 3	Staphylococcus epidermidis
Echovirus Type 6	Streptococcus agalactiae
Echovirus Type 9	Streptococcus group C
Echovirus Type 11	Streptococcus group F
Echovirus Type 25	Streptococcus group G
Echovirus Type 30	Streptococcus mutans
Enterovirus Type 71	Streptococcus pneumoniae
Influenza virus C/JJ/50	Streptococcus pyogenes A
Mumps virus	Streptococcus sanguis
Respiratory syncytial virus	Mycoplasma pneumoniae
	Mycoplasma fermentans
	Mycoplasma hominis
	Corynebacterium diphtheriae
	Bordetella pertussis

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。残る一部を-20℃に凍結保存してnested RT-PCR検査に供した。その内、鼻腔拭い液4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

1) ポクテム(評価キット)

ポクテム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A型およびB型インフルエンザウイルス抗原検出キットである。今回、我々は従来キットおよび改良キットの評価を行った。改良キットの操作法を図1に示す。

2) 対照検査

対照キットとして市販の5キットを使用した。対照キットは、それぞれのキットのマニュアルに従って抗原検出検査を行った。

3. ウイルス分離

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細胞に感染させて培養し、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る染色法で決定した。

4. nested RT-PCR法

臨床検体からのインフルエンザウイルス遺伝子の検出は、定法に従って nested RT-PCR法を用いて行った¹⁴⁾。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ブロットを行って確認した。この方法の検出感度は、ワクチン株を用いた場合 $10^0 \sim 10^4$ FFU/mLである。

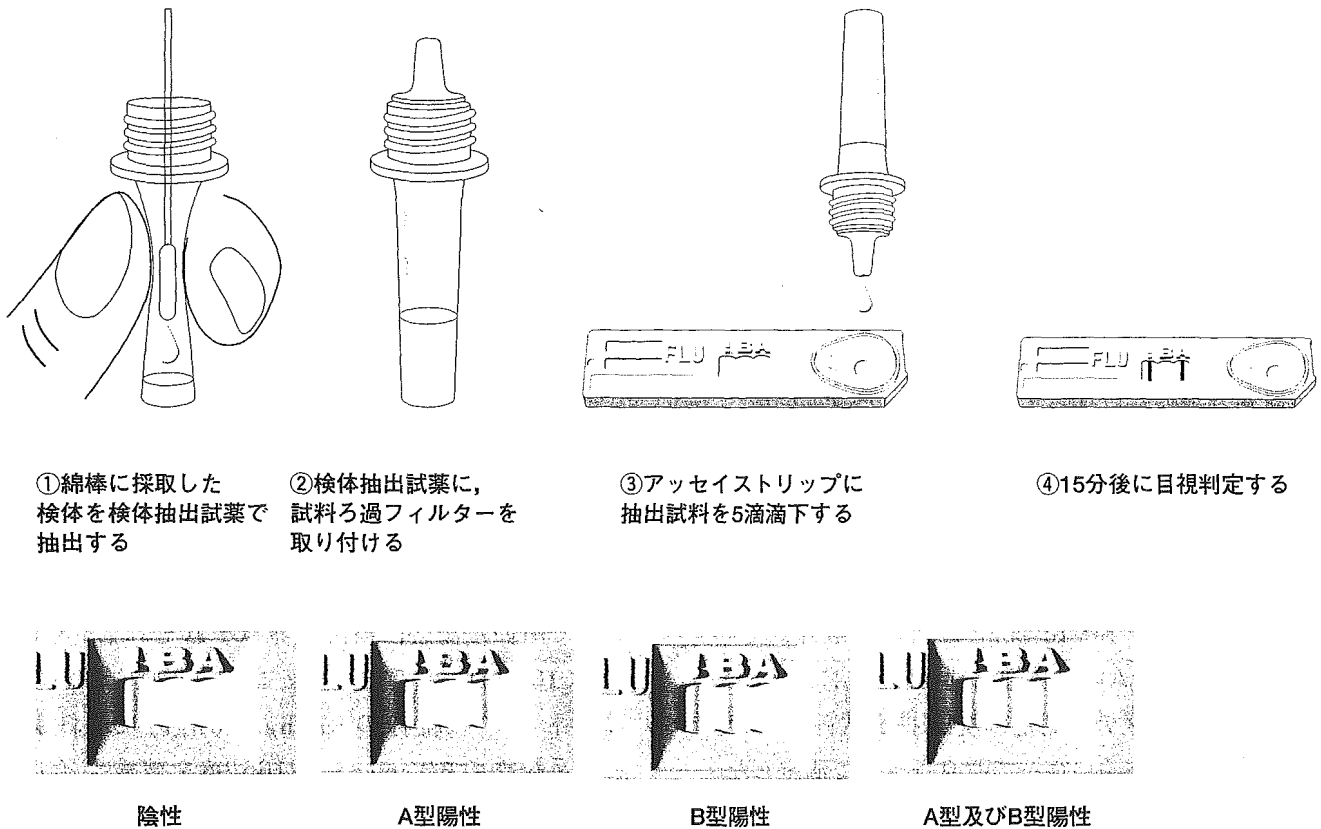


図1. ポクテムの標準操作法

5. 性能評価方法

1) 発色強度の検討

臨床検体(A型1例, B型1例)の抽出試料を検体として, 操作法に従ってポクテムで測定し, 従来キットと改良キットの陽性ラインの発色強度を肉眼的に比較した。

2) 結果判定に必要な反応時間の検討

臨床検体(A型12例, B型14例)の抽出試料を検体として, 操作法に従ってポクテムで測定し, 従来キットと改良キット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, ポクテムは反応開始直後に濾紙上が青く染色され, 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で測定し, 従来キットと改良キット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。

3) インフルエンザウイルスに対する検出感度の決定

A型2株及び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, 改良キットと市販5キットの操作法に従い, 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。

4) インフルエンザウイルス株との反応性の検討

A型のすべての亜型27株及びB型5株のストックウイルス液を 2×10^6 FFU/mLに調製し, その150 μ Lをポクテムの検体抽出試薬0.8mLに加えてよく混和し, ポクテム測定用の検体(抽出試料)とした。抽出試料を操作法に従って改良キットで測定した。

5) A型およびB型以外の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A型およびB型以外のウイルス21株, および細菌類25株(表1)のストック液を 1×10^6 個/mL以上に調製し, その150 μ Lをポクテムの検体抽出試薬0.8mLに加え, よく混和してポクテム測定用の検体(抽出試料)とした。抽出試料を操作法に従って改良キットで測定した。

6) 臨床性能評価

臨床検体(鼻腔吸引液180例, 鼻腔拭い液84例, 咽頭拭い液17例)を改良キットおよび

市販対照キットA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。

結果

1. 改良キットの発色強度の検討

鼻腔拭い液の臨床検体(A型, B型各1検体)について改良キットと従来キットで検査し, 発色強度を肉眼的に比較した(図2)。A, B型双方について, 改良キットは従来キットより発色強度が強くなり, 目視判定がより容易となった。

2. 改良キットの結果判定に必要な反応時間の検討

A型12例, B型14例の臨床検体を用いて, キットの検査反応開始後の陽性ラインが出現する割合を経時的に算出し図3に示した。A型については(図3-a), 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, 現行キットの場合少なくとも18分を要したが, 改良キットでは10分に短縮され相当な改善が認められた。B型についても(図3-b), 15分から7分に短縮された。また, ポクテムは反応直後, 紙全体が青色を帯び, 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3-cに示すように, 改良キットでは従来キットよりバックグラウンドの消失時間が20分から14分と早くなり陽性の確認がより短時間で可能となった。

3. インフルエンザウイルスに対する検出感度の決定

改良キットおよび市販の5種のキットにおける4種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。改良キットでは, 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, 検出限界はそれぞれ 1.3×10^3 , 2.5×10^3 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/Shandong/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 , 5.0×10^2 FFU/mLであった。対照のキットとの比較については, A型のA/Panama/2007/99において,

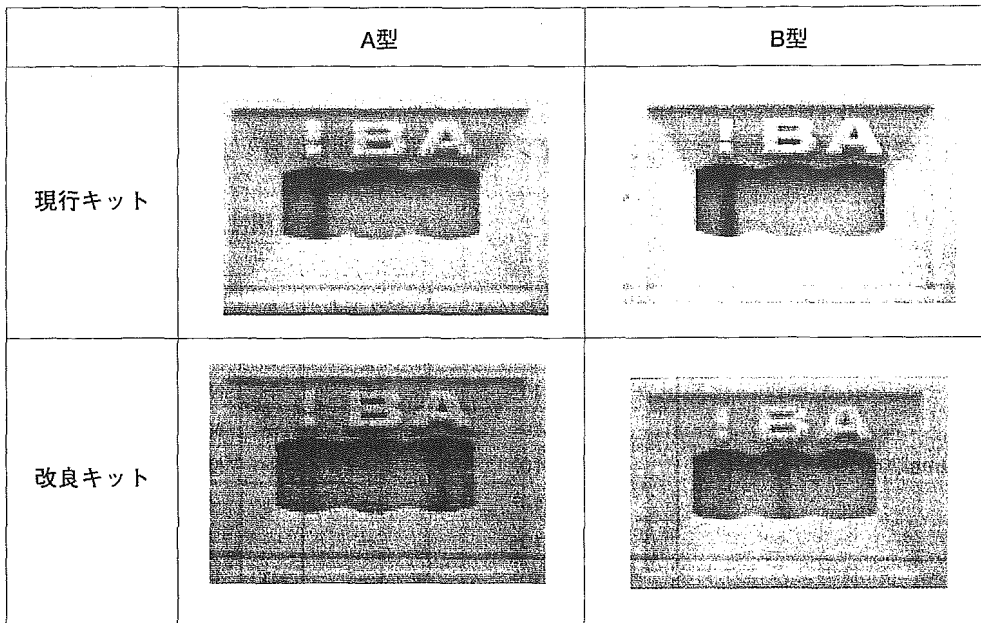


図2. 改良キットと現行キットの発色強度の比較
 同一の臨床検体 (A, B型それぞれ1検体) を用いて改良キットと現行キットで反応させ、陽性ラインの発色強度を示す。

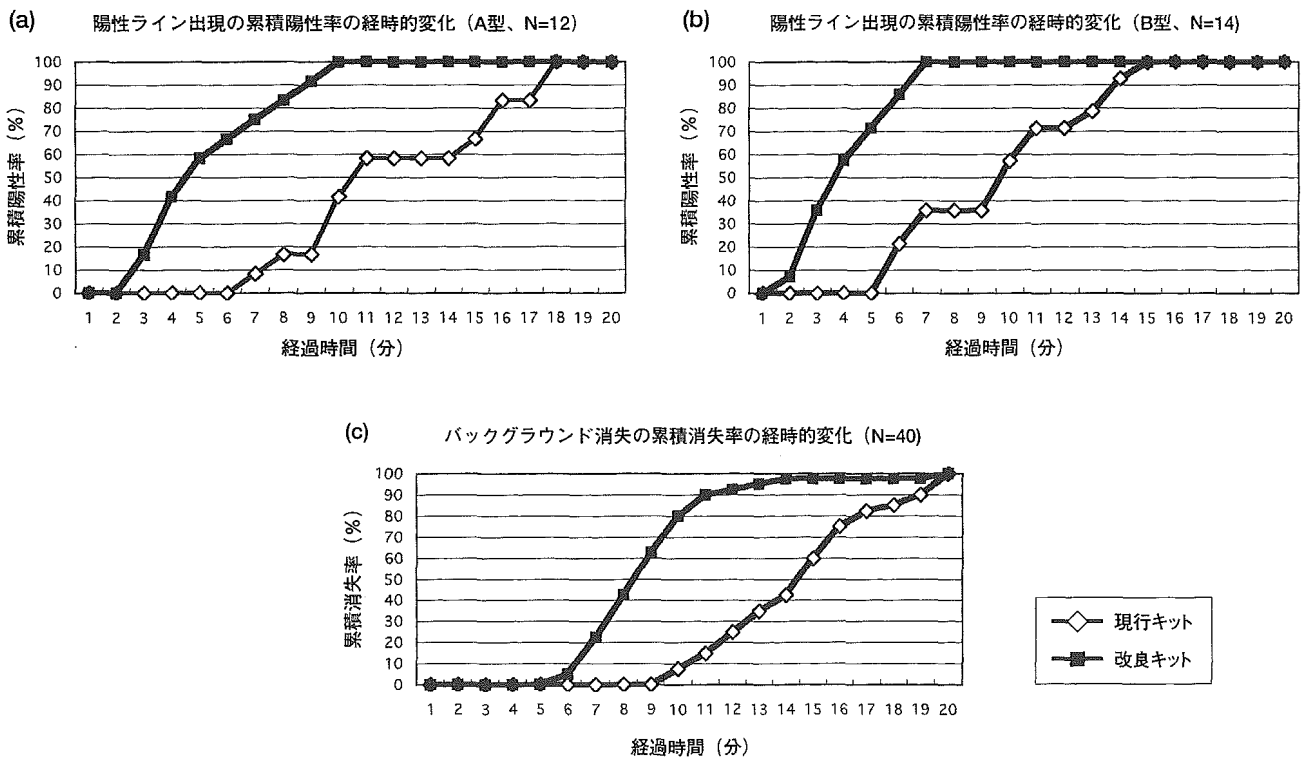


図3. ポクテムの結果判定に必要な反応時間の検討
 ポクテム改良キットでA型 (a) あるいはB型 (b) が陽性であった鼻腔吸引液または鼻腔拭い液の検体それぞれ12あるいは14検体を用いて、改良キットおよび現行キットで同時に反応させ、経時的に陽性と判定した検体の累積陽性率を示す。また、鼻腔吸引液または鼻腔拭い液40検体 (A型12検体、B型14検体、陰性14検体) を用いて、反応後のバックグラウンドが消失した検体の累積消失率を経時的に示す (c)。

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	A	B	C	D	E
A/Panama/2007/99 (H3N2)	2.1×10 ⁴	+	NT	NT	+	+	NT
	1.0×10 ⁴	+	+	NT	+	+	+
	5.2×10 ³	+	+	NT	-	-	+
	2.6×10 ³	+	+	NT	-	-	-
	1.3×10 ³	+	-	+	-	NT	-
	6.5×10 ²	-	-	-	-	NT	-
	3.3×10 ²	-	NT	-	NT	NT	NT
A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)	4.0×10 ⁴	+	NT	NT	+	+	NT
	2.0×10 ⁴	+	+	NT	+	+	+
	1.0×10 ⁴	+	+	NT	+	+	+
	5.0×10 ³	+	+	+	+	+	-
	2.5×10 ³	+	+	+	-	-	-
	1.3×10 ³	-	-	-	-	NT	-
	6.3×10 ²	-	NT	-	NT	NT	NT
B/Shandong/7/97 (ビクトリア系)	3.0×10 ³	NT	NT	NT	+	NT	NT
	1.5×10 ³	+	+	NT	-	+	+
	7.6×10 ²	+	+	NT	-	+	+
	3.8×10 ²	+	+	+	-	+	-
	1.9×10 ²	-	-	+	-	-	-
	9.5×10 ¹	-	-	-	-	NT	-
	4.8×10 ¹	-	-	-	-	NT	-
B/Yamanashi/166/98 (山形系)	4.0×10 ⁴	+	+	NT	+	+	+
	2.0×10 ⁴	+	+	NT	-	+	+
	1.0×10 ⁴	+	+	+	-	+	-
	5.0×10 ³	+	-	-	-	-	-
	2.5×10 ³	-	-	-	-	NT	-
	1.3×10 ³	-	-	-	-	NT	-

対照キットで最も高い検出感度であったBキットと同程度の感度であり、A/New Caledonia/20/99についても対照キットで最も高い検出感度であったA、Bキットと同程度の検出感度を示した。B型のB/Shandong/7/97については、対照キットで最も高い

検出感度であったキットBよりは2倍検出感度が低かったが、キットA、Dとは同程度の高い検出感度であった。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キットA、B、Dよりさらに2倍の高検出感度を示した。

表3. ポクテムと種々のインフルエンザウイルス株との反応性

インフルエンザ A 型ウイルス株	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

インフルエンザ B 型ウイルス株	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

4. 種々のインフルエンザウイルス株との反応性の検討

A型27株及びB型5株に対するポクテムの反応性の結果を表3に示す。改良キットはA型のH1からH15までのすべての亜型27株とB型の5株について型特異的に検出可能であった。

5. A型およびB型以外の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型以外の主に咽頭炎や上気道炎を起こすウイルス21株及び細菌類25株(表1)に対しては、ポクテム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。

臨床性能評価

1. 市販キットとの相関

臨床検体(鼻腔吸引液180例, 鼻腔拭い液84例及び咽頭拭い液17例)に対する改良キットと市販キットAの判定結果の相関を表4に示す。改良キットでの結果は3種の臨床検体において, 市販キットAの結果と高い一致率を示した。双方の結果が一致しない検体についてはより検出感度の高いnested RT-PCR法により確認検査を行った。その結果, 鼻腔吸引液について, ポクテムでB型陽性であり対照キットで陰性である5検体は, nested RT-PCR法ですべてB型陽性であった。また, 鼻腔拭い液について, ポクテムでB型陽性であり対照キットで陰性である1検体は, nested RT-PCR法でB型陽性であった。

2. ウイルス分離との相関

上記臨床検体における, 改良キットとウイルス分離との結果の相関を表5に示す。ウイルス分離陽性は, 鼻腔吸引液180検体で, A型, B型それぞれ27株, 49株であった。ウイルス分離陰性は104検体であった。鼻腔拭い液80検体では, A, B型それぞれ11, 44株が分離され, 25検体が陰性であった。咽頭拭い液17検体では, A, B型それぞれ3, 7株が分離され, 7検体が陰性であった。ポクテムとウイルス分離との相関を比較すると, 鼻腔吸引液ではA型の感度, 特異性はそれぞれ96.3%, 96.7%であり, B型のそれらは100%, 80.2%であった。鼻腔拭い液ではA型の感度, 特異性はそれぞれ100%, 87.0%であり, B型のそれらは97.7%, 91.7%であった。咽頭拭い液ではA型の感度, 特異性はそれぞれ100%, 92.9%であり, B型のそれらは100%, 60.0%であった。ポクテムで陽性を示しウイルス分離が陰性であった検体について, 偽陽性であるのか, あるいは真に陽性であるのかを確認するために, それらの検体についてnested RT-PCR法を用いてインフルエンザウイルス遺伝子の検出を行った。その結果, すべての不一致例(鼻腔吸引液でのA, B型それぞれ4, 26検体, 鼻腔拭い液でのA, B型それぞれ9, 3検体, 咽頭拭い液

表4. ポクテムと市販キットAとの相関性

鼻腔吸引液		対照キットA				計
		A	B	A+B	—	
ポクテム	A	30	0	0	0	30
	B	0	69	0	5	74
	A+B	0	0	1	0	1
	—	0	0	0	75	75
計		30	69	1	80	180

鼻腔拭い液		対照キットA				計
		A	B	A+B	—	
ポクテム	A	20	0	0	0	20
	B	0	46	0	1	47
	A+B	0	0	0	0	0
	—	0	0	0	17	17
計		20	46	0	18	84

咽頭拭い液		対照キットA				計
		A	B	A+B	—	
ポクテム	A	4	0	0	0	4
	B	0	11	0	0	11
	A+B	0	0	0	0	0
	—	0	0	0	2	2
計		4	11	0	2	17

表5. ポクテムとウイルス分離との相関性

1. 鼻腔吸引液		ウイルス分離				計	A型感度 : 96.3%(26/27) A型特異性 : 96.7%(148/153) A型一致率 : 96.7%(174/180) B型感度 : 100%(49/49) B型特異性 : 80.2%(105/131) B型一致率 : 85.6%(154/180) 全体一致率 : 82.2%(148/180)
		A	B	A+B	—		
ポクテム	A	26	0	0	4	30	
	B	0	48	0	26	74	
	A+B	0	1	0	0	1	
	—	1	0	0	74	75	
計		27	49	0	104	180	

2. 鼻腔拭い液		ウイルス分離				計	A型感度 : 100%(11/11) A型特異性 : 87.0%(60/69) A型一致率 : 88.8%(71/80) B型感度 : 97.7%(43/44) B型特異性 : 91.7%(33/36) B型一致率 : 95.0%(76/80) 全体一致率 : 83.8%(67/80)
		A	B	A+B	—		
ポクテム	A	11	0	0	9	20	
	B	0	43	0	3	46	
	A+B	0	0	0	0	0	
	—	0	1	0	13	14	
計		11	44	0	25	80	

3. 咽頭拭い液		ウイルス分離				計	A型感度 : 100%(3/3) A型特異性 : 92.9%(13/14) A型一致率 : 94.1%(16/17) B型感度 : 100%(7/7) B型特異性 : 60%(6/10) B型一致率 : 76.5%(13/17) 全体一致率 : 70.6%(12/17)
		A	B	A+B	—		
ポクテム	A	3	0	0	1	4	
	B	0	7	0	4	11	
	A+B	0	0	0	0	0	
	—	0	0	0	2	2	
計		3	7	0	7	17	

でのA, B型それぞれ1, 4検体)においてインフルエンザウイルス遺伝子をすべて型特異的に検出した。また、鼻腔吸引液においてポクテムでA, B型両陽性、ウイルス分離でB型陽性であった1例はnested RT-PCR法でAH3およびB型両方のインフルエンザウイルス遺伝子が検出された。

考 察

本研究の結果より、改良キットは現行キットより結果判定がより容易であることが示された。臨床検体を用いた場合(図2)発色強度が増強し、また、陽性ラインの出現時間は、現行キットが20分必要であるのに対して、改良キットでは長くとも10分でラインが確認できた(図3)。これらの実験結果は、改良キットで新たに採用されたモノクローナル抗体の親和性(結合力)が、現行キットで使用されている抗体より強いことを示唆している。

改良キットの検出感度は、A型においてはH3N2のワクチン株であったA/Panama/2007/99と昨シーズンのH1N1のワクチン株であるA/New Caledonia/20/99を被検ウイルスとして用いた場合、それぞれ 1.3×10^3 と 2.5×10^3 FFU/mLであり(表2)、また、B型においてはビクトリア系統株のB/Shandong/7/97と山形系統株のB/Yamanashi/166/98を被検ウイルスとして用いた場合、それぞれ 3.8×10^2 と 5.0×10^3 FFU/mLであった。FFU表示の感染価がプラーク法による感染価の約1/10になることを考慮しても、これら検出限界の感染価は既報の種々迅速キットの検出限界値⁷⁾と比較しても遜色ない値であると考えられる。実際、表2においてA型に関しては対照キットと同等あるいは2~8倍優れた感度を有している。B型のB/Shandong/7/97に関しては、B社のキットには2倍劣るものの、他のキットと比較しても同等あるいは優れた結果である。また、B/Yamanashi/166/98に対しては最も検出感度が高く、山形株は2005/2006シーズンのB型の流行予測株であるので本キットの有用性が期待される。

改良キットのインフルエンザ特異性についても、現行キットと同様優れた結果であった(表3)¹²⁾。すなわち、A型のH1からH15までのすべての亜型27株

とB型の5株について型特異的に検出可能であった。また、AおよびB型以外の21種の主に上咽頭に感染するウイルスと細菌25種に対しては反応が認められなかった。改良キットは現行キット同様にH5亜型を検出可能であり、近年、我が国や東南アジア、中国で勃発しているH5亜型のトリインフルエンザに対する診断にも有用性が期待される。

臨床検体を用いた性能評価試験では、対照キットとして市販キットAを用いた。このキットは医療現場で優れた評価を受けているイムノクロマト法による迅速診断キットである。両キットの性能を各種検体(鼻腔吸引液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液)について評価した結果、表4に示すように、A, B型ともに高い一致率を示した。鼻腔吸引液、鼻腔拭い液によるB型に対する検査結果において、改良キットで陽性、対照キットで陰性を示した不一致例、それぞれ5あるいは1検体についてnested RT-PCR法を用いて確認を行った。その結果6検体すべてB型陽性であった。以上の結果より、改良キットは対照キットと比較して同等あるいはやや優れた性能を有すると考えられる。

同じ臨床検体を用いて、ポクテム改良キットとウイルス分離との結果の相関性を検討した(表5)。3種(鼻腔吸引液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液)のいずれの臨床検体においても、A型、B型ともに高い検出感度を示した。特異性については、鼻腔吸引液でのA型、鼻腔拭い液でのB型、咽頭拭い液でのA型では高い特異性を示したが、残り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、偽陽性であるのか、あるいは真に陽性であるのかを確認するために、nested RT-PCR法を用いてウイルス遺伝子の検出を行った。その結果、すべての不一致例において、型特異的にウイルス遺伝子を検出した。この結果により、ポクテムでの結果が正しく、偽陽性ではないことが明確となった。結果的にウイルス分離よりポクテムの検出感度が高い結果となったが、この理由は不明である。可能性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。nested RT-PCR法がより感度が高く Gold standardとなりえるので、今後はnested RT-PCR法での結果との相関性を検討する必要があると考えられる。

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(ディレクトイジェン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, 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評価, インフルエンザ. 3: 105~109, 2002.
- 12) 奥野良信, 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「ボクテムインフルエンザA/B」の評価, 医学と薬学. 48: 895~904, 2002.
- 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, 381~382, Washington DC American Society for Microbiology, USA, 1993.