「小児肺炎診療ガイドライン」に関する基礎的検討

5. ウイルス性肺炎の診断 ウイルス検査

鈴木 宏

(新潟大学大学院医歯学総合研究科国際感染医学講座)

要旨: 急性呼吸器疾患 (ARI) は多種類のウイルスが原因であり, 検査室診断は必要となる。ウイルス分離や血清抗体検査が行われても, 結果が出るまでには時間がかかった。しかし, インフルエンザウイルス感染への簡便な迅速診断の導入と抗ウイルス剤の登場により, 臨床の第一線の環境が大きく変化した。更には, PCR 法による抗原検索も高頻度で行われるようになった。

ウイルス学的検索に際し, 臨床症状, 年齢, 季節性, 周囲での流行状況などから病因ウイルスを推測して検索する事は大切である。また, 不明な ARI においては検体を積極的に採取し, 県や国の検査機関に送ることも重要である。

Abstract: Acute respiratory infections (ARI) are the most common afflictions of humans, and mostly are caused by viruses. A definitive diagnosis of virus infections requires laboratory confirmation. Viral isolation and serological diagnosis are carried out, but several days require for receiving those final results. However, introduction of rapid diagnosis and effective antiviral drugs for influenza completely changed those conditions at the first line of clinics. Furthermore, PCR-based assay as viral detection methods was used frequently.

On the laboratory diagnosis, causative agents should be presumed on the basis of clinical manifestation, age, seasonality, and epidemiological information surrounding sites. The clinical samples from unknown ARI cases also should be collected actively and sent to prefectural or national laboratories for further research. (JJPP 2003; 14: 194-197)

Key word: ウイルス, 急性呼吸器疾患

1. はじめに

急性呼吸器疾患 (ARI) の臨床症状は, 発熱, 頭痛以外に咳, 鼻汁, 鼻閉, 咽頭痛などと非特異的でも多種類のウイルスが病因であることより, 臨床症状だけからの鑑別は不可能である¹⁾。しかし, ウイルス性 ARI の病原診断として, ウイルス分離や血清抗体検査で行われても, 結果が出るまでには時間がかかり治療とは直接結びつかなかった。このような状況が, インフルエンザウイルス感染への簡便な迅速診断の開発・導入に加え抗ウイルス剤の登場, 更には PCR 法による抗原検索も高頻度で行われるなど大きく変化してきた。

2. 対象ウイルス

歴史的には「かぜ」の病原ウイルス発見として, 1933年にインフルエンザウイルスが発見されて以降, 1950, 60年代には現在報告されているウイルス性 ARI の大多数のウイルスが分離された (表1)⁴⁾。しかし, 2001年になり新たにパラミキソウイルスに分類されるメタニューモウイルスが, RSと同様な喘鳴を主訴とする患者から検出された^{3,4,5)}。本ウイルスは乳幼児期に主に罹患し, RSウイルスと重感染すると重症化するとされる⁷⁾。更には, コロナウイルスは1965年に分離され, 普通感冒 (common cold) の病因となるが^{1,2)}, これとは全く異なる新型ウ

ウイルスとして、平成15年2月から発生した重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome, SARS) の病原である SARS コロナウイルスが登場した³⁾。なお、他には、高い頻度で見られるのがライノウイルスで「はなかぜ」の病因で100種以上あり、次いでパラインフルエンザウイルスである。なお、アデノウイルスは咽頭炎、咽頭結膜熱 (プール熱)、RSウイルスは乳幼児の急性細気管支炎の病因となり、インフルエンザウイルスは全体の5-15%である (表2)。

3. 対象患者

臨床症状は、発熱、頭痛以外に咳、鼻汁、鼻閉、咽頭痛等の呼吸器症状を呈する患者が対象である。特にインフルエンザ様疾患 (influenza-like illness, ILI) の診断基準として、37.8 (又は38.0) °C以上の発熱に加えて、咳嗽、咽頭痛、鼻汁の一つの症状を有する人をインフルエンザワクチン効果判定に用いている⁷⁾。

4. 検査材料

検査材料は、発症早期の咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻咽頭吸引液あるいは洗浄液、BAL (気管支洗浄液) などがある。RSウイルス、インフルエンザウイルスなどでは咽頭拭い液より鼻咽吸引液が分離率や抗原診断検査陽性率が高いとされている。検査までの保存は短期的には4 °C保存が最適で、特にRSウイルスにおいては凍結は避けるべきである。しかし、長期に保存する際は-80 °Cで行う。

5. 検査診断法

診断法として、血清診断、ウイルス分離、抗原検査、PCR 法等があるが、ゴールドスタンダードでしかもウイルス性状を知るためにも分離は重要である。これらの検査法を駆使しても、診断可能なのは全体の20-30%に止まるが、これは検体採取法、輸送法、検査法などが原因としてあげられる。季節によってウイルス性

表1 「かぜ」の病原ウイルスの発見推移²⁾

発見年	ウイルス
1933年	インフルエンザウイルス
1953	アデノウイルス
1956	パラインフルエンザウイルス、ライノウイルス、RSウイルス
1958	エンテロウイルス
1965	コロナウイルス
2001	メタニューモウイルス
2003	SARSコロナウイルス

表2 「かぜ」の病原ウイルスの種々の特性 (2) を改変)

ウイルス	年間の検出頻度	季節変動			
		冬	春	夏	秋
ライノウイルス	30-50%	+			+
コロナウイルス	10-15	+			
インフルエンザウイルス	5-15	+			
RSウイルス	5	+			
パラインフルエンザウイルス	5				+(1,2型)
アデノウイルス	<5		+		
エンテロウイルス	<5			+	
メタニューモウイルス	不明	?			
不明	20-30				

ARI の病原ウイルスは異なり (表 1), この情報は診断法を選別する際に重要となる。

1) 血清診断 (抗体検査)

検査法とし, 中和抗体法 (NT), 補体結合反応 (CF), 蛍光抗体法 (FA), 酵素抗体法 (ELISA), ラジオイムノアッセイ (RIA) 等がある。診断には急性期と回復期のペア血清を用い, 4 倍以上の抗体の有意上昇を確認するが, 最終診断に時間を要することより, 参考意見に留まることが多い。初感染では IgM 抗体を検出を行い, 検査法とし FA 法が簡便であるが, ELISA 法や RIA 法はより感度が高い。

抗体検索は病原ウイルスの特定を補佐する手法であり, むやみにスクリーニングとして多数のウイルス検査することは避けるべき事と思われる。

検査結果の解釈時の注意点として, ワクチン接種歴, 抗原の変異等も結果の評価には考慮する必要がある。また, 既存抗体によるいわゆる抗体価の「頭打ち」現象から, 抗体価上昇が有意に上昇するにいたらず, 感染したと判定されない例がある点を留意すべきである。

2) ウイルス分離

多種類の ARI 関連ウイルスを分離するには, まづウイルスに最適な培養細胞の選択が必要である。この対処法として, 沼崎らは HEF (ヒト胎児由来細胞), Hep-2 (ヒト喉頭ガン由来), Vero (サル腎由来), MDCK (犬腎由来), HMV-II (ヒトメラノーマ細胞由来) の 5 種類の細胞を組み合わせたマイクロプレート法を開発し多くの成果を得ている^{8,9)}。この方法の利点として, 細胞変成 (CPE) を示した細胞の種類により, 同定に要する時間を短縮できることである (表 3)。例えば, MDCK に CPE を示せば, インフルエンザウイルスの可能性があり, 次のステップである血清型の分類に進める。また, エンテロウイルスには多くが含まれるが, HEF, HEp-2, Vero 細胞の 3 種に同時に CPE がくれば, ポリオウイルスの可能性が強く, これでも次の血清型の分類に進めるなどである。

3) 抗原診断法

検査法とし蛍光抗体法 (FA), 酵素抗体法 (ELISA), ラジオイムノアッセイ (RIA) 等がある。ウイルス性肺炎の診断法として, 今後迅

表 3 複数細胞を用いた急性呼吸器疾患の病原ウイルス検出

Virus	Cell				
	HEF	HEp-2	Vero	MDCK	HMV-II
Influenza A, B	—	—	—	◎	—
Influenza C	—	—	—	—	◎Had
Parainfluenza	—	—	○	—	◎Had
Mumps	—	—	◎Sy	—	—
RS	△	◎Sy	△	—	—
Adeno	◎Ad	◎Ad	△	—	—
Rhino	○	—	—	—	—
Cox A7, 9, 16	◎En	—	○En	—	—
Cox B	—	◎En	◎En	—	—
Echo	◎En	—	○En	—	—
Polio	◎En	◎En	◎En	—	—
HSV	◎	○H	○H	—	—
CMV	◎C	—	—	—	—

増殖: ◎非常に良好 ○良好 △低 —なし

Had: hemadsorption positive (血球吸着試験陽性)

Sy: syncytium

CPEC 細胞変性反応

Ad: アデノウイルス様

En: エンテロウイルス様

H: ヘルペスウイルス様

C: サイトメガウイルス様

速診断の開発は進むと思われる。しかし、目的とするウイルスの選択には、常にウイルスの特性である病因ウイルス別の罹患年齢や季節によって頻度が異なる特徴に留意すべきである。その際に、サーベイランス情報は参考となる。

迅速分離診断法として、シェルバイアル法として細胞に接種する際に遠心法を加え、感染1-2日後に蛍光抗体法を用いて種々のウイルス診断も可能である¹⁰⁾。

市販の迅速診断法がインフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス等で行われている。特にインフルエンザウイルスでは処理過程が単純な迅速診断キットが主流である。感度や特異性で問題が残るが、短時間で、どのレベルの施設でも手軽に用いられる特徴より、臨床現場では今後ますます重用されると思われる。

4) 分子生物学的手法 (ウイルス核酸検出法)

PCR法による診断は殆どのウイルスに対して短時間に可能であることから、今後はこの方法による仕事が増加すると思われる。PCR産物からの genotype (遺伝子型) の決定と、各型の関連をシーケンスを行って樹形図を作成してのウイルス伝播形式の検討もおこなう分子疫学が主流をなしている。PCR産物からの制限酵素切断パターン解析も同様に用いられている。しかし、このPCRによる検査にあたっては常に汚染物の混入による擬陽性を念頭に入れ、実験操作は慎重に行う必要がある。

インフルエンザにおいては抗ウイルス剤が使用されているが、耐性株の出現が問題となっている^{11,12)}。この診断には分離ウイルスからでも行われるが、PCRによる特定の塩基の変異による診断も可能である。

6. おわりに

ウイルス性ARI、肺炎診断にはウイルス学的検索は不可欠ではあるが、ウイルスによっては迅速診断が導入され、どのレベルの医療機関でも診断が行われるようになってきた。この際には、臨床症状、年齢、季節性、周囲での流行

状況などから病因ウイルスを推測して検索を勧める事が大切である。更には、今回のSARS騒ぎでも有効に機能した例があるが、不明なARIにおいては、咽頭拭い液や鼻咽頭吸引液あるいは洗浄液、ペア血清などを採取・保存し、県や国の検査機関に送ることは極めて重要である。

参考文献

- 1) 鈴木 宏. かぜ病原ウイルスの現状. 今日の治療. 4: 88-96, 1996.
- 2) Heikkinen T, Jarvinen, T. The common cold. Lancet 361: 5159, 2003.
- 3) van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med. Jun; 7(6): 719-24, 2001.
- 4) Greensill J, McNamara PS, Dove W, et al. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. Emerg Infect Dis. 9: 372-5, 2003.
- 5) 鈴木 陽, 渡邊王志, 西村秀一. 喘鳴をきたした小児からのhuman metapneumovirusの検出. 感染症誌77: 467-468, 2003.
- 6) CDC. Update: outbreak of severe respiratory syndrome-worldwide, 2003. MMWR; 52: 241-248, 2003
- 7) Nicholson KG (editor). Managing influenza in primary care. Blackwell Science UK. 1999.
- 8) Numazaki, Y, Oshimat, Ohmi A et al. A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. Microbio Immunol. 31: 1085-1095, 1978.
- 9) 沼崎義夫. ウイルス分離の簡便法. 小児科臨床, 54: 127-132, 1991.
- 10) Eagler HD, Selepak ST. Effect of centrifuging shell vials at 3,500xg on detection of viruses in clinical specimens. J Clin Microbiol. 32: 1580-1582, 1994.
- 11) Saito, R, Oshitani, H, Masuda, H, Suzuki, H. Detection of amantadine-resistant influenza A strains in nursing homes by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis with nasopharyngeal swabs. J. Clin. Microbiol. 40: 84-88, 2002.
- 12) H. Suzuki, R. Saito, H. Oshitani. Excess amantadine use and resistant viruses. Lancet 358: 1910, 2001.