

鼻咽頭検体中のインフルエンザウイルス核酸検出に対する GENECUBE[®] 及びジーンキューブ[®]FluA/Bと感染研法を 用いたリアルタイムRT-PCR法の比較評価

Comparative evaluation of real-time RT-PCR methods using GENECUBE[®] and
GENECUBE[®] FluA/B and the Infection Research Institute method for the detection
of influenza virus nucleic acids in nasopharyngeal sample obtained

津田志乃¹⁾, 草間智香¹⁾, 武田明実奈¹⁾, 道淵真史²⁾³⁾, 吉兼峻史²⁾³⁾,
明石祐作³⁾, 鈴木広道¹⁾³⁾

要旨 近年, インフルエンザの診断に, 核酸増幅検査法を用いることが推奨されている。我々は鼻咽頭検体 (695検体) を用いて, 全自動遺伝子検査装置GENECUBE[®]および専用試薬ジーンキューブ[®]FluA/Bの性能を感染研法によるリアルタイムRT-PCR法と比較評価した。結果として, 陽性一致率は93.0%, 陰性一致率は99.8%, 全体一致率は99.4%であり, ジーンキューブ[®]FluA/BのSp値は, リアルタイムRT-PCR法Ct値と強い相関を認めた ($r=0.88$, $p < 0.001$)。

Key words GENECUBE, influenza

1. はじめに

インフルエンザウイルスは冬季に流行する呼吸器感染症の代表的な原因微生物である。検査診断ではイムノクロマト法を用いた迅速抗原検査が広く用いられてきたが, 発症早期では陰性となることが多く, 米国では2018年に改訂されたインフルエンザ診療ガイドラインにおいて核酸増幅検査を用いることが推奨されている¹⁾。わが国でも2023年3月の指針において, インフルエンザの診断に対して核酸増幅検

査の活用が提唱されている²⁾。

全自動遺伝子検査装置GENECUBE[®] (東洋紡株式会社, Fig. 1¹⁾) は, Qプローブ (蛍光標識プローブ) を用いたPolymerase Chain Reaction (PCR) 法を原理とした迅速遺伝子検査の医療機器であり, SARS-CoV-2, RSウイルス, 抗酸菌, *Clostridioides difficile* など各種病原体に対する体外診断用医薬品が上市されている³⁾。今回, 2020年12月に新たに承認されたインフルエンザ検査試薬ジーンキューブ[®]FluA/Bに対して評価を実施した。

Received Apr. 1, 2024; Accepted May 3, 2024

Shino TSUDA¹⁾, Tomoka KUSAMA¹⁾, Amina TAKEDA¹⁾, Masashi MICHIBUCHI²⁾³⁾, Takafumi YOSHIKANE²⁾³⁾, Yusaku AKASHI³⁾, Hiromichi SUZUKI¹⁾³⁾

¹⁾ 筑波大学附属病院感染症科

Department of Infectious Diseases, University of Tsukuba Hospital

〒305-8576 茨城県つくば市天久保2-1-1

2-1-1 Amakubo, Tsukuba, Ibaraki 305-8576, Japan

²⁾ 東洋紡株式会社診断システム事業部

Diagnostic Systems Department, TOYOBO CO., LTD.

〒530-0001 大阪府大阪市北区梅田1-13-1 大阪梅田ツインタワーズ・サウス

Osaka Umeda Twin Towers South, 1-13-1 Umeda, Kita-ku, Osaka, Osaka 530-0001, Japan

³⁾ 筑波大学医学医療系臨床医学域感染症内科学

Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine, University of Tsukuba

〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

連絡責任者: 鈴木広道

E-mail: hsuzuki@md.tsukuba.ac.jp



Fig. 1 GENECUBE Model C[®].

2. 材料および方法

1) 対象

対象検体は、2023年2月21日より同年4月30日までの期間、有症状の筑波大学附属病院の職員及び職員家族から、PCR検査のため採取された鼻咽頭検体を用いた。本研究は筑波大学附属病院倫理委員会（倫理承認番号：R03-230）の承認を得て実施した。

2) 測定機器・試薬

採取された鼻咽頭検体は、Maxwell[®] RSC Instrument（プロメガ株式会社）及び専用試薬 Maxwell[®] RSC Viral Total Nucleic Acid Purification Kitを用いて抽出を行い、GENECUBE[®] 及びジーンキューブ[®]FluA/B（以下GENECUBE法）を用いて核酸検出を行った。抽出残液は、-80℃で凍結保管を行い、後日、比較検査法による試験を実施した。

3) 比較検査法・乖離検証

比較検査法は、国立感染症研究所におけるインフルエンザ診断マニュアル（第4版）⁴⁾で公開されたリアルタイムRT-PCR法（以下基準法）を用いて実施した。試薬はTHUNDERBIRD[®]Probe One-step qRT-PCR Kit（東洋紡株式会社）を用い、測定機器はLightCycler[®] 96 System（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）を用いた。測定条件は逆転写反応として50℃、10分、初期変性反応として95℃、1分で反応させた後、95℃、15秒、60℃、45秒のPCR条件を45サイクルで行い、シグナルの立ち上がり確認された場合を陽性と判定した。

GENECUBE法と基準法の測定結果に乖離があった検体に対しては、cobas[®]Liat[®]システム（ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）及び専用試薬

cobas[®]Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B（以下cobas[®]Liat[®]）を用いて追加検査を実施した。

4) 統計解析

GENECUBE法と基準法の陽性一致率、陰性一致率、全体一致率は、Clopper and Pearsonの方法で95%信頼区間を求めた。GENECUBE法のSp値と基準法のCt値については、スピアマンの順位相関係数を用いて回帰式・相関係数を求めた。統計ソフトはSPSS（Statistics ver. 29.0.0.0, IBM）を用いた。

3. 成績

対象期間において累計695検体に対して評価を実施し、基準法において、43検体（Ct<20 n=24, 20 ≤ Ct<25 n=9, 25 ≤ Ct<30 n=4, 30 ≤ Ct n=6）で陽性を示した（Fig. 2²⁾）。GENECUBE法と基準法ともに、陽性例は全例A型だった。

1) 相関性

鼻咽頭検体中のインフルエンザウイルス核酸検出に対するGENECUBE法と基準法の一貫率について示す（Table 1³⁾）。GENECUBE法と基準法の陽性一致率は93.0%（95%信頼区間（CI）：80.9%–98.5%）陰性一致率は99.8%（95% CI：99.1%–100%）、全体一致率は99.4%（95% CI：98.5%–99.8%）であった。

2) 乖離検体に対する追加検査

GENECUBE法と基準法の結果は4例で不一致だった。結果が乖離した検体の詳細及びcobas[®]Liat[®]での追加検査の結果について示す（Table 2⁴⁾）。基準法陽性、GENECUBE法陰性の3例はいずれもCt値30以上で、cobas[®]Liat[®]では1例陽性、2例陰性であった。基準法陰性、GENECUBE法陽性の1例はcobas[®]Liat[®]で陽性を示した。

3) 基準法Ct値とGENECUBE法Sp値の相関(Fig. 3⁵⁾)

基準法Ct値の中央値は18.6（四分位数 [IQR]：15.7–25.0）、GENECUBE法Sp値の中央値は24.4（IQR：22.6–31.3）であった。スピアマンの順位相関係数での相関係数は $r=0.88$ （ $p < 0.001$ ）であった。

4. 考察

今回、2022–2023年に採取した鼻咽頭検体（695検体）を用いてGENECUBE法の臨床性能試験を実施し、基準法と良好な一致率を示した。結果が不一致となった、基準法陽性、GENECUBE法陰性の3例、及び基準法陰性、GENECUBE法陽性の1例、計4例はいずれもCt値が30以上で、検体中のウイルス量が少なく測定結果にばらつきが生じたと推測された。また、GENECUBE法のSp値は、基準法Ct値と強い相関を認めた。

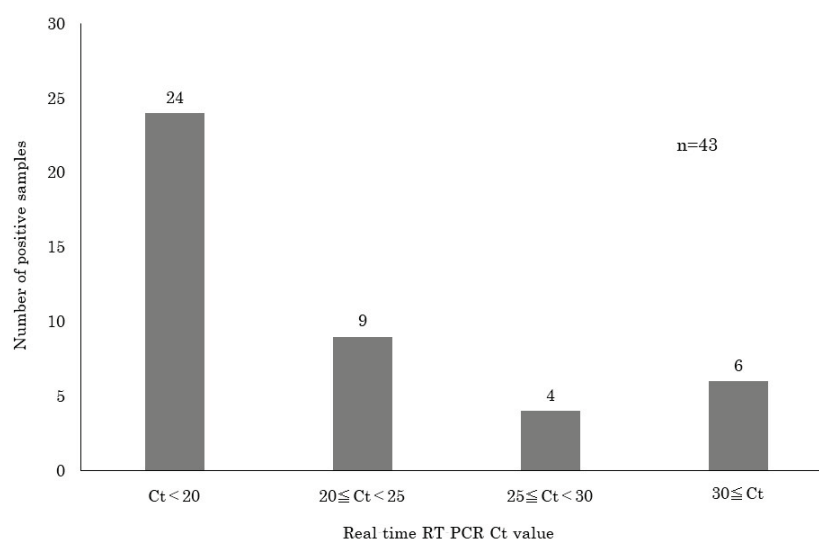


Fig. 2 Number of influenza virus-positive nasopharyngeal samples according to Ct values. NIID National Institute of Infectious Disease, RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction.

Table 1 Concordance rate of the GENECUBE[®]FluA/B with real-time RT-PCR for nasopharyngeal samples obtained from patients with suspected influenza virus infection.

(N=695)			
Real-time RT-PCR (N2 NIID method)**		Positive**	Negative
		GENECUBE [®] FluA/B	Positive**
	Negative	3	651
Positive concordance rate (%)		93.0 (80.9-98.5)	
Negative concordance rate (%)		99.8 (99.1-100)	
Total concordance rate (%)		99.4 (98.5-99.8)	

Data in parentheses indicate 95% confidence intervals.

*NIID National Institute of Infectious Diseases, RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction

**All positive results were influenza A

Table 2 Inconsistent cases and additional testing between the GENECUBE[®] FluA/B and real-time RT-PCR methods in correlation studies using nasopharyngeal samples.

	Real-time RT-PCR (N2 NIID method)*	GENECUBE [®] FluA/B	cobas [®] Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B**
No.1	(-)	A(+) Sp values 43.2	A(+) Ct values 36.3
No.2	A(+) Ct values 34.5	(-)	A(+) Ct values 32.6
No.3	A(+) Ct values 36.4	(-)	(-)
No.4	A(+) Ct values 38.5	(-)	(-)

*NIID National Institute of Infectious Diseases, RT-PCR reverse transcription polymerase chain reaction

** Additional testing was performed using the cobas[®]Liat[®] system and cobas[®]Liat SARS-CoV-2 & Flu A/B for cases with real-time RT-PCR and the GENECUBE[®]FluA/B mismatch.

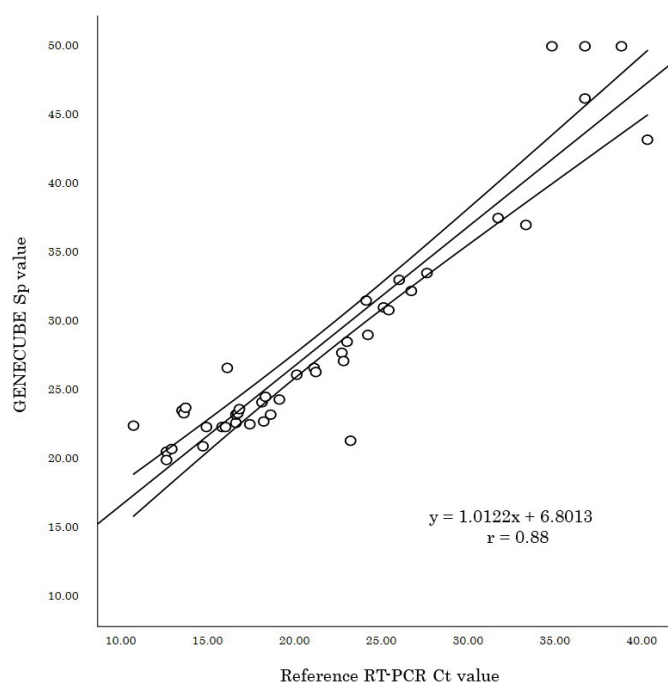


Fig. 3 Relationship between Sp values of the GENECUBE® FluA/B and Ct values of real-time RT-PCR using influenza-positive nasopharyngeal samples. Regression line and 95% confidence intervals are shown.

日常診療でよく用いられるインフルエンザ迅速抗原検査の感度は、130の研究を対象としたメタアナリシス解析において、A型：54.4% (95% CI：48.9%-59.8%)、B型：53.2% (95% CI：41.7%-64.4%)と低いと報告されている⁵⁾。我々が2017年-2018年に実施した累計313名 (129名陽性、A型：88名、B型：41名)の評価でも、リアルタイムRT-PCRと比較したインフルエンザ迅速抗原検査の感度は、全体で54.3% (95% CI：45.3%-63.1%)、特異度は100% (95% CI：98.0%-100%)であった。更に、インフルエンザウイルス量は発症早期で少ないと報告されており⁶⁾、我々の研究でも感度はインフルエンザ様症状の発症からインフルエンザ迅速抗原検査までの時間が短い程、低くなることが明らかになっている (12時間未満：38.9% [95% CI：17.3%-64.3%], 12~24時間：40.5% [95% CI：25.6%-56.7%], 24~48時間：65.2% [95% CI：49.8%-78.6%], $p=0.03$)⁷⁾。これらの見地を踏まえ、インフルエンザの検査診断は核酸増幅検査法が近年のガイドラインにおいて推奨されている¹⁾。

GENECUBE法の過去の検討として、我々は2020年-2021年に採取された193検体 (インフルエンザウイルスA 48件、インフルエンザウイルスB 32件)を用いた臨床性能試験を行った。リアルタイムRT-

PCRと比較し、核酸抽出装置を用いた精製検体を用いた場合、陽性一致率100% (95% CI：93.3%-100%)、陰性一致率99.1% (95% CI：95.2%-100%)、全体一致率99.5% (95% CI：97.1%-100%)であり、加熱抽出法を用いた場合、陽性一致率93.8% (95% CI：86.0%-97.9%)、陰性一致率100% (95% CI：95.2%-100%)、全体一致率97.4% (95% CI：94.1%-99.2%)であったことを報告した⁸⁾。今回の2022年-2023年の鼻咽頭検体中のインフルエンザウイルス核酸検出に対する検討とも矛盾しない結果であり、GENECUBE法が既存の核酸増幅検査法と比較し遜色ない感度を示すことが確認された。

更に今回の検討においては、GENECUBE法にて検査を行う際に、GENECUBE®において算出されたSp値を、基準法のCt値と比較した。SARS-CoV-2の検出において、GENECUBE法Sp値と基準法のCt値は強い相関を示す (相関係数：0.81, GENECUBE Sp値 [中央値：34.9, IQR：31.8-38.2], リアルタイムRT-PCR Ct値 [中央値30.1, IQR：27.8-31.6])⁹⁾。今回、インフルエンザウイルス検査においても強い相関 ($r=0.88$, $p < 0.001$)を認めており、GENECUBE法と基準法Ct値との間には6程度 (個別差：中央値6.5 [IQR：5.6-7.8])の差を認めていた。Sp値は定量的な指標としては用いられ

ていないが、今後の検討を重ねることで有用性を示す可能性があることが示唆された。

本研究での限界を述べる。第一にGENECUBE法が検体採取から速やかに実施したのに対して、比較検査法である基準法は凍結検体を用いて実施している。このため、検体保管の劣化に伴い基準法の感度に影響を与えた可能性がある。第二に、本研究は単施設における1シーズンの検体を用いた結果であり、且つインフルエンザウイルスBに対する検討が行われていない。また、インフルエンザウイルスは変異が多く、核酸増幅検査において変異に伴い感度低下の発生が指摘されているため¹⁰⁾、本検討結果の妥当性については今後も検証を続けていく必要がある。

5. 結論

GENECUBE法の測定結果は基準法と高い一致率を示した。さらに、GENECUBE法のSp値と基準法Ct値は強い相関を示した。

内容の一部は、第55回日本医療検査科学会にて発表しました。

COI申告

連絡責任者の鈴木広道は東洋紡株式会社より共同研究費の受け取りがあります。

文 献

- 1) Timothy M Uyeki, Henry H Bernstein, John S Bradley, et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza. *Clin Infect Dis.* 2019;68:895-902.
- 2) 一般社団法人日本感染症学会/一般社団法人日本臨床微生物学会. インフルエンザ核酸検出検査の有効活用に向けた提言. *日本臨床微生物学会雑誌* 2023;Vol.33 No.4
- 3) Naito A, Kiyasu Y, Akashi Y, et al. The evaluation of the utility of the GENECUBE HQ SARS-CoV-2 for anterior nasal samples and saliva samples with a new rapid examination protocol. *PLoS One* 2021;16:e0262159.
- 4) 厚生労働省:インフルエンザ診断マニュアル(第4版) [Internet]. 2018 Available from: [influenza20190116.pdf](https://www.niid.go.jp/niid/influenza20190116.pdf)([niid.go.jp](https://www.niid.go.jp))
- 5) Merckx J, Wali R, Schiller I, et al. Diagnostic Accuracy of Novel and Traditional Rapid Tests for Influenza Infection Compared With Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction: A Systematic Review and Meta-analysis *Ann Intern Med.* 2017;167:394-409.
- 6) Ip DK, Lau LL, Nancy Leung NH, et al. Viral Shedding and Transmission Potential of Asymptomatic and Paucisymptomatic Influenza Virus Infections in the Community. *Clin Infect Dis.* 2017;64:736-742.
- 7) 明石祐作, 鈴木広道, 竹内優都ほか. 発症から検査までの時間がインフルエンザ迅速抗原検査に与える影響: 前向き観察研究. *感染症学雑誌* 2021;95:9-16.
- 8) Kiyasu Y, Akashi Y, Sugiyama A, et al. A Prospective Evaluation of the Analytical Performance of GENECUBE® HQ SARS-CoV-2 and GENECUBE® FLU A/B. *Mol Diagn Ther.* 2021;25:495-504.
- 9) Okude M, Suzuki K, Naito A, et al. Development of a mobile laboratory system in hydrogen fuel cell buses and evaluation of the performance for COVID-19 RT-PCR testing. *Sci Rep.* 2023; 13:17546.
- 10) Stellrecht K A. The Drift in Molecular Testing for Influenza: Mutations Affecting Assay Performance. *J Clin Microbiol.* 2018;56: e01531-17.