

**厚生労働科学研究費補助金**  
**(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)**  
**分担研究報告書**

**ウイルス感染症の迅速診断キットに関する研究**

研究分担者 多屋 馨子 (国立感染症研究所・感染症疫学センター)

研究協力者 荒木 和子、佐藤 弘、新井 智、奥野英雄

(国立感染症研究所・感染症疫学センター)

**研究要旨**

近年、様々な迅速診断キットが開発され臨床現場で用いられている。特にインフルエンザは治療薬の普及とともに、さらに 2008/9 シーズンの A(H1N1) pdm09 ウイルスによるパンデミックを期に新たな迅速診断キットが市販され、診断に用いられている。これらのキットによる診断は、治療薬投与の指標のみならず、本邦における流行状況の把握と対策にも関与している。各々のインフルエンザ迅速診断キットにおいて、最少検出感度が添付文書に記されているが、その検出法および検討に用いられたウイルス株はキットによって異なっており、添付文書のみによるキット間の比較は困難である。年々新たなキットが市販される一方、製造販売中止となるキットもある。我々はこれまでの研究において、各流行年に主に用いられたインフルエンザ迅速診断キットの検出感度について研究を行ってきた。研究過程において、検出感度の比較、特にウイルス株の違いによる検出感度の比較を目的とする場合、各ウイルス株の条件をそろえる事は容易ではないことが判明した。当該研究においてインフルエンザ迅速診断キットの比較検討を行うにあたり、検体とするウイルス液の調整のための基礎的研究も行うこととした。また、昨年度臨床現場で多く用いられた上位 10 種を対象とし、A 型 (H1N1pdm09 および H3N2 亜型) に対する最少検出感度について検討した。

**A. 研究目的**

インフルエンザ迅速診断キットによ

る診断レベルの向上を目的とし、診断キットの比較検討を行う。

## B. 研究方法

実験には以下 12 種のウイルス株(継代数の異なる、または野生株/ワクチン株の同一ウイルス株を含む)を用いた。野生株; A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 -4<sup>th</sup>、A/California/7/2009(H1N1) pdm09 -5<sup>th</sup>、A/Tokyo/150/2008(H1N1)、A/Tokyo/155/200(H3N2)、B/Tokyo/240/2008、B/Tokyo/241/2008。

ワクチン株; A/California/7/2009(H1N1) pdm09、A/Texas/50/2012(H3N2)-1119、A/Texas/50/2012 (H3N2) -1120、B/Brisbane/60/2008、B/Wisconsin/01/2010、B/Massachusetts/2/2012。

ウイルスは MDCK 細胞で培養し、その上清を用いた。

検体として用いるウイルス液の基礎的情報を得るため、異なる測定法によりウイルス量/力価の測定をおこなった。用いた測定法は以下に示すとおりである。

- 1) SYBR green 法による Real-time PCR
- 2) 感染価測定法 (Plaque forming unit 法および TCID<sub>50</sub> 法)
- 3) HA 法

インフルエンザ迅速診断キットは 2012/13 流行年において臨床現場で多く用いられ、かつ 2013 年 11 月において入手可能であった上位 10 種(以下)を対象とした。キットの選択にあたっては、「ML インフルエンザ流行前線情報データベース: プロジェクトリーダー砂川

富正 / DB 管理人西藤なるを」  
<http://ml-flu.children.jp/>を参照した。

製品名{製造販売元}; クイックナビ-Flu {デンカ生研(株)}、イムノエース flu {(株)タウンズ}、クリアライン Influenza A/B(H1N1)2009{アリーアメディカル(株)}、エスプラインインフルエンザ A&B-N {富士レビオ(株)}、チェック Flu A・B {ロート製薬(株)}、ラピッドテスト カラー-FLU スティック {積水メディカル(株)}、クリアビュー-influenza A/B {インバネス・メディカル・ジャパン(株)}、ブライトポック Flu {シオノギ製薬(株)}、Quick Vue ラピッド SP influ {DS ファーマバイオメディカル(株)}、プロラスト Flu {三菱化学メディエンス(株)}

A 型ウイルス {H1N1(n=4) および H3N2(n=2)} に対する上記 10 種の迅速診断キットデバイスの最少検出感度を調べた。検体とするウイルス液の調整は Real-time PCR 法によるコピー数を基準とした。各ウイルスを 10<sup>0.5</sup> 段階希釈し、一定量のウイルスを各キット添付マニュアルに従い添加した。

## 倫理面への配慮

用いたワクチンウイルス株、および A/California /7/2009 (H1N1) pdm09 野生株は国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センターより分与を受けた。その他の野生株は厚生労働科学研究費補助金(医薬品・医療機器等レギュ

ラトリーサイエンス総合研究事業)ウイルス感染症の体外診断薬の再評価に関する基盤整備に関する研究により分離された株を用いた。平成 19 年度第 4 回国立感染症研究所医学研究倫理審査委員会(平成 20 年 2 月 6 日)で承認。

## C. 研究結果

### 1) 測定法によるウイルス量/力価の比較

4 種の異なる測定法で 12 株のウイルス液のウイルス量/力価の測定を行い、測定法間の相関を調べた。その結果、A 型(n=5)では Real-time PCR 法によるコピー数と感染価(PFU および TCID<sub>50</sub>)で相関が見られなかったが、その他の方法間では相関係数 0.62-0.96 の相関があった。B 型(n=7)では相関係数 0.66-0.99 の相関があった。

### 2) A 型インフルエンザウイルス株に対するキットデバイスの検出感度の比較

各 A 型インフルエンザウイルス株に対する 10 種類のキットの最少検出感度の差は  $10^1 \sim 10^{2.0}$  であった。

A/California/7/2009 (H1N1) pdm09 株については継代数または野生株/ワクチン株と異なる 3 株について検出感度の測定を行ったが、10 キットデバイスにおける各株の最少検出感度平均値は  $10^{2.9}$ 、 $10^{4.6}$  および  $10^{3.25}$  と違いがあった。H3N2 亜型の野生株およびワクチン株の最少検出感度平均値は  $10^{4.6}$  および  $10^{4.7}$  と同程度であった。

10 種のキットデバイスにおける、ウイルス株別の最少検出感度は、上記のように差がみられたが、キット別の検出感度を比較すると、ある株に検出感度が高いキットは、他の株に対しても感度が高い傾向があった。また、逆に検出感度が劣るキットは、いずれの株に対しても劣る傾向があった。

## D. 考察

4 種の異なる測定法で 12 株のウイルス液のウイルス量/力価の測定を行った結果、一部のウイルス液において、Real-time PCR によるコピー数と感染価(PFU および TCID<sub>50</sub>)間において相関が見られなかった。迅速診断キットはモノクローナル抗体により、ウイルス核タンパク質を検出するのに対し、他の検出法では、ウイルス遺伝子、感染性粒子または外殻抗原の検出であり、検出している内容が異なっている。ウイルス核タンパク質の正確な定量は困難であることから、他の測定法によるウイルス量を基準にせざるを得ないが、対象抗原が異なることから、ウイルス亜型、または株間の違いとは別に、培養ウイルス液による違いが生じる可能性がある。しかしながら、遺伝子、感染粒子および HA 抗原と異なる抗原測定において、その測定値間で高い相関性があるウイルス液であるなら、ウイルス核タンパク質量との相関性も高いことが考えられる。今回、一部のウイルス株において Real-time PCR

法によるコピー数と感染価の相関が低かった理由として、これらの株におけるウイルス培養条件が適切でなかった可能性がある。また、Real-time PCR 法によるコピー数の測定値に誤りがあった可能性も考えられる。SYBR green 法による Real-time PCR 法において、その測定値の不安定要因として、RNA 抽出効率、RT 効率、PCR 効率、SYBR 取り込み効率等があげられる。他の測定法と異なり、遺伝子増幅による測定であるため、効率の違いによる僅かな違いが大きな差となる可能性がある。今後、Real-time PCR 法の精度を高める事についても検討したい。

迅速診断キット 10 種における A 型株に対する最少検出感度の差は  $10^1 \sim 10^{2.0}$  であった。2010/11 シーズンに用いられた 12 種の迅速診断キットの比較では  $10^{3.0}$  の差があった。検出感度の低いキットが販売中止となった結果、キットによる検出感度の差が少なくなったといえる。しかし、新しく開発されたキットの検出感度が必ずしも高いわけではなく、A 型株 6 株すべてにおいて最も検出感度が優れていたのは、10 種のキットの中で販売承認年が最も古いキットであった。

型別検出に加え H1N1 亜型の検出が可能なキットは、2009 年に世界的大流行を起こした A (H1N1) pdm09 株によるインフルエンザの臨床症状がそれまでの季節性インフルエンザと異なり、ウ

イルス性肺炎発症例が多かった、また喘息の既往歴があった小児で突然の呼吸状態の悪化などが報告されていたことから、臨床的対応に役立てることも目的の一つとして開発されたと考えられる。しかしこのキットの A/California/07/2009pdm に対するデバイス最小検出感度は A 型検出については他のキットと同等であるものの、H1N1 亜型に対する検出感度はその  $1/100$  であった。今回の検出感度の比較においてこのキットについては H1N1 亜型ではなく A 型に対する検出成績を用いたが、H1N1 亜型に対する検出感度が低いことは特に H1N1 株流行時において、検体採取の時期によっては亜型判定を誤る可能性がある。

今回検討した 10 キットの臨床現場での使用割合は参照したデータベース上において全体の約 70%相当であった。

## E. 結論

迅速診断キットによる検出対象がウイルス核タンパク質であることから、一般的なウイルス測定法によって測定したウイルス量を基準として、ウイルス株間における迅速診断キットの検出感度を比較することは困難である。しかし、1 ウイルス株 (同一ウイルス液) に対する迅速診断キットの検出感度の比較は可能である。今回実施した 10 種類の迅速診断キットにおける A 型 6 株の最少検出感度の差は最大  $10^{2.0}$  であった。以前よりキット間における検出感度の差

は小さく、また検出感度も向上していることから、臨床現場で多く用いられている迅速診断キットの信頼度は高くなっていると考えられた。

## **G . 研究発表**

### **1 . 論文発表**

なし

### **2 . 学会発表**

なし