

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

藤間 昭勝¹, 岡田 清美¹, 魚住 利樹¹, 野田 敦也¹, 和山 行正¹,
竹本 毅², 赤星 透², 久保 亨³, 森田 公一³, 福島 喜代康⁴

¹北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所

²北里大学医学部総合診療医学

³長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学分野

⁴日本赤十字社長崎原爆諫早病院

目的: 市販されている5社のインフルエンザ (H1N1) 2009遺伝子診断キットの性能に関して、感度試験を行い比較した。

材料と方法: 2009年7月から11月に日本赤十字社長崎原爆諫早病院呼吸器科を受診し、インフルエンザを疑われた患者より、分離・同定された臨床分離インフルエンザウイルス10株、インフルエンザを疑われた患者の鼻咽頭ぬぐい液または咽頭ぬぐい液18検体、また、交差反応試験においては、インフルエンザウイルスA型9株、インフルエンザウイルスB型1株、*Streptococcus pneumoniae* 1株を用いた。インフルエンザ (H1N1) 2009の遺伝子診断は、5社 (栄研化学株式会社、株式会社カイノス、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社、株式会社キアゲン、大塚製薬株式会社) の市販キットを用いて検討した。対照として、北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所が作製したreal-time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いた。

結果: 交差反応性試験の結果は5社すべてにおいて一致した。スパイク試験の結果では、 $10^3 \sim 10^5$ copies/mlの範囲が最小検出感度であった。臨床分離株と臨床検体に対する最小検出感度は $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ copies/mlであり、キット間で最大1,000倍の感度差が認められた。

結語: インフルエンザ (H1N1) 2009遺伝子診断キット間において検出感度の差が認められた。臨床診断のみならず、治療や疫学調査の観点からも今後の標準化が望まれる。

Key words: インフルエンザ (H1N1) 2009, 遺伝子診断キット, 診断, 感度

序 文

インフルエンザは人獣共通感染症の一つで¹, 毎年大規模な流行を繰り返している²。20世紀以降では、1918年のスペインインフルエンザ (H1N1), 1957年のアジアインフルエンザ (H2N2), 1968年の香港インフルエンザ (H3N2), 1977年ソ連インフルエンザ (H1N1) など世界的な大流行が起こり^{3,4}, 多数の死者が記録されている^{2,5}。

近年、新型インフルエンザウイルスの出現が世界中で懸念される中、2009年4月に米国疾病予防管理センター (CDC) よりブタ由来インフルエンザウイルス (H1N1) のヒトへの感染事例が報告された。メキシコ、アメリカで相次いで同様のインフルエンザ様疾患の発生報告があり、その後、世界的流行が確認された。

日本では2009年5月、神戸市の男性がインフルエンザ (H1N1) 2009陽性と確認され、国内最初の報告事例となり、その後全国的に急速な広がりをみせた⁶。

臨床現場では、インフルエンザ (H1N1) 2009の検査診断において、インフルエンザ抗原迅速キットが一般的に使用されている。しかしながら、CDCは迅速キットの新型インフルエンザ抗原検出率は40~69%であると報告している⁷。この結果から、感度と特異性がより高く、短時間で検出可能な検査試薬の開発が必要とされたことから、各試薬メーカーより相次いで遺伝子診断キットが発売された。

本研究では、北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所で設定したreal-time polymerase chain reaction (PCR) 用プライマーおよびプローブを使用し、この結果を基準として、臨床分離株と患者材料中のインフルエンザウイルス量を調べると共に、各社遺伝子診断キットの性能を比較し、その有用性を検証した。

Received 10 December 2010, accepted 7 January 2011

連絡先: 和山行正 (株式会社 北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所)

〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1

E-mail: kazuyamay@hq.otsuka.co.jp

材料と方法

1. 材料

2009年7月から11月に日本赤十字社長崎原爆諫早病院呼吸器科を受診し、インフルエンザを疑われた患者より、鼻咽頭ぬぐい液または咽頭ぬぐい液を患者の同意のもとに採取した。患者材料より分離・同定された臨床分離インフルエンザウイルス10株 (INF6, INF9, INF18, INF22, INF27, INF30, INF33, INF36, INF39, INF42) はHanks液2 mlを添加し凍結保存した。また、インフルエンザを疑われた患者の鼻咽頭ぬぐい液または咽頭ぬぐい液18検体 (Swab157, Swab178, Swab189, Swab190, Swab193, Swab217, Swab239, Swab268, Swab273, Swab276, Swab277, Swab301, Swab309, Swab342, Swab359, Swab414, Swab454, Swab468) は生理食塩水2 mlで溶出して用いた。これらの検体を対象として、感度試験およびスパイク試験を行った。なお、本研究は日本赤十字社長崎原爆諫早病院の倫理委員会および北里大塚バイオメディカルアッセイ研究所の倫理委員会の承認のもとに実施された。

また、交差試験においては、インフルエンザウイルスA型 (ウルグアイ/716/2007 (H3N2), プリスベン/59/2007 (H1N1), Northern Pintail/Akita/131/07 (H11N9), Northern Pintail/Miyagi/258/05 (H6N2), Northern Pintail/Aomori/372/08 (H7N7), Northern Pintail/Akita/714/06 (H5N2), Northern Pintail/Aomori/873/08 (H10N1), Northern Pintail/Miyagi/1733/07 (H4N6), INF6 (インフルエンザ (H1N1) 2009) の9株, インフルエンザウイルスB型 (プリズベン/60/2008) 1株, *Streptococcus pneumoniae* 1株を用いて検討を行った。

2. 方法

①リアルタイムPCR (TaqMan probe法)

A. RNAスタンダードの作製

国立感染症研究所から分与されたRNA抽出液 (インフルエンザ (H1N1) 2009 Narita株) 5 μ l, NIID-swH1 TaqMan Primer-R1 (5'-tgtttccacaatgtaRgccat-3') final concentration: 1 μ M, NIID-swH1 TaqMan Primer-F1 (5'-agaaaagaatgtaacagtaacacactctgt-3') final concentration: 1 μ Mを最終液量50 μ lに調整した。OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN) を用いて、GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) で50°C30分次いで95°C15分の反応後、94°C20秒次いで50°C20秒、72°C20秒のサイクルを40回繰り返してHA領域のPCR産物を増幅した。そのPCR産物をTOPO® TA Cloning® Kit for subcloning (Invitrogen) を用いてサブクローニングを行い、QIaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) によりプラスミドを抽出し、PCR-Fla Naritaを作製した。PCR-Fla Naritaの配列の確認はCEQ8000 Genetic Analysis System (BECKMAN COULTER) を用いたシーケン

シングにより行った。PCR-Fla Narita 1 μ l, M13 forward primer (5'-gtaaacgacggccag-3') final concentration: 0.2 μ M, M13 reverse primer (5'-caggaacagctatgac-3') final concentration: 0.2 μ M, Hot StarTaq Master Mix Kit (QIAGEN) を用いて、最終液量50 μ lに調整した。GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にて、95°C15分の反応後、94°C20秒次いで50°C20秒、72°C20秒のサイクルを40回繰り返して、HA領域およびT7 promoterを含むPCR産物を作製した。M13 primerによるPCR産物をアガロース電気泳動により確認し、MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) により精製後、T7 RNA Polymerase (Invitrogen) および10 mM NTP Mix (Invitrogen) により転写を経てRNAを作成した。作製したRNAをRecombinant DNase I (TaKaRa) によりDNase処理後、AGPC (Acid Guanidinium-Phenol-Chloroform) 法により精製し、RNAスタンダードを作製した。RNAスタンダードのコピー数は分光光度計 (Gene Spec III: HITACHI) による吸光度の測定値、およびRNAスタンダードサイズにより算出した。

B. リアルタイムPCR

検体200 μ lからQIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) によりRNA 80 μ lを抽出し、作製したRNAスタンダードと同時に測定した⁸。RNA抽出液5 μ lおよび各濃度のRNAスタンダード1 μ lにインフルエンザ (H1N1) 2009検出用プライマーFLAsw-F (5'-gggtagcccccattgcattt-3') final concentration: 0.4 μ M, FLAsw-R (5'-atgagcttgctgtggagagtga-3') final concentration: 0.4 μ M, TaqMan probe FLAsw-yrP (5'-FAM-tttccaggatccagcyagcaatrtt-TAMRA-3') final concentration: 0.2 μ M, 2 \times QuantiTect Multiplex RT-PCR Master Mix (QIAGEN) を加え、最終液量50 μ lに調整した。ABI PRISM 7900 (Applied Biosystems) を用いて、50°C30分次いで95°C15分の反応後、94°C45秒次いで56°C45秒のサイクルを50回繰り返して、RNAスタンダード標準曲線よりインフルエンザ (H1N1) 2009遺伝子の定量検出を行った。

②インフルエンザ (H1N1) 2009遺伝子診断キット

2010年4月において5社から市販されているインフルエンザ (H1N1) 2009遺伝子診断キットの性能を検証するために、RNA amplification reagent and primer set for H1 pdm 2009 (LAMP法; 栄研化学株式会社), Swiftgene SW-FLU/H1 (NASBA法; 株式会社カイノス), RealTime ready swine Influenza A/H1N1 detection setとRealTime ready RNA Virus Master (リアルタイムPCR法; ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社), Artus infl./H1 LC/RC-PCR kit (リアルタイムPCR法; 株式会社キアゲン), Flu-Sw AH1pdm kit (PCRラテラルフロー法; 大塚製薬株式会社) について比較検討を行った。各遺伝子診断

キットはそれぞれの取扱説明書に基づいて使用した。

A. RNA amplification reagent and primer set for H1 pdm 2009 (LAMP法; 栄研化学株式会社)

検体20 μ lをLoopamp[®]インフルエンザウイルス用抽出試薬により10倍希釈し, 200 μ lのRNA溶液を作製した。RNA増幅試薬が固相化された反応チューブにH1 pdm 2009 Primer Mix 15 μ lを加え, 10 μ lのRNA溶液を加えた後, リアルタイム濃度測定装置で62.5°C35分の反応条件で検出を行った。

B. Swiftgene SW-FLU/H1 (NASBA法; 株式会社カイノス)

検体はリアルタイムPCRを行った後, -80°Cに保存したRNA抽出検体を使用した。チューブにNASBA試薬を5 μ l分注し, RNA抽出検体2.5 μ lを加えPCR装置 (GeneAmp PCR System 9700: Applied Biosystems) を用いて65°C5分次いで41°C5分の反応後, NASBA酵素2.5 μ lを加え41°C50分の反応を行った。反応終了後のチューブに展開液90 μ lを加え, 検出ストリップを挿入し, 10分後に目視にて判定を行った。

C. RealTime ready swine Influenza A/H1N1 detection setと RealTime ready RNA Virus Master (リアルタイムPCR法; ロシユ・ダイアグノスティックス株式会社)

自動核酸精製装置 (MagNA Pure LC 2.0 System: ロシユ) に検体200 μ l, 溶液試薬 (RNA Isolation Kit-High Performance) をセットし, 自動抽出を行い, 100 μ lのRNA溶液を作製した。チューブにRT-PCR master mixを15 μ l分注し, RNA抽出検体5 μ lを加えた後, リアルタイムPCR装置 (LightCycler[®] 480 System II: ロシユ) により, 58°C8分, 次いで95°C30秒の反応後, 95°C1秒, 60°C20秒, 72°C1秒のサイクルを45回繰り返し, 検出を行った⁹⁾。

D. Artus infl./H1 LC/RC-PCR kit (リアルタイムPCR法; 株式会社キアゲン)

検体はリアルタイムPCRを行った後, -80°Cに保存したRNA抽出検体を使用した。チューブにInfluenza H1 master 12 μ l, Influenza Mg-Sol 3 μ lを分注し, RNA抽出検体5 μ lを加えた後, リアルタイムPCR装置 (Rotor-Gene[™] Q: キアゲン) により, 50°C10分, 次いで95°C10秒の反応後, 95°C2秒, 60°C12秒, 72°C10秒のサイクルを45回繰り返し, 検出を行った。

E. Flu-SW AH1pdm kit (PCRラテラルフロー法; 大塚製薬株式会社)

検体はリアルタイムPCRを行った後, -80°Cに保存したRNA抽出検体を使用した。チューブにRT-PCR master mixを45 μ l分注し, RNA抽出検体5 μ lを加えた後, PCR装置 (GeneAmp PCR System 9700: Applied Biosystems) により, 50°C20分, 次いで95°C15分の反応後, 94°C45秒, 60°C45秒のサイクルを46回繰り返し, 次いで72°C3分の反応を行った。反応終了後の

チューブから, 増幅産物試料をテストデバイスに15 μ l滴下し, さらに展開液100 μ lを滴下し, 15分後に目視にて判定を行った。

結 果

各社遺伝子診断キットの性能を比較するため, 交差反応性試験およびスパイク試験を行った。また, リアルタイムPCRで得られたインフルエンザ (H1N1) 2009 RNAコピー数を基準とし, 各遺伝子診断キットの感度試験を行った。

インフルエンザA (H3N2, H1N1, H1N9, H6N2, H7N7, H5N2, H10N1, H4N6) 8株と, インフルエンザBの1株, *Streptococcus pneumoniae* 1株, 陽性検体としてのインフルエンザ (H1N1) 2009 1株を用いて交差反応性の検討を行った。結果は5社すべてにおいて完全に一致した (Table 1)。

臨床分離株からそれぞれの抽出条件で抽出したRNA溶液を作製し, $1 \sim 1 \times 10^7$ まで10倍階段希釈し, 各遺伝子診断キットでスパイク試験を行った。希釈試料はリアルタイムPCRにてRNAコピー数 (理論値) を算出して比較を行った (Table 2)。INF-6では栄研, カイノスで $2 \times 10^9 \sim 2 \times 10^5$ copies/ml, ロシユ, 大塚は $2 \times 10^9 \sim 2 \times 10^4$ copies/ml, キアゲンで $2 \times 10^9 \sim 2 \times 10^3$ copies/mlの範囲で検出された。INF-9では栄研, カイノスは $9 \times 10^9 \sim 9 \times 10^5$ copies/ml, ロシユ, キアゲンで $9 \times 10^9 \sim 9 \times 10^4$ copies/ml, 大塚は $9 \times 10^9 \sim 9 \times 10^3$ copies/mlの範囲で検出された。5社キットにおいて $10^5 \sim 10^3$ copies/mlの範囲が最小検出感度であった。また, RNAコピー数は高濃度でも問題なく測定を行う事が可能であった。

各遺伝子診断キットを用いて感度試験を行った。臨床分離株はリアルタイムPCRを用いて試料中のインフルエンザ (H1N1) 2009 RNA量を定量化した。得られたRNAコピー数を基に, 試料をそれぞれの抽出条件で抽出し, RNA溶液を $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^2$ copies/mlに調整した。臨床検体はリアルタイムPCRでRNA量の定量を行った後, カイノス, キアゲン, 大塚はリアルタイムPCRで得られたRNA溶液を試料とし, 栄研, ロシユはそれぞれの抽出条件で抽出し, RNA溶液を試料として使用した。以上の抽出溶液を用い, リアルタイムPCRのRNAコピー数と遺伝子診断キットの結果を比較検討した。臨床分離株における結果をTable 3に示す。最小検出感度は栄研で $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$ copies/ml, カイノスで $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ copies/ml, ロシユで $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^5$ copies/ml, キアゲンで $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ copies/ml, 大塚で $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^5$ copies/mlであった。INF-27では, 最小検出感度が大塚で 1×10^2 copies/ml, ロシユ, キアゲンで 1×10^4 copies/ml, 栄研, カイノスで 1×10^5 copies/mlとなり, 最大で1,000倍の感度差が

Table 1. Cross reaction test for five diagnostic systems for detection of pandemic (H1N1) 2009

	A	B	C	D	E
<i>A/Uruguay/716/2007 (H3N2)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Brisbane/59/2007 (H1N1)</i>	-	-	-	-	-
<i>B/Brisbane/60/2008</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus pneumonia</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Northern Pintail/Akita/131/07 (H11N9)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Northern Pintail/Miyagi/258/05 (H6N2)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Northern Pintail/Aomori/372/08 (H7N7)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Northern Pintail/Akita/714/06 (H5N2)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Northern Pintail/Aomori/873/08 (H10N1)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/Northern Pintail/Miyagi/1733/07 (H4N6)</i>	-	-	-	-	-
<i>A/INF6/pandemic (H1N1) 2009</i>	+	+	+	+	+
Negative control	-	-	-	-	-

Nine influenza viruses type A including pandemic (H1N1) 2009 and one influenza virus type B, *Streptococcus pneumonia* were used in the present study. Detection of virus gene was performed by: **A.** LAMP method (Eiken Chemical Co., Ltd.), **B.** NASBA method (Kainos Laboratories Inc.), **C.** real-time PCR method (Roche Diagnostics), **D.** real-time PCR method (Qiagen), and **E.** PCR-lateral flow method (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

Table 2. Spike test of five diagnostic systems for detection of pandemic (H1N1) 2009

Sample dilution	Real-time PCR (copies/ml) Theoretical value	A	B	C	D	E
INF-6						
1×10^{-4}	2×10^5	+	+	+	+	+
1×10^{-5}	2×10^4	±	-	+	+	+
1×10^{-6}	2×10^3	-	-	-	+	±
1×10^{-7}	2×10^2	-	-	-	±	-
INF-9						
1×10^{-4}	9×10^5	+	+	+	+	+
1×10^{-5}	9×10^4	±	±	+	+	+
1×10^{-6}	9×10^3	-	-	±	±	+
1×10^{-7}	9×10^2	-	-	-	-	±

Spike test was performed by using two isolated pandemic (H1N1) 2009 (INF-6, INF-9) for five commercial available diagnostic systems.

A. LAMP method (Eiken Chemical Co., Ltd.); **B.** NASBA method (Kainos Laboratories Inc.); **C.** real-time PCR method (Roche Diagnostics); **D.** real-time PCR method (Qiagen); **E.** PCR-lateral flow method (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

認められた。他の臨床分離株でも同様に、栄研、カイノスの感度は低値傾向を示した。

臨床検体を用いた検討では、各試薬キットで全例一致した検体はSwab190, 359の陽性2例とSwab217, 276の陰性2例の計4例で、一致率は22.2% (4/18)であった (Table 4)。また、リアルタイムPCRで検出感度以下の検体では、Swab268, 301でキアゲン、大塚、Swab454でキアゲンが陽性を示し、 1×10^2 copies/ml以下の低濃度によるRNA検出が可能であった。臨床検体の感度比較においても、臨床分離株の結果と同様に、栄研、カイノスは低値傾向を示した。

考 察

新型インフルエンザが日本国内で猛威を振るう中、冬季に毎年流行する季節性インフルエンザ¹⁰およびアジアの一部地域でヒトへの感染が確認された鳥インフ

ルエンザ^{11,12}など、起因ウイルスの特定は臨床診断、治療およびワクチン開発、疫学調査の観点から極めて重要である。

今回、インフルエンザ (H1N1) 2009に対する各遺伝子診断キットの性能を比較検討した。測定時間は各社で約60分~220分の範囲であり、時間的には栄研<カイノス・キアゲン<ロシュ<大塚の順に、インフルエンザ (H1N1) 2009の遺伝子検出が可能であった (Table 5)。操作性および試薬・機器コストの観点からは、検体の大量測定には専用機を使用する、栄研、キアゲン、ロシュが有用であり、少量検体の測定には遺伝子増幅に汎用機 (GeneAmp PCR System 9700: Applied Biosystems) を使用するカイノス、大塚が有用であった。

インフルエンザ (H1N1) 2009遺伝子診断キットの特異性は、交差反応性試験の結果から各社とも良好な結果が得られたが、検出感度はキット間において、感度

Table 3. Evaluation of the sensitivity of five diagnostic systems for isolated pandemic (H1N1) 2009

	Real-time PCR (copies/ml)	INF6	INF9	INF18	INF22	INF27	INF30	INF33	INF36	INF39	INF42
A (Eiken)	1×10^6	ND*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
	1×10^5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1×10^4	±	±	-	-	-	+	-	+	-	-
	1×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1×10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B (Kainos)	1×10^6	ND	ND	ND	+	ND	+	ND	ND	ND	+
	1×10^5	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
	1×10^4	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	1×10^3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1×10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C (Roche)	1×10^6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1×10^5	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	+
	1×10^4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	1×10^3	-	±	+	-	-	-	+	+	-	-
	1×10^2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D (Qiagen)	1×10^6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1×10^5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1×10^4	ND	ND	ND	+	+	+	+	ND	ND	+
	1×10^3	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	1×10^2	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E (Otsuka)	1×10^6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1×10^5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
	1×10^4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+
	1×10^3	±	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	1×10^2	-	±	-	-	+	-	-	-	-	-

*ND, not detected

Sensitivity of five diagnostic systems was evaluated by using 10 clinical isolated pandemic (H1N1) 2009 (INF6, INF9, INF18, INF22, INF27, INF30, INF33, INF36, INF39, INF42). Virus RNA was diluted based on the estimation of virus copies by real-time PCR. **A.** LAMP method (Eiken Chemical Co., Ltd.); **B.** NASBA method (Kainos Laboratories Inc.); **C.** real-time PCR method (Roche Diagnostics); **D.** real-time PCR method (Qiagen); **E.** PCR-lateral flow method (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

Table 4. Evaluation of the sensitivity of five diagnostic systems for pandemic (H1N1) 2009 in clinical specimens

Sample No.	Real-time PCR (copies/ml)	A	B	C	D	E
Swab157	7×10^5	-	-	+	+	+
Swab178	5×10^4	-	-	-	+	+
Swab189	1×10^8	-	+	+	+	+
Swab190	1×10^8	+	+	+	+	+
Swab193	1×10^8	-	+	+	+	+
Swab217	<200	-	-	-	-	-
Swab239	4×10^6	-	+	+	+	+
Swab268	<200	-	-	±	+	+
Swab273	5×10^6	-	+	+	+	+
Swab276	<200	-	-	-	-	-
Swab277	4×10^4	-	-	+	+	+
Swab301	<200	-	-	-	+	+
Swab309	4×10^6	-	+	+	+	+
Swab342	<200	-	-	±	±	-
Swab359	2×10^7	+	+	+	+	+
Swab414	1×10^7	-	±	+	+	+
Swab454	<200	-	-	-	+	±
Swab468	3×10^7	+	+	+	+	+

Sensitivity of five diagnostic systems was evaluated by using 18 swab specimens obtained from nasopharynx of suspected patients. Virus copies of these clinical specimens were estimated by real-time PCR.

A. LAMP method (Eiken Chemical Co., Ltd.); B. NASBA method (Kainos Laboratories Inc.); C. real-time PCR method (Roche Diagnostics); D. real-time PCR method (Qiagen); E. PCR-lateral flow method (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.)

差が認められた。低値傾向を示した2社について、栄研は抽出に使用する検体が他社に比べ1/10程度と少量のため、そのことが原因で低値を示した可能性が示唆される。カインスで使用したRNA抽出検体はキアゲン、大塚と同一の抽出検体で測定を行った。しかし、測定感度に差が認められた事から、増幅効率等による何らかの原因が影響している可能性が示唆される。各遺伝子診断キットの検出感度が同一であることが臨床診断においては重要であり、今後の改良が望まれる。

2009年から海外輸入および国内製のインフルエンザ(H1N1)2009ワクチンの接種が行われた。そのため、インフルエンザウイルス型別の同定は疫学上、極めて重要となる。迅速であるとともに、特異性と感度に優れた遺伝子診断キットの必要性は今後も高まるものと考えられる。しかし、遺伝子診断キットは測定にcontaminationの危険性があり、さらに専用の実験施設および技術が必要とされる。また、従来のインフルエンザ抗原迅速簡易キットは偽陰性となり得ることが報告されている⁷⁾。今回、我々はインフルエンザウイルス株を用いて各遺伝子診断キットの比較検討を行い、各キットの測定感度および特異性を明らかにした。今後のインフルエンザ(H1N1)2009検出キットの更なる測定の簡便化、および検出感度の標準化を望むとともに、遺伝子診断法がさらに普及することが必要不可欠と考える。

Table 5. Detection methods and properties of five diagnostic systems for pandemic (H1N1) 2009

Method (company)	Elution reagent	Elution time	Amplification time	Detection time
LAMP (Eiken)	Kit enclosed	2 min	60 min	-
NASBA (Kainos)	QIAGEN	40 min	65 min	15 min
Real-time PCR (Roche)	Roche	90 min	90 min	-
Real-time PCR (Qiagen)	QIAGEN	40 min	120 min	-
PCR Lateral flow (Otsuka)	QIAGEN	40 min	160 min	20 min

文 献

1. 喜田 宏. 人獣共通感染症としてのインフルエンザ. 臨床検査 2002; 46: 163-7.
2. 宮代 守, 和佐野ちなみ, 桶脇 弘, 他. プタおよびヒトにおける新型インフルエンザウイルスに関する調査(2001/2002). 福岡市保健環境研究所報 2002; 27: 183-4.
3. Simonsen L, Clarke MJ, Schonberger LB, et al. Pandemic versus epidemic influenza mortality: a pattern of changing age distribution. *J Infect Dis* 1998; 178: 53-60.
4. Simonsen L. The global impact of influenza on morbidity and mortality. *Vaccine* 1999; 17: S3-10.
5. 西藤岳彦, 根路銘国昭. 動物インフルエンザと人間. 臨床と微生物 1998; 25: 675-85.
6. 田中敏嗣. 神戸市における新型インフルエンザ検査の対応について. 臨床とウイルス 2010; 38: 99-105.
7. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Evaluation of Rapid Influenza Diagnostic Tests for Detection of Novel Influenza A (H1N1) Virus. United States, 2009. *MMWR* 2009; 58: 826-9.
8. Jiang T, Kang X, Deng Y, et al. Development of a real-time RT-PCR assay for a novel influenza A (H1N1) virus. *J Virol Methods* 2010; 163: 470-3.
9. Ward CL, Dempsey MH, Ring CJ, et al. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 2004; 29: 179-88.
10. 原三千丸, 高尾信一, 福田伸治, 他. A型インフルエンザに対する3種類のイムノクロマト法迅速診断キットの比較検討. 感染症誌 2004; 78: 935-42.
11. Tran TH, Nguyen TL, Nguyen TD, et al. Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *N Engl J Med* 2004; 350 (12): 1179-88.
12. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23: S25-32.

Evaluation of diagnostic tools for the gene detection of pandemic (H1N1) 2009

Akikazu Fujima,¹ Kiyomi Okada,¹ Toshiki Uozumi,¹ Atsuya Noda,¹ Yukumasa Kazuyama,¹ Tsuyoshi Takemoto,² Tohru Akahoshi,² Tohru Kubo,³ Kouichi Morita,³ Kiyoyasu Fukushima⁴

¹Kitasato-Otsuka Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd.

²Department of General Medicine, Kitasato University School of Medicine

³Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University

⁴Japanese Red Cross Nagasaki Genbaku Isahaya Hospital

Background: In order to evaluate the performance of diagnostic tools for detection of pandemic (H1N1) 2009, five commercially available diagnostic systems were investigated.

Methods: Specificity and sensitivity of five diagnostic systems, RNA amplification reagent and primer set for H1 pdm 2009, Swiftgene SW-FLU/H1, RealTime ready swine Influenza A/H1N1 detection set and RealTime ready RNA Virus Master, Artus infl./H1 LC/RC-PCR kit, and Flu-SW AH1pdm kits were evaluated by using 10 isolated pandemic (H1N1) 2009 and 18 clinical specimens collected from patients with suspected infection by nasopharyngeal swabs. Real-time PCR method established by Kitasato-Otsuka Biomedical Assay Laboratories Co., Ltd., was used to quantify the copy numbers of viruses.

Results: No cross reactivity was observed among these assay systems. Spike tests were performed on two isolated pandemic (H1N1) 2009 strains, and the results indicated that all systems could detect virus RNA as low as ranges between 10^3 to 10^5 copies/ml. Sensitivity for the detection of virus RNA from the isolated virus as well as clinical specimens was investigated. Five diagnostic systems could detect virus RNA as low as the ranges between 10^2 to 10^5 copies/ml.

Conclusions: Accurate diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 is critical for the prevention and control of influenza epidemics and the appropriate initiation of antiviral treatment. Therefore, standardization of assay systems should be made mandatory.

Key words: pandemic (H1N1) 2009, gene detection kit, diagnosis, standardization