第58回日本小児保健協会学術集会　教育講演

小児ウイルス感染症診断のピットフォール

吉川哲史（藤田保健衛生大学医学部小児科学）

Ⅰ．はじめに

臨床現場での保険診療時においては未だ理想のウイルス学的検査実施のハードルは高いが，日常ありふれたウイルス感染症を正確な検査法に基づいて診療することは，各臨床像の理解を深めるうえでも極めて重要である。ウイルス感染症に限らず，感染症診断のgolden standardは病原体の分離と血清診断である。しかしながらウイルス分離には培養細胞を必要とするうえ，分離結果の判定までにタイムラグがあり実際の日常診療での有用性という観点からは問題がある。昨今はpolymerase chain reaction（PCR）法をはじめとした分子生物学的診断法がポピュラーになってきているが，迅速性，感度の点では非常に優れている一方，その結果の理解には注意も必要である。本講演では，ウイルス学的診断法の基礎，最近のトピックスである麻疹の実験室診断，さらにわれわれが主に研究しているヘルペスウイルスのウイルス学的診断法について概説する。

Ⅱ．ウイルス学的診断の基礎

ウイルスは細菌に比べはるかに小さな微生物であり，それゆえエネルギー産生や蛋白質合成のための小器官や酵素などを宿主細胞に依存する。よって，細菌と異なり人工培地（無細胞培地）では増殖できず，患者から起因ウイルスを分離するには必ず適切な培養細胞を用いる必要がある。生きた培養細胞を常時準備しておくことは病院検査室レベルでは不可能であり，地方衛生研究所や研究機関レベルでの対応が不可欠となる。ウイルス学的診断法には，ウイルス分離に加え血清学的診断，抗原検出，分子生物学的診断法があるが，診断のgolden standardは病変部からのウイルス分離と血清学的診断である。しかしながらウイルス分離と血清学的診断はともに最終結果を得るまでに時間を要し，患者診療に直結するpoint of care test（POCT）としては不適である。POCTの観点からは，抗原検出と分子生物学的診断（病変部からの起因ウイルスゲノム検出）が優れており，特に抗原検出は簡便性，迅速性の点で優れ，現実にインフルエンザウイルス，アデノウイルス，RSウイルスなどをはじめとして一般臨床でも広く使用されている。しかしながら，抗原検出検査のみではウイルス感染症を制御するうえで問題があり，**表1**に示したような各検査法の長所，短所をよく理解して使い分ける必要がある。

Ⅲ．麻疹の実験室診断の重要性

昨今の麻疹患者の多数を占めるsecondary vaccine failure（SVF）症例は，典型的な麻疹の臨床経過に比べ軽症で皮疹の性状も異なるため，正しく診断，隔離されず感染源となる可能性が懸念される。われわれの施設でかつて経験したSVF症例を示す。MMRワ

表1　起因ウイルス検出方法の長所と短所

方法	POCT	感染性の有無	薬剤耐性	分子疫学
分離	×	◎	◎	○
抗原検出	◎	×	×	×
分子生物学的検査	○	×	○	○

POCT，point of care test

藤田保健衛生大学医学部小児科　〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪1-98
Tel：0562-93-2634　Fax：0562-93-4593

Presented by Medical*Online

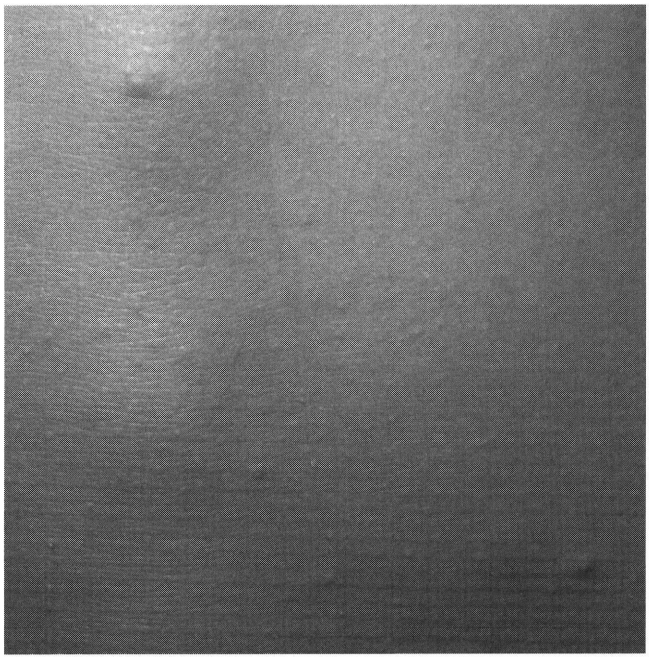

図1　SVF症例の皮疹
背部に数ヶ所の虫刺され様の皮疹を認める

クチンを日本と米国で二度接種したにもかかわらず麻疹を発症，家族内で二次感染を生じた。カタル症状を欠き，38℃程度の発熱と虫刺され様の発疹（図1）が初発症状であり，それらの症状，所見からは麻疹と診断するのは困難であった。しかし，頬粘膜にコプリック斑を認めたこと，問診で通学中の学校で麻疹らしい患者が出ているという情報を得たことから麻疹を疑った。さらにこの症例から感染した，家族内二次感染例もSVF症例であった。いずれも末梢血単核球からウイルスが分離され，図2に示すように急性期から既に麻疹抗体が認められ，かつそれが数日後には異常高値を示した。典型的なSVF症例はこのような特徴的な抗体変動を示すため，血清診断により初感染例と区別することが可能である。いずれにせよ，このような症例を経験すると成人麻疹，特にSVF症例は臨床診断ではなく実験室診断が不可欠なことが理解できる。

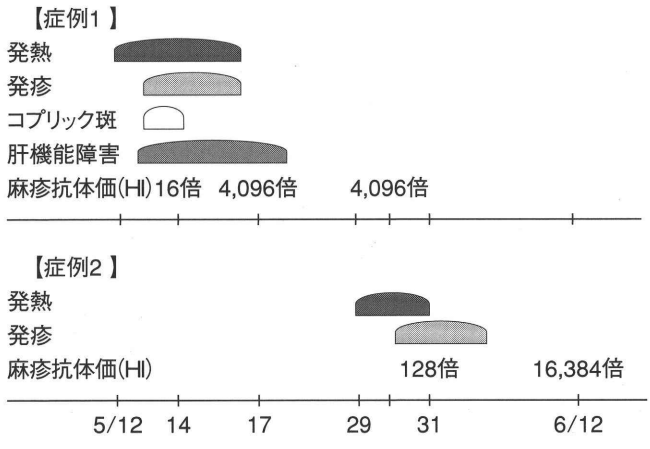

図2　SVF症例の臨床経過と抗体反応

麻疹ウイルス分離は，咽頭・鼻腔拭い液，血液（リンパ球），尿などの検体をB95a細胞（マーモセットBリンパ球細胞）あるいはVeroSLAM細胞に接種することにより可能である。われわれの施設では，常時ヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）を分離するために臍帯血リンパ球を培養しており，麻疹が疑われる患者リンパ球をこの臍帯血リンパ球と混合培養することによりウイルスを分離している（ウイルス量にもよるが24時間程度で判定可能）。しかしながら，ウイルス分離は一般病院検査室では不可能で，実際には患者から採取した臨床検体をウイルス分離可能な研究施設へ送るか，そのような施設での麻疹ウイルスゲノム検出に頼ることとなる。後に述べる血清診断同様，現場での迅速診断には有用ではないが，分離ウイルスの遺伝子解析により分子疫学データに基づいた感染経路の解明にもつながり，感染対策を考慮するうえで有用な情報が得られる[1]。最新のわが国における分離麻疹ウイルスの分子疫学成績を示す（図3）。かつてわが国にはD3やD5株が蔓延しており，それが米国をはじめとした麻疹排除国に“輸出”されることが問題となっていた。しかしながら昨今の分離株をみると，東南アジアからのD9株が“輸入”され地域流行を引き起こしたり，今年になってからはフランスをはじめとした欧州での麻疹流行に端を発し[2]，彼の地からのD4株が“輸入”され関東での流行につながっていることが明らかとなっている。このように，分離ウイルスの遺伝子配列を解析することにより，感染経路解明，さらには感染制御対策の構築にも役立つことがある。よっ

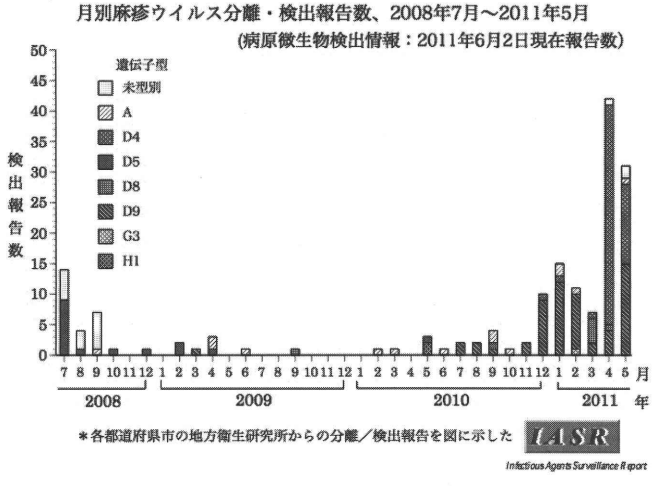

図3　国立感染症研究所感染症情報センター（ホームページからの引用）

Presented by Medical*Online

て，可能であれば保健所を通し患者からのウイルス分離を行っておくことは大切なことである。

麻疹の血清診断には，現在中和試験（NT 法），補体結合反応（CF 法），赤血球凝集抑制試験（HI 法），ゼラチン粒子凝集法（PA 法），酵素免疫法（EIA 法）がある。最近問題となっているのは，HI 法の感度が低下して過去の感染確認や予防接種による抗体獲得率などを評価する際に注意が必要な点と，EIA 法による麻疹 IgM 抗体陽性所見の信頼性である。麻疹ウイルス感染の既往を確認する際，HI 法では陰性にもかかわらず NT 法では十分な抗体価が確認できる場合がある。また，低レベルの麻疹 IgM 抗体陽性は，他のウイルス（例：パルボウイルス，HHV-6 など）抗体との交差反応性の可能性が示唆されている[3]。

Ⅳ．ヘルペスウイルス感染症の分子生物学的診断

臓器移植患者をはじめとした医原性免疫不全患者の数は，昨今増加の一途をたどっている。このような患者においては，ウイルス感染免疫の主役である細胞性免疫能が低下していることが多く，さまざまなウイルス感染症が日和見感染性病原体として問題となる。中でもヘルペスウイルスは初感染後宿主体内に潜伏感染し，宿主免疫能の低下に伴い再活性化し臨床症状を起こす（回帰発症）という生物学的性状を持つため，このような患者において問題になることが多い。

前述のように，ウイルス分離，血清診断はウイルス感染症診断の golden standard ではあるが，結果判定までに時間を要し，現場での迅速診断の観点からは問題が多い。一方，PCR 法をはじめとした分子生物学的診断法は，高感度かつ迅速な結果判定が可能なため，臨床現場での迅速診断という点においては極めて有用な方法である。しかしながら，潜伏感染，再活性化という特徴的な感染形態をとるヘルペスウイルス感染症の診断においては，感度が良すぎることが潜伏感染と再活性化の判別を困難にするという問題が生ずる。この点を解決するためには，適切な臨床検体を選択するとともにリアルタイム PCR 法をはじめとした定量 PCR 法あるいはリアルタイム RT-PCR 法を用いる必要がある（図 4）。潜伏感染状態と再活性化状態では，ウイルス DNA 量に明らかな差があるため，各検体中のウイルス DNA 量を定量化し比較検討することで，臨床上問題となる再活性化の診断が可能となる。

前記のようにリアルタイム PCR 法は，免疫不全患者のヘルペスウイルス感染症診断に極めて有用な方法ではあるが，いまだどこの病院検査室にでも設置されている状況にはない。われわれは，より簡便な分子生物学的診断法を目指し，loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法を応用したヘルペスウイルス感染症診断法を開発した[2,3]。この方法は等温での核酸増幅が可能なため，安価でコンパクトな機器で短時間にウイルス DNA 増幅が可能である。よって，病院検査室レベルあるいは POCT の確立という観点では画期的な方法である。さらに，血清や拭い液をサンプルとして使用する場合，DNA 抽出過程を省略することも可能であり[4,5]，検査の簡略化，コスト削減ができる。現在までに全てのヘルペスウイルスについて，LAMP 法による DNA 検出システムを確立したが，臨床現場でのより迅速かつ簡便な分子生物学的診断法を目指し，新たな改変を加えている。

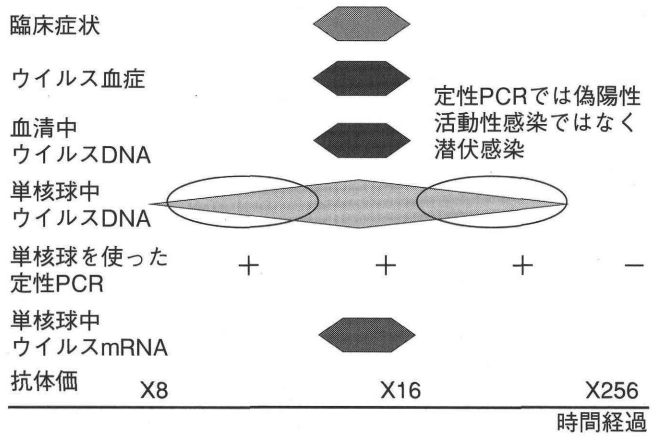

図 4　HHV-6 再活性化時のウイルス動態と抗体反応

Ⅴ．おわりに

冒頭にも述べたが，現在の保険診療では血清学的診断の基本であるペア血清での抗体価測定自体もままならない。しかしながら，正しいウイルス学的診断が診療レベル向上に不可欠なことは理解していただけたと思う。今後もよりレベルの高いウイルス学的診断法の開発とその臨床応用を目指し研究を続けてゆきたい。

文　献

1）Nagai M, Xin JY, Yoshida N, Miyata A, Fujino M, Ihara T, Yoshikawa T, Asano Y, Nakayama T. Modified adult measles in outbreaks in Japan, 2007-2008. J Med Virol. 2009；81（6）：1094-1101.

2）Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, Suzuki R, Aki-

Presented by Medical*Online

moto S, Ohashi M, Suga S, Nishimura N, Ozaki T, Nishiyama Y, Notomi T, Ohta Y, Asano Y. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method-loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 2004 ; 42 : 140-145.

3) Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Suga S, Suzuki K, Kawana T, Nishiyama Y, Asano Y. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol 2005 ; 43 : 951-955.

4) Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Fujita A, Sugata K, Suga S, Ohashi M, Nishimura N, Ozaki T, Asano Y, Yoshikawa T. Direct detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by the loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Virol 2007 ; 39 : 22-26.

5) Sugiyama H, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Kawana T, Asano Y. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR and virus isolation for detection of herpes simplex virus in genital lesions. J Med Virol 2005 ; 75 : 583-587.

Presented by Medical*Online