

[原 著]

イムノクロマト法インフルエンザウイルス抗原検出キット BD ベリターシステム Flu
における機器判定の感度とその目視判定に対する優越性の検討

山口育男¹⁾・青山知枝¹⁾・山本 優¹⁾・木下恵子¹⁾・伊藤由美¹⁾・西村秀一²⁾

¹⁾ 豊橋市民病院中央臨床検査室

²⁾ 独立行政法人国立病院機構仙台医療センター臨床研究部ウイルスセンター

(平成 25 年 4 月 30 日受付, 平成 25 年 7 月 31 日受理)

インフルエンザウイルス抗原検出キットは、その迅速性と簡便性からイムノクロマト法を用いたものが主流であり、診断に幅広く活用されている。しかし、簡便である一方でその判定結果の信頼性については常に注意が必要である。目視による人為的な判定の過ちや判断基準の違い、キットによる違いなど、より良い診断のためにはその実態について十分に理解を深める必要がある。今回我々は、専用のデンシトメトリー分析装置によりイムノクロマト法の結果判定を行う BD ベリターシステム Flu を使用し、目視判定と機器判定の感度の差異を検証する試験を行った。臨床検査技師を含む病院関係者計 84 名を職種ごとに 3 つのグループに分けて、それぞれのグループで判定を行い、デンシトメトリー分析装置による判定と比較検討を行った。その結果、キット付属のポジティブコントロールを検出限界付近濃度に調整した試料において機器判定と目視判定の結果に差異が認められ、その程度はグループ間で異なっており、またグループによっては個人差が大きかった。また、BD ベリターシステム Flu と市販されている既存の目視判定を行うインフルエンザウイルス抗原検出キットとの間にウイルス抗原検出感度に性能差があるか否かを検証した。近年分離されたインフルエンザウイルス A 型 H1N1 (Seasonal: 2009 年) 株, A 型 H1N1 (Pandemic: 2009 年) 株, A 型 H3N2 (Seasonal: 2012 年) 株および B 型 (Seasonal: 2012 年) 株の細胞培養液を使用し最小検出感度ならびに検出までの時間を比較した。その結果、調査対象の全ウイルス標品において BD ベリターシステム Flu による機器判定が、既存のキットによる目視判定に比べ高い検出感度を示し、また検出に要する時間が短かった。以上のことから感度、特にウイルス含有量の低い検体での検査感度において、従来のイムノクロマト法での目視による検査に比べ高い検出性能を持つことが示された。

Key words: インフルエンザ, 抗原検出キット, イムノクロマト, デンシトメトリー, ベリター

序 文

インフルエンザウイルスの増殖速度は速く、生体においても感染から発症までの潜伏期は 1~3 日とされ¹⁾、ボランティアに対する感染実験では産生されるウイルス量と発熱の間には密接な関係があり、ウイルス量がピークに達する 48 時間前後が最も高熱期であ

るという結果が示されている¹⁾。このように、感染後爆発的に増殖するインフルエンザウイルスの治療においては、発症早期における抗インフルエンザ薬の治療開始が重要視されている²⁾。しかしながら、感染初期の患者ではインフルエンザウイルスが十分に増殖しておらず、従来のイムノクロマト法では発症から 6 時間以内における検出感度が問題視されている報告もある³⁾。特に、イムノクロマト法では検出限界付近においてテストラインの発色が薄く出る傾向にあり目視による結果判定に苦慮することもあることから、このような時期においてはできる限り客観的な判定が求められる。そのため、今回我々は近年新しく発売された BD

著者連絡先: (〒441-8570) 愛知県豊橋市青竹町字八間西 50 番地
豊橋市民病院中央臨床検査室
山口育男
TEL: 0532-33-6111 (内線 2227)

Table 1. Influenza viruses used in this study

Type	Subtype	Virus Strain	Log ₁₀ Copies/mL
A	H1N1	2009 Seasonal	9.08
A	H1N1	2009 Pandemic	9.26
A	H3N2	2012 Seasonal	8.67
B	-	2012 Seasonal	11.2

ベリターシステム Flu に注目し、その評価試験を行った。BD ベリターシステム Flu は、基本的にはイムノクロマト法によって抗原を検出する方法だが、テストラインの読み取りを専用のデンシトメトリー分析装置により行う製品である。また、その原理等の詳細は公開されていないものの、非特異反応が予想される様々なヒト由来因子との反応性の検証も同時に行うとされている。すなわち、読み取り部のラインのシグナル強度からテストラインのそれを自動的に減じ、これにより実際の臨床検体での目視検査でしばしば見られる偽陽性を防ぐとされている点に新規性がある。

今回我々は、この判定システムのうち感度に関わる部分の性能評価を目的とし、検出性能を複数人による目視判定と BD ベリターシステムリーダー（以下専用リーダーとする。）による機器判定との間で比較検証した。なお、この検証については、テストラインの陽性判定の原理・構造が、従来のイムノクロマト法と同等のものであること、さらに本研究での材料が、純粋なウイルス抗原に近く非特異反応のおそれは考慮しなくて良いことから、感度に特化した比較が可能となった。

さらに我々は、実際に他の市販品3種のインフルエンザウイルス抗原検出キット、エスプライン（富士レジオ株式会社）、クイックナビ-Flu（デンカ生研株式会社）、イムノエース Flu（株式会社タウンズ）での目視判定と、デンシトメトリー分析装置との間で、感度ならびに検出までの時間を比較したので報告する。

材料と方法

1. 標品ウイルス抗原

1-1. 主観的な目視判定と専用リーダーによる判定の比較評価試験では、キットに付属する陽性コントロールを用いた。

1-2. キット間の感度比較試験では、Table 1 に示すインフルエンザウイルスを標品抗原として用いた。これらは、感染者から分離されたウイルス株を MDCK 細胞で増殖させ UV 照射により不活化したものである。

Table 2. Standard influenza virus-antigens used for judgment-agreement tests between visual judgment and densitometry reading

Type	Classification	Virus Antigen Concentration [†]
A	Weak Positive	3.5 ~ 7.0 × 10 ² TCID ₅₀ /mL
A	Strong Positive	0.7 ~ 1.4 × 10 ³ TCID ₅₀ /mL
B	Weak Positive	4.4 ~ 8.8 × 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
B	Strong Positive	1.8 ~ 3.6 × 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL

equivalent value using standard curve of reflection luminosity-intensity

2. キットの判定方法

目視判定と専用リーダーの比較評価試験では当院の職員と学生合計 84 名をそれぞれの職域ごとに臨床検査技師を第 1 グループ、看護学生を第 2 グループ、検査室職員（助手・看護師・看護学校教員等）を第 3 グループとし、試験を実施した。各グループの平均年齢は第 1, 2, 3 グループでそれぞれ 40.0 歳（標準偏差：12.2）、19.4 歳（標準偏差：3.7）、45.3 歳（標準偏差：9.5）となる。試験実施者は事前に BD ベリターシステム Flu の迅速診断キットの使用法についての簡単な説明を受けた後、イムノクロマト上におけるテストラインの有無の目視判定を行い結果を記録した。それと並行して特定の検査員が専用リーダーの読み取りを行い、目視判定と専用リーダーによる判定の結果を照合させ、後者に対する前者の判定一致率を調査した。

キット付属のウイルス陽性コントロールを生理食塩水で希釈し、高濃度の抗原量に調整したものを「Strong Positive」とし、検出限界付近の低濃度に調整したものを「Weak Positive」とした。インフルエンザウイルス A 型、B 型それぞれ Strong Positive 同士、Weak Positive 同士、同程度の反射光度になるよう希釈調整し、試料とした。それらの抗原量に相当するウイルス量を Table 2 に示す。また、ウイルス抗原を含まない陰性コントロールを「Negative」とし、本試験に用いた。これらの各試料はキット付属の抽出試薬に加え、テストプレートへ滴下した後、本キットの定める判定時間（10 分）経過の後に目視による結果判定と専用リーダーによる結果判定を行った。

3. キット間の感度比較

検出性能評価試験で BD ベリターシステム Flu の対象としたキットは、市販されているエスプライン（富士レジオ株式会社）、クイックナビ-Flu（デンカ生研株式会社）、イムノエース Flu（株式会社タウンズ）で、いずれも目視判定を行う方法であり、その感度に関しては定評がある⁴⁾⁵⁾。測定原理はすべてイムノクロマト

Table 3. Rapid diagnosis kits used in sensitivity-comparison tests

Rapid Diagnostic Kit	Company	Method (label)	Reagent Volume	Reaction Time	Reading
BD Veritor System Flu	Becton Dickinson Co., Ltd.	IC (Gold)	400 μ L	10 min	Device
Espline	Fujirebio Inc.	IC (ALP)	200 μ L	15 min	Visual
Quick Navi Flu	Denka Seiken Co., Ltd.	IC (Latex)	350 μ L	8 min	Visual
ImmunoAce Flu	Tauns Laboratories, Inc.	IC (Platinum)	700 μ L	8 min	Visual

Table 4. Agreement ratios between visual judgment and densitometry reading among three groups

	Type A		Type B		Negative	Total
	Strong	Weak	Strong	Weak		
Group 1						
Tested No.	84	28	56	56	56	280
Judgment	Same		Same		56	266
	Different		Different		0	14
Agreement Ratio (%)	98.8	60.7	100.0	96.4	100.0	95.0
Group 2						
Tested No.	120	40	80	80	80	400
Judgment	Same		Same		80	377
	Different		Different		0	23
Agreement Ratio (%)	98.3	67.5	98.8	91.3	100.0	94.3
Group 3						
Tested No.	48	16	32	32	32	160
Judgment	Same		Same		32	133
	Different		Different		0	27
Agreement Ratio (%)	85.4	43.8	90.6	75.0	100.0	83.1

法であるが、発色色素がそれぞれ、金コロイド、アルカリホスファターゼとその基質による発色反応、着色ラテックス（粒子）、および白金コロイドと異なっている。それらの概要を Table 3 に示す。

Table 1 に示した標品ウイルス抗原を生理食塩水にて2倍階段希釈したものを試料とし、それぞれのキットでの陽性反応を示す最大希釈度を指標にキットの相対評価を行った。陽性判定はキットにより最終判定時間より早く判定できるものもあるため（クイックナビーFlu、イムノエースFlu添付文書参照）、テストプレートへの試料滴下からコントロールラインおよびテストラインの発色反応が認められるまでの時間の記録も行った。BD ベリターシステムは専用リーダーにより行い、その他キットの目視判定は検査に精通した検査技師が、試料滴下後に Table 3 に示した各キットの指定反応時間経過後に実施した。上記の試験では、定められた判定時間内に専用リーダーあるいは目視判定で陽性とされた時間を記録することで、キット

間の陽性判定に必要とされる時間を比較した。

結 果

1. 目視判定と専用リーダーによる判定の比較評価

Table 4 には、専用リーダーによる機器判定を基準にした目視判定結果との一致率を被験者グループごとに示した。第3グループでは Strong Positive 検体に対して、A型ウイルスでは85.4%、B型ウイルスでは90.6%と一致率が劣るものの、第1、第2グループではA型及びB型ウイルスとも98.3~100%と高い一致を示した。その一方で、Weak Positive 検体の正答一致率は、A型では Strong Positive 検体との比較時に比べ著しく低く、第1、第2グループでそれぞれ4割、3割減、第3グループに至っては、5割減という結果となった。B型では、Weak Positive 検体もA型より比較的高い一致率となった。3つのグループのうち第3グループが、すべての陽性コントロールで第1、第2グループに比べ一致率が低かった。

Table 5. Sensitivities of four rapid diagnosis kits to influenza viruses

Virus Strain	BD Veritor System Flu	Espline	Quick Navi Flu	ImmunoAce Flu
A/H1N1 Seasonal 2009	× 32 (7.6)	× 16 (7.9)	× 16 (7.9)	× 16 (8.2)
A/H1N1 Pandemic 2009	× 8 (8.4)	× 2 (9.0)	× 1 (9.3)	× 1 (9.3)
A/H3N2 Seasonal 2009	× 512 (6.0)	× 128 (6.6)	× 64 (6.9)	× 64 (6.9)
B Seasonal 2009	× 128 (9.1)	× 16 (10.0)	× 16 (11.2)	× 32 (9.7)

The maximum dilutions of the virus solution and its absolute concentration (\log_{10} copy number/ml) for positive judgment

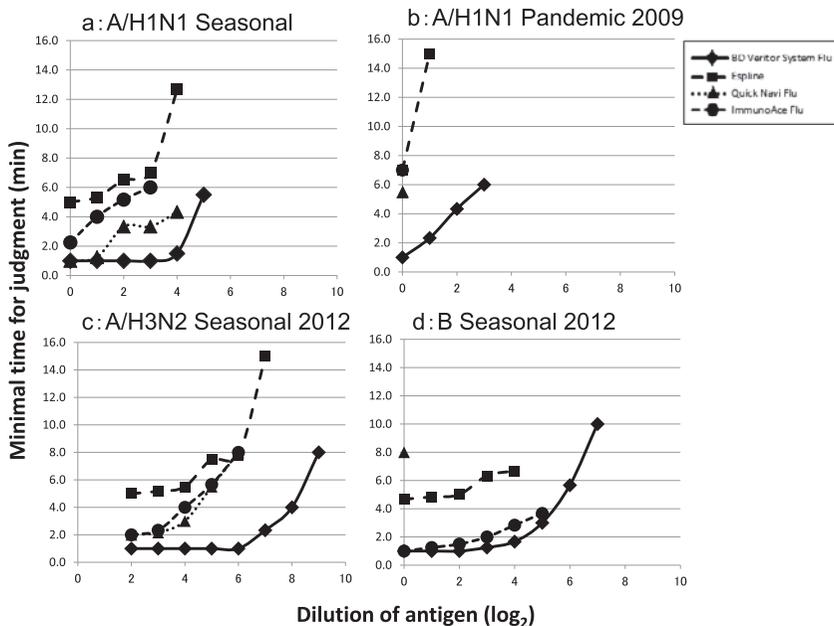


Fig. Time required for each kit test show the positive result to each concentration of the virus
a: For A/H1N1 Seasonal 2009; b: for A/H1N1 Pandemic 2009; c: for A/H3N2 Seasonal 2012; d: for B Seasonal 2012

2. キット間の感度比較

キットの最小検出感度には差が認められ、今回比較検討した4製品の中でBDベリターシステムFluは、今回用いたいずれのインフルエンザウイルス抗原においても最も高い倍率で希釈した試料において陽性結果を示した。(Table 5) さらに、陽性判定に至る速さについて調査した成績をFig.に示す。これは、各ウイルス及び各キットの組み合わせで、陽性判定が可能であった最小時間を抗原希釈度ごとにプロットしたものである。これによれば、ウイルス抗原量が高い範囲にある場合には各キットの判定時間は、A/H1N1 Pandemic 2009の場合を除いて、比較的一定だが、濃度が低く検出限界に近づくにつれて判定時間と希釈倍率すなわちウイルス抗原量の間に相関性が認められた。

また、機器判定であるBDベリターシステムFluが最も早い時間で陽性を示した。

考 察

本研究では、標品ウイルスに対するデンシトメトリー分析装置による検出感度が、同一キットでの目視による主観的判定ならびに他の目視判定によるキットに比べ優越性を示す結果となった。迅速診断キットにおいては、人の目視判定、特にラインが薄く見えにくい場合、主観的要素が大きくかかわることは経験的に良く知られているが、今回の試験ではそれを数値として示すことができた。

目視判定と専用リーダーによる判定の比較評価試験の結果において、感度差以外で注目すべきは、目視判

定では個人差によるばらつきがあったことである。第1, 第2グループで専用リーダーによる結果との一致率は、全体として94.3~95%と第3グループと比較して高かったが、これは第1グループについては検査業務に精通した技師の集団であったことが考えられ、目視判定にはある程度の熟練度が必要であることが示唆された。第2グループについては看護学生の集団であり、検査業務未経験という点では第3グループと同じではあったものの、同グループに比べ明らかに若い年齢層であったため、第3グループの構成員と比べ視力的な差異があったために高い一致率を示したものと思われる。BDベリターシステムFluを用いることにより、イムノクロマト法でテストラインでの発色が薄く判定が困難な検体の検査結果を高感度で客観的に判定することができ、従来目視判定で起こりうる陽性例の見逃しを少なくする効果があるものと考えられた。

今回の成績をウイルスの型別に見ると、B型での目視判定がA型に比べ成績が約3割から7割も良く、B型の目視判定が容易であった結果となっている。これは、一見B型ウイルスに対する性能の良さを示しているようだが、実際には試験に用いた抗原の絶対量の違いに起因した可能性が高い。抗原の調製においては、A型、B型それぞれStrong Positive 同士、Weak Positive 同士、専用リーダーで同程度の反射光度になるよう希釈調整して試験に用いたが、抗原量的には、感染性ウイルス量換算でB型はA型に比較して濃度上、100倍近く高濃度となっていた。これは、本キットのイムノクロマト法のテストラインの読み取りに関して、専用リーダーの読み取りとヒトの目視によるラインの把握に、質的違いがある可能性が示唆される成績である。従来品のキットを用いた試験ではインフルエンザウイルスB型に関する感度を問題視する報告⁶⁾もあり、それは臨床検体中の抗原量が少ないことに起因するとしている。

しかし、a) 専用リーダーで同程度の反射光度になるよう希釈調整した検体の絶対的抗原量が、感染性ウイルス量換算でB型がA型に比較して100倍近く高かったこと、b) キット間の性能比較においても、最小検出感度がどのキットでもA型に比較して格段に高かったことから、臨床検体の抗原量の問題ではなく、B型ウイルスに対するキットの検出感度がA型に比べかなり低いことが示唆された。その原因として、もっとも考えられるのは、キットに使用されている抗B型ウイルス抗体の抗原捕捉性能がA型に比べ十分ではないことである。今後、より良い抗体をつくる努力が求められる。

H1N1 Pandemic 2009に関する最小検出感度は、いずれの検査キットにおいてもH1N1 Seasonal 2009に比べ低かったが、CDCの指摘⁹⁾にあるように、遺伝子診断と比較して従来型のイムノクロマト法での診断の感度の低さを考慮すれば⁹⁾最終判定には偽陰性に対して注意が必要である。本研究ではBDベリターシステムFluがH1N1 Pandemic 2009に対して他の3種のキットに比較し高い最小検出感度を示す結果が得られた。また、本キットは、米国で2012年に出現したH1 Pandemic 2009のM遺伝子を持つ変異型インフルエンザウイルスH3N2vに対して、調査したキットのうち唯一高い検出性能を示したとのCDCの報告¹⁰⁾もあり、そうした新登場のインフルエンザへの臨床現場での有用性について、少なくとも感度の面では期待できるかもしれない。

検出性能評価試験で、イムノクロマト法の最小検出感度にキットの種類およびウイルス抗原の種類による明らかな違いが認められたが、その実用上の評価については、注意が必要である。キットの最小検出感度は使用するウイルス抗原により異なる可能性もある上、本検討は特定キットの一面の優劣を見たものに過ぎず、総合的評価というわけではないからである。キットは、感度以外にも実際の臨床検体での検査の際に問題になる特異度をはじめ操作性、コスト、迅速性など多種多様なファクターが考慮された上で臨床現場に採用されるべきものである。

特異度という観点からは、本研究では非特異反応については考慮する必要がなかった。これは用いられた材料が、実験室でウイルスを増やした培養上清や蛋白発現系で作られ精製されたキット付属の陽性コントロールといった比較的英雑物が少なくウイルス純品に近い標品での試験であったためである。一方で、本研究では主に感度を検証したが、本試験に用いたBDベリターシステムFluの他製品と比較した大きな利点は、非特異反応を減じる工夫がなされていることである。これについては理論的正当性も含めた幅広い検証が必要である。そのためには、今後、そのメカニズムのメーカー側からの情報開示ならびに、ヒト由来の細胞成分が豊富に含まれる臨床検体での特異度に注目した性能検証が必須である。

文 献

- 1) 加地正郎. 1998. p. 31-35 インフルエンザとかぜ症候群 (第2刷). 南山堂.
- 2) 社団法人日本感染症学会・新型インフルエンザ対策委員会. 2011. p. 1-11 社団法人日本感染症学会提言

- ～抗インフルエンザ薬の使用適用について（改訂版）～。
- 3) 新藤静生, 高橋好生, 西村秀一, 他. 2004. 7. インフルエンザの診断—小児科領域における臨床診断と迅速診断キットによる診断について. インフルエンザ 5: 227-233.
 - 4) 徳野 治, 藤原美樹, 熊谷俊一, 他. 2009. 各種インフルエンザ迅速診断キットの評価—検出感度の比較検討. 感染症誌 83: 525-533.
 - 5) Sakai-Tagawa, Y., M. Ozawa, Y. Kawaoka, et al. 2010. Sensitivity of Influenza Rapid Diagnostic Tests to H5N1 and 2009 Pandemic H1N1 Viruses. J. Clin. Microbiol. 48: 2872-2877.
 - 6) 三田村敬子, 山崎雅彦, 菅谷憲夫, 他. 2004. イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法をくみあわせた原理によるインフルエンザ迅速検査キットの検討. 感染症誌 78: 597-603.
 - 7) 原三千丸, 貞升健志, 宮崎佳都夫, 他. 2006. リアルタイム PCR 法との比較による A 型および B 型インフルエンザ迅速診断キットの評価. 感染症誌 80 (5): 522-526.
 - 8) Balish, A., et al. 2009. Evaluation of Rapid Influenza Diagnostic Tests for Detection of Novel Influenza A (H1N1) Virus—United States. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report 58 (30): 826-829.
 - 9) 藤間昭勝, 岡田清美, 福島喜代康, 他. 2011. インフルエンザ (H1N1) 2009 の遺伝子診断キットの感度試験に関する検討. 北里医学 41: 1-7.
 - 10) Shawn, R., C. Craig, et al. 2012. Evaluation of Rapid influenza Diagnostic Tests for influenza A (H3N2v) Virus and Updated Case Count—United States. CDC Morbidity and Mortality Weekly Report Early Release 61: 1-3.

Evaluation of the sensitivity of a densitometry system, in judging the result of influenza virus antigen-detection kit using immunochromatography

Ikuko Yamaguchi¹⁾, Tomoe Aoyama¹⁾, Masaru Yamamoto¹⁾,
Keiko Kinoshita¹⁾, Yumi Ito¹⁾, Hidekazu Nishimura²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Toyohashi Municipal Hospital

²⁾Virus Research Center, Clinical Research Division, Sendai Medical Center

Diagnosis of Influenza using viral antigen-detection kits has become prevalent in clinical settings in Japan, because of the rapidness and easiness. They are sometimes used in early phase of the disease, combined with the early treatment with anti-influenza drugs. Most of them are invented to visually read the test line on the immunochromatography membrane.

However, we should be cautious about their reliability of them. Sometimes human errors occur at the visual tests, and they have different sensitivities. For getting proper clinical data, we should fully understand the surrounding situation and background of them. In this report, we evaluated the sensitivity of BD Veritor System Flu, which employs reflectometric reader system of digital reading technology, by comparing with conventional visual tests.

A total of 84 people including laboratory technologists were asked to visually read test line of the immunochromatography and their answers were compared with results of the reflectometric reader system.

This study showed that the lower the concentration of standard sample was applied, the greater the error ratio of visual test became, indicating the stable sensitivity of Veritor System. Moreover, the sensitivity was compared with three other major products approved in Japan, using four influenza viruses grown in MDCK cells as specimens: type A of H1N1 seasonal 2009, H1N1 pandemic 2009, H3N2 seasonal 2012 and type B of seasonal 2012. It was indicated that Veritor System had the highest sensitivity against lower concentration of antigen especially in early phase of detection from those four kits.