

特集

呼吸不全をきたしうるウイルス感染症

ウイルスによる呼吸器感染症の診断

賀来敬仁・柳原克紀

キーワード：抗原検査, 核酸検査, ウイルス感染症

I. はじめに

呼吸器感染症のうち、急性上気道感染症および急性気管支炎の原因微生物の多くは、ウイルスである。しかし、インフルエンザウイルスやRSウイルスなど一部のウイルスを除いて、呼吸器感染症の原因微生物としてウイルスを同定することは行われていない。これは、インフルエンザウイルス以外のウイルスについては有効な治療薬がないためである。そのため、ウイルスによる呼吸器感染症の多くは問診、身体所見のみで臨床的に診断されることがほとんどである。

2016年に薬剤耐性（AMR）対策アクションプランが決定され、抗菌薬の適正使用が国家プロジェクトとして推進されている。その一環として2017年6月に厚生労働省から発表された抗微生物薬適正使用の手引き第一版では、急性気道感染症の原因微生物の9割がウイルスであることから抗菌薬が使用される症例は限定されている¹⁾。しかし、急性気道感染症の症例の多くで抗菌薬投与が行われているのが現状である^{2,3)}。このような抗菌薬の不適切な使用を防ぐためには、呼吸器感染症でウイルスを原因微生物として同定することが重要である。本稿では、ウイルスによる呼吸器感染症の診断について概説する。

II. 呼吸器感染症の原因微生物

感染症の診断および治療の決定において、疫学情報

は重要である。呼吸器感染症では、部位によって原因微生物が異なる。急性気道感染症ではさまざまな症状を呈するため、感染部位を厳密に分けることは難しいが、ここでは米国内科学会（ACP）による分類に準拠して、感冒、急性鼻副鼻腔炎、急性咽頭炎、急性気管支炎の4つの病型に分類する¹⁾。また、胸部単純X線写真やCTなどで肺野に新たな陰影の出現があったものを肺炎と定義する。

急性気道感染症の原因微生物の多くはウイルスである。感冒ではライノウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルスが原因微生物として多い（表1）⁴⁾。急性鼻副鼻腔炎は感冒とオーバーラップしていることが多く、ウイルス感染が発端となることがほとんどであるが、成人で2%、小児では6～13%で続発性の細菌性鼻副鼻腔炎を発症する^{5,6)}。急性咽頭炎では、ライノウイルス、コロナウイルス、アデノウイルスなど多くがウイルス感染症であるが、A群β溶血性レンサ球菌（GAS）も15～30%の症例で検出される（表2）⁷⁾。そのため、Centorの基準またはMcIsaacの基準などを用いてGASによる急性咽頭炎の可能性が高い場合にはGASの抗原検査を行うことも重要である^{8,9)}。急性気管支炎ではインフルエンザウイルス、ライノウイルス、コロナウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、ヒトメタニューモウイルス、パラインフルエンザなどのウイルスが原因微生物の約90%を占め、残りの10%ではマイコプラズマ、クラミドフィラ、百日咳菌などの細菌が原因となる¹⁰⁾。これらの細菌は一般的な細菌による気道感染症とは異なり、ウイルス感染症と同様の症

表1 感冒の原因ウイルス (文献4より改変)

ウイルス	割合 (%)
ライノウイルス	40～50
コロナウイルス	10～15
パラインフルエンザウイルス	5
RSウイルス	5
インフルエンザウイルス	25～30
アデノウイルス	5～10
メタニューモウイルス	5

表2 急性咽頭炎の原因微生物 (文献7より作成)

原因微生物	割合 (%)
ウイルス	
ライノウイルス	20
コロナウイルス	≧5
アデノウイルス	5
ヘルペスウイルス (1, 2型)	4
パラインフルエンザウイルス	2
インフルエンザウイルス	2
コクサッキーウイルス、EBウイルス、 サイトメガロウイルス	<1
細菌	
A群β溶血性レンサ球菌	15～30
C群β溶血性レンサ球菌	5
マイコプラズマ	<1
クラミドフィラ	不明

状を呈することが多いことに注意が必要である。

肺炎では原因微生物のほとんどが細菌である。ウイルスが関与する肺炎としては、インフルエンザウイルス罹患後の肺炎球菌、黄色ブドウ球菌、インフルエンザ桿菌などによる二次性細菌性肺炎が広く知られている。また、造血幹細胞移植や臓器移植などを行った免疫不全患者ではサイトメガロウイルス肺炎も問題となる。しかし、近年では遺伝子検査の普及に伴って、さまざまなウイルスが肺炎を起こすことが明らかとなってきている。米国で行われた入院を要する成人市中肺炎患者における原因微生物(細菌、真菌、ウイルス)についての検討では、22%の患者でウイルスのみが検出されたのに対して、細菌のみが検出されたのは11%であった¹¹⁾。最も多く検出された原因微生物はライノウイルス(8.6%)で、次いでインフルエンザウイルス(5.8%)、肺炎球菌(5.1%)であった。62%の症例で原因微生物が検出されなかったことや、感染ではなく定着している原因微生物を検出している可能性があるな

どの問題はあるが、市中肺炎でもウイルスが原因微生物として稀ではないことが示唆されている。さらに、重症急性呼吸器症候群(severe acute respiratory syndrome: SARS) コロナウイルスや中東呼吸器症候群(Middle East respiratory syndrome: MERS) コロナウイルスなど新興感染症としてのウイルス肺炎も報告されており、原因微生物としてウイルスを検出することが重要になってきている。

Ⅲ. ウイルスによる呼吸器感染症の検査

1. ウイルス分離培養法

細菌や真菌と異なり、培地で分離培養することはできない。そのため、ウイルスを培養するときにはVero細胞、MRC-5細胞、HeLa細胞、MDCK細胞などの細胞株を用いる。ヒトのインフルエンザウイルスの分離ではイヌ腎臓尿管上皮細胞由来のMDCK細胞が用いられ、1個の粒子があれば、 $10^7 \sim 10^8$ まで増幅させることができる感度に優れた検査法であり、抗原検査法と比較すると感度で1,000～10,000倍以上の差がある¹²⁾。インフルエンザウイルスの検出を例にすると、臨床検体をMDCK細胞に接種して3日～1週間で細胞変性効果が観察される。その細胞上清を使用して赤血球凝集能の有無を確認し、その後、型および亜型に特異的な抗血清を用いて赤血球凝集抑制試験を行って、ウイルスの同定と抗原解析を行う。ウイルス分離培養法は、感度が高くかつ亜型の同定まで可能な検査であるが、結果が判明するまでに1週間程度を要することや細胞株を用いるため一般的な検査室では施行できないことなどから、早期診断および治療のための検査として用いることは難しい。また、適切なウイルス輸送培地を用いて保存しないと分離できないことがある点にも注意が必要である。

2. 抗原検査

抗原検査のうち、ベッドサイドで施行可能な体外診断用医薬品として市販されているのは、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルスである。いずれのキットも、免疫クロマトグラフィー法を用いており、呼吸器検体から直接検査を行うことが可能である。簡便かつ迅速に結果が得られることからPoint-of-Care Testing (POCT)として臨床現場で最も多く使用されているウイルス検出法

表3 発症からの時間とインフルエンザ迅速抗原検査 (文献12より引用・改変)

文献	発症からの時間	感度 (95%CI)、%	特異度 (95%CI)、%
Gordon, et al. 2009 (文献14)	Day1	51.9 (40.3 ~ 63.3)	98.4 (95.3 ~ 99.7)
	Day2	75.1 (68.3 ~ 81.1)	97.9 (96.0 ~ 99.1)
	Day3	74.2 (62.0 ~ 84.2)	97.9 (94.1 ~ 99.6)
	Day4	57.9 (33.5 ~ 79.7)	98.6 (94.2 ~ 100)
Gordon et al. 2010 (文献15)	<24h	41.7 (22.1 ~ 63.4)	97.9 (88.9 ~ 99.9)
	≥24h	72.1 (59.9 ~ 82.3)	98.4 (94.3 ~ 99.8)
Keitel et al. 2011 (文献16)	≤12h	35.0 (19.0 ~ 55.0)	100 (88.0 ~ 100)
	12 ~ 24h	66.0 (54.0 ~ 76.0)	97.0 (86.0 ~ 100)
	24 ~ 48h	92.0 (80.0 ~ 97.0)	96.0 (82.0 ~ 99.0)
	>48h	59.0 (36.0 ~ 78.0)	100 (90.0 ~ 100)

であるが、偽陰性が多いことに注意が必要である。インフルエンザウイルス迅速抗原検出キットについての meta-analysis では、感度 62.3% (95% CI, 57.9 ~ 66.6%)、特異度が 98.2% (95% CI, 97.5 ~ 98.7%) と感度が低かった¹³⁾。特に発症早期は、インフルエンザウイルスのウイルス量が少ないため感度が低い (表3)^{14~16)}。この欠点を補うために、銀増幅技術を応用した好感度の免疫クロマトグラフィー法 (銀増幅 IC 法) が開発されている。銀増幅 IC 法は、標識である金コロイド粒子を銀粒子で増幅することで従来法よりも好感度にインフルエンザウイルスを検出することが可能となっている。我々の検討でも、従来法と比較して銀増幅 IC 法の陽性率が有意に高かった ($p=0.006$)¹⁷⁾。

この他にも、酵素免疫法 (EIA) と蛍光抗体法 (FA) によるウイルスの検出も行われている。いずれもウイルス抗原と特異抗体を反応させ、酵素反応または蛍光色素により検出する方法であるが、それぞれのウイルスに特異的な抗体が必要となるため、一般的な検査室では行われていない。また、サイトメガロウイルスでは、サイトメガロウイルスが感染した白血球細胞に発現する CMV pp65 抗原を検出する C7-HRP 法という免疫組織化学染色を用いた検査も行われている。しかし、欧米のサイトメガロウイルス検出で使用されている核酸増幅検査と比較すると感度が低く、我々の C7-HRP 法と real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を比較した検討では real-time PCR 法が C7-HRP 法の 2 倍の陽性率を示した¹⁸⁾。

3. 核酸増幅検査法

遺伝子検査法は、ターゲット遺伝子の一部分を特異

的かつ大量に増幅して検出する方法であり、非常に高感度かつ特異的な検出系を構築することが可能である。そのため、サンプル中に含まれるウイルス粒子が極微量の場合でも検出することができる。核酸増幅法としては、PCR 法と loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法が広く利用されている。インフルエンザウイルス、ライノウイルス、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、コロナウイルス、メタニューモウイルスなどは RNA ウイルスであり、逆転写反応 (reverse transcription : RT) を行う必要がある。

我々のインフルエンザ抗原検査法と RT real-time PCR 法を比較した検討では、抗原検査法で陰性であった 77 検体について RT real-time PCR 法での解析を行ったところ、23 検体 (29.9%) でインフルエンザ A、4 検体 (5.2%) でインフルエンザ B が検出された¹⁹⁾。このように抗原検査法と比較して、PCR 法は感度が非常に高い。しかし、核酸の抽出、増幅、検出、解析の各過程で的手法での作業が必要となることや、核酸の増幅でサーマルサイクラーなどの高額な機器が必要となることから、実施可能な施設は大学などの研究機関や地方衛生研究所などに限られている。また、インフルエンザでは国立感染症研究所がインフルエンザ診断マニュアルなどでプライマーの配列や RT-PCR 法の条件設定などを公開しているが、標準化されたキットなどが販売されているわけではないため、各施設でプライマーの設計などを行う必要があるという問題点もある。

LAMP 法では、使用する酵素は 1 つのみで 65℃ 付近の一定温度で反応できるため、サーマルサイクラーなどの特別な機器は必要ない。RNA についても RT-LAMP

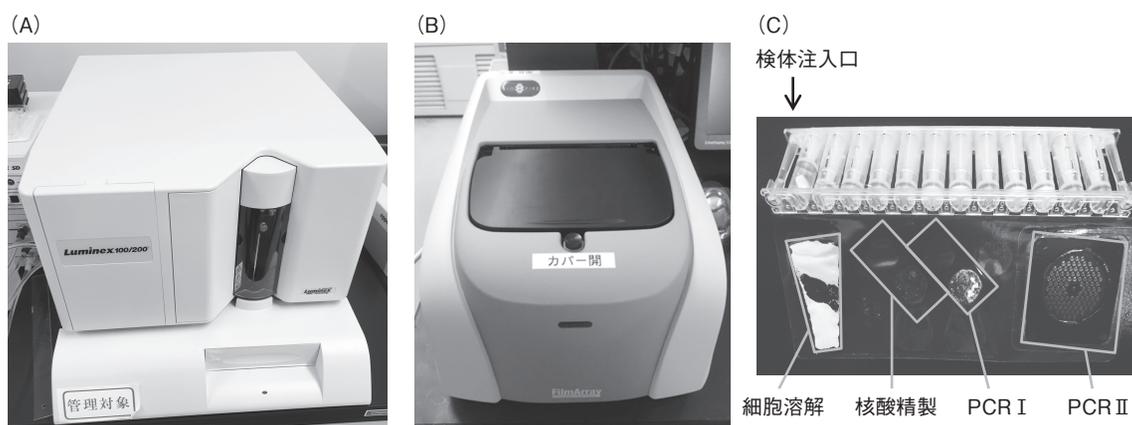


図1 網羅的遺伝子検査システム

Luminex100/200 システム (A) と FilmArray システム (B)。FilmArray システムでは専用のフィルムパウチ (C) を使用して核酸の抽出・増幅・解析全ての過程を行う。

法では逆転写酵素を同時に添付すれば DNA の場合と同じ段階で増幅が可能である。増幅効率が極めて高く、短時間に複雑かつ巨大な増幅産物が産生されるため、DNA 合成の副産物であるピロリン酸マグネシウムの濁りを利用した濁度検出法や蛍光キレート試薬による蛍光検出法などの目視検出法も開発されている。RT-LAMP 法によるウイルス呼吸器感染症の検出についても多くの報告があり、インフルエンザウイルス A/H1N1 2009 を対象とした検討では、臨床検体での感度が 96.3% と良好であった²⁰⁾。RT-LAMP 法の検査キットとしては H1 pdm2009 インフルエンザウイルス、A 型インフルエンザウイルス、H5 亜型インフルエンザウイルス、SARS コロナウイルスが販売されており、体外診断用医薬品として使用できる。LAMP 法は増幅反応から検出までを同一チューブ内で行え、迅速かつ感度・特異度の高い検査が行えることから、POCT として期待されている。

4. 網羅的遺伝子検査

これまでの遺伝子検査は 1 つの病原体をターゲットとするものが主流であったが、近年では同時に多項目の病原体を検出できる遺伝子検査法が開発されている。ウイルスによる呼吸器感染症では特異的な所見がないことと日常臨床で使用可能な検査が限られていることから、原因微生物を特定しないままに診療が行われているケースが多い。これは、急性気道感染症の原因微生物の多くがウイルスであるにもかかわらず抗菌薬が処方されていることの要因の 1 つと考えられる。網羅的

遺伝子検査を用いれば、1 つの検体から呼吸器感染症の原因ウイルスの多くを検出することが可能となるため、日本でも承認され普及すればウイルスによる呼吸器感染症の診断を正確に行うことが可能になる。本稿では、網羅的遺伝子検査として Luminex 社の xTAGTM 呼吸器感染ウイルス検出キット (xTAG RVP) とビオメリュー社の FilmArray[®] Respiratory panel (FilmArray RP) について概説する (図 1)。

Luminex システム (図 1A) はフローサイトメトリーの原理に基づいた検出システムで、感染症領域だけでなくさまざまな領域の基礎研究から臨床研究まで幅広い分野で用いられている。xTAG テクノロジーは Luminex システムで核酸を検出・解析するための技術であり、感染症領域では xTAG RVP 以外に 15 種類のウイルス、細菌、寄生虫を同時に検出できる胃腸病原体検出キットが研究用試薬として販売されている。xTAG RVP では、鼻咽頭拭い液からサブタイプも含めて 18 種類のウイルスを検出でき、インフルエンザウイルス A/B、RS ウイルス、パラインフルエンザウイルス、ヒトメタニューモウイルス、エンテロウイルス/ライノウイルス、ヒトボカウイルス、コロナウイルス、アデノウイルスといった呼吸器感染症の主な原因ウイルスを網羅している (表 4)。インフルエンザウイルスにおける抗原検査法との比較では、抗原検査法でのインフルエンザ A、インフルエンザ B、RS ウイルス、ヒトメタニューモウイルス、アデノウイルスの陽性率が 76.7%、78.4%、93.5%、68.6%、38.1%であったのに対して、xTAG RVP では 98.4%、100%、88.2%、97.4%、85.7% と良好な結果

表4 xTAG RVP で検出可能なウイルスとサブタイプ

ウイルス	同定可能なサブタイプ
インフルエンザウイルス A	H1
	H3
	2009 H1N1
インフルエンザウイルス B	
RS ウイルス	
パラインフルエンザウイルス	パラインフルエンザ 1
	パラインフルエンザ 2
	パラインフルエンザ 3
	パラインフルエンザ 4
ヒトメタニューモウイルス	
エンテロウイルス / ライノウイルス	
コロナウイルス	NL63
	229E
	OC43
	HKU1
アデノウイルス	
ヒトボカウイルス	

を示した²¹⁾。しかし、real-time PCR 法との比較では感度 78.8%、特異度 99.6%であり、低ウイルス量の時に検出率が低いと報告されている²²⁾。また、xTAG RVP では核酸の抽出、cDNA 合成、増幅、ハイブリダイゼーション、解析の各過程で用手法による作業が必要となるため、ルーチン検査として行うのは現状では難しい。

FilmArray システム (図 1B) は全自動遺伝子検査システムであり、採取した検体をフィルムパウチ (図 1C) に注入して機械にセットするだけで核酸の抽出、増幅、解析の全ての過程が全自動で行われる。FilmArray RP ではサブタイプを含めて 20 種類の病原微生物を検出することが可能であり、xTAG RVP と比較するとヒトボカウイルスは検出できないが、ウイルス性呼吸器感染症との鑑別が難しい百日咳菌、肺炎クラミジア、肺炎マイコプラズマを検出することが可能である (表 5)。FilmArray RP では機械にセットしてから 1 時間以内に解析が完了するため、in-house の real-time PCR 法でウイルスの検査をしていた施設では病原微生物の同定まで大幅に時間が短縮されたと報告されている²³⁾。また、気管支肺胞洗浄液からの検出についても報告があり、鼻咽頭拭い液以外の検体からも原因微生物を検出できる可能性がある²⁴⁾。real-time PCR 法との比較では、インフルエンザウイルス A/B、ヒトメタニュー

表5 FilmArray RP で検出可能な病原微生物とサブタイプ

病原微生物	同定可能なサブタイプ
ウイルス	
インフルエンザウイルス A	H1
	H3
	H1-2009
インフルエンザウイルス B	
RS ウイルス	
パラインフルエンザウイルス	パラインフルエンザ 1
	パラインフルエンザ 2
	パラインフルエンザ 3
	パラインフルエンザ 4
ヒトメタニューモウイルス	
エンテロウイルス / ライノウイルス	15-30
コロナウイルス	NL63
	229E
	OC43
	HKU1
アデノウイルス	
細菌	
百日咳菌	
肺炎クラミジア	
肺炎マイコプラズマ	

モウイルス、パラインフルエンザウイルス 1/3、RS ウイルスで感度が 98.4 ~ 100%と非常に良好であった²⁵⁾。その検討ではアデノウイルスの感度が 54.5%と低かったが²⁵⁾、その後の改良で 90.5%まで改善している²⁶⁾。我々のインフルエンザ流行期の検討では、外来を受診した急性上気道感染症患者 (n=20) のうちインフルエンザウイルスが 45%と最も多くの患者で検出されたが、40%の患者ではインフルエンザウイルス以外のウイルスが検出された²⁷⁾。また、肺炎患者 (n=22) でも 27%でウイルスが検出された²⁷⁾。このように網羅的な全自動遺伝子検査システムを用いることができれば、多くの症例で呼吸器感染症の原因微生物を同定できる可能性がある。

IV. おわりに

ウイルスによる呼吸器感染症の診断については、これまで臨床診断されることが多く、臨床において病原微生物の同定までできる症例は限られていた。しかし、網羅的遺伝子検査など新たな検査法が開発されてきており、これらが普及してくれば、原因微生物を同定して診断・治療を行うことが可能になると考えられ

る。しかし、網羅的遺伝子検査は抗原検査法と比較して高額の検査となるため、実際にどのような症例で活用するかについては議論をしていく必要がある。

本稿の全ての著者には規定されたCOIはない。

参考文献

- 1) 厚生労働省健康局結核感染症課：抗微生物薬適正使用の手引き第一版。東京，2017。
- 2) Schroeck JL, Ruh CA, Selick JA, et al : Factors associated with antibiotic misuse in outpatient treatment for upper respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 ; 59 : 3848-52.
- 3) Jones BE, Sauer B, Jones MM, et al : Variation in outpatient antibiotic prescribing for acute respiratory infections in the veteran population : a cross-sectional study. *Ann Intern Med.* 2015 ; 163 : 73-80.
- 4) Turner RB : The common cold. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (Eds). Philadelphia, ELSEVIER SAUNDERS. 2015, pp748-52.
- 5) DeMuri GP and Wald ER. Sinusitis. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ (Eds). Philadelphia, ELSEVIER SAUNDERS. 2015, pp774-84.
- 6) 急性鼻副鼻腔炎診療ガイドライン作成委員会：急性鼻副鼻腔炎診療ガイドライン2010年版。日鼻誌。2010；39：144-98。
- 7) Bisno AL : Acute pharyngitis. *N Engl J Med.* 2001 ; 344 : 205-11.
- 8) McIsaac WJ, Kellner JD, Aufricht P, et al : Empirical validation of guidelines for the management of pharyngitis in children and adults. *JAMA.* 2004 ; 291 : 1587-95.
- 9) McIsaac WJ, Goel V, To T, et al : The validity of a sore throat score in family practice. *CMAJ.* 2000 ; 163 : 811-5.
- 10) 一般社団法人日本感染症学会，公益社団法人日本化学療法学会，JAID/JSC 感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会，呼吸器感染症WG：JAID/JSC 感染症治療ガイドライン—呼吸器感染症—。日本化学療法学会雑誌。2014；62：1-109。
- 11) Jain S, Self WH, Wunderink RG, et al : Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. *N Engl J Med.* 2015 ; 373 : 415-27.
- 12) 川上千春：ウイルス分離培養検査の実力。日本医事新報。2016；4830：33-6。
- 13) Cartrand C, Leeflang M, Minion J, et al : Accuracy of rapid influenza diagnostic tests : a meta-analysis. *Ann Intern Med.* 2012 ; 156 : 500-11.
- 14) Gordon A, Videia E, Saborio S, et al : Performance of an influenza rapid test in children in a primary healthcare setting in Nicaragua. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7907.
- 15) Gordon A, Videia E, Saborio S, et al : Diagnostic accuracy of a rapid influenza test for pandemic influenza A H1N1. *PLoS One.* 2010 ; 5 : e10364.
- 16) Keitel K, Wagner N, Lacroix L, et al : Performance characteristics of a rapid immunochromatographic assay for detection of pandemic influenza A (H1N1) virus in children. *Eur J Pediatr.* 2011 ; 170 : 511-7.
- 17) 岩永祐季, 小佐井康介, 松田淳一ほか：高感度インフルエンザ抗原迅速検査システムの有用性。感染症学雑誌。2017；91：747-51。
- 18) 森沙耶香, 森永芳智, 西村典孝ほか：サイトメガロウイルスモニタリングにおける抗原測定法とDNA定量法の比較検討。臨床病理。2016；64：881-6。
- 19) Tsushima Y, Uno N, Sasaki D, et al : Quantitative RT-PCR evaluation of a rapid influenza antigen test for efficient diagnosis of influenza virus infection. *J Virol Methods.* 2015 ; 212 : 76-9.
- 20) Nakauchi M, Yoshikawa T, Nakai H, et al : Evaluation of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays for rapid diagnosis of pandemic influenza A/H1N1 2009 virus. *J Med Virol.* 2011 ; 83 : 10-5.
- 21) Gharabanghi F, Hawan A, Drews SJ, et al : Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbial Infect.* 2011 ; 17 : 1900-6.
- 22) Gadsby NJ, Hardie A, Claas EC, et al : Comparison of the Luminex Respiratory Virus Panel fast assay with in-house real-time PCR for respiratory viral infection diagnosis. *J Clin Microbiol.* 2011 ; 48 : 2213-6.
- 23) Rogers BB, Shankar P, Jerris RC, et al : Impact of rapid respiratory panel test on patient outcomes. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 ; 139 : 636-41.
- 24) Azadeh N, Sakata KK, Brighton AM, et al : FilmArray Respiratory Panel assay : comparison of nasopharyngeal swabs and bronchoalveolar lavage samples. *J Clin Microbiol.* 2015 ; 53 : 3784-7.
- 25) Loeffelholz MJ, Pong DL, Pyles RB, et al : Comparison of the FilmArray Respiratory Panel and prodesse real-time PCR assays for detection of respiratory pathogens. *J Clin Microbiol.* 2011 ; 49 : 4083-8.
- 26) Doern CD, Lacey D, Huang R, et al : Evaluation and implementation of FilmArray version 1.7 for improved detection of adenovirus respiratory tract infection. *J Clin Microbiol.* 2013 ; 51 : 4036-9.
- 27) 賀来敬仁, 橋口浩二, 小佐井康介ほか：呼吸器感染症における網羅的全自動遺伝子検査システムの有用性。日本呼吸器学会誌。2017；6 Suppl：141。抄録番号 MS106。