

感染と抗菌薬

Infection and Antimicrobials

別 刷

||||| Vol.8 No.4 2005 |||||

ヴァン メディカル

冬の院内ウイルス感染対策

沼崎 啓*

はじめに

ウイルスは病院（院内）感染においても一般的な病原体であり、その病原性および臨床症状は多岐にわたる。ウイルス感染症の診断は抗原、抗体、ゲノムおよび特異抗体の検出、ウイルス分離、組織中のウイルス粒子または封入体の検出などによって得られるが、一般病院では日常的にこれらの検査を行うことは困難なことも少なくない。ウイルス感染症の流行状況には季節的な変動が認められるものもあり、診断の際の参考となることも多い。

冬季の主なウイルスによる院内感染

1. 消化器系ウイルス感染

消化器感染に関連する主なウイルスには、ノロウイルス、ロタウイルス、アストロウイルス、アデノウイルスの一部など、経口感染により急性胃腸炎をもたらすものがある。またエンテロウイルスであるポリオウイルスのように経口感染により咽頭や消化管に感染した後に脳や脊髄などで発症するものもある。A型肝炎ウイルスとE型肝炎ウイルスも経口感染するが、肝臓が主な感染増殖部位である。

これらのウイルスは糞便中に排泄され、ヒトからヒトへ糞便—経口感染するため、飲食物、手指、器具などの衛生管理が重要である。中には気道感染を発症するものも含まれ、乳児院などの閉鎖的小集団においてしばしば流行を繰り返す。乳幼児の間では汚染された玩具を口にすることにより感染することもある。感染予防のためには糞便および汚染された手袋、ガウンなどの処理が問題となる。マスクは気管洗浄などの特殊な場合を除き、一般には不要である。

ノロウイルスについては70°Cの加熱や1,000ppm次亜塩素酸ナトリウムによる消毒効果を示唆する報告がある。アデノウイルス、ロタウイルスについては、アルコール、

* 国立感染症研究所ウイルス第三部第三室・室長（ぬまざき・けい）

200～1,250ppm 次亜塩素酸ナトリウム、ポビドンヨードなどの比較的良好な不活性化作用が報告されている¹⁾。一般にエンベロープを有するウイルスの消毒は、高水準消毒薬または熱水によるか、念入りな洗浄、清拭により物理的にウイルスを除去した上で、仕上げとして500～1,000ppm の次亜塩素酸ナトリウム液やアルコールを用いる¹⁾。

便器、フラッシュバルブ、水道ノブ、ドアノブなどはアルコールにより清拭する。ベッドパンはフラッシャーディスインフェクターで処理する。エンベロープの無いウイルスを念頭に置いた手洗いは、流水による手洗いでウイルスを物理的に除去することが基本であり、手洗い後に速乾性消毒薬を適用するかポビドンヨードスクラブで手洗いをする。

ロタウイルスによる冬季の急性胃腸炎は乳幼児に多いが、ノロウイルスによるものは成人に多い。症状は嘔吐、発熱、下痢などであるが、ロタウイルスの場合は灰白色の水様便を特徴とし、脱水を起こすこともある。感染経路は汚染された水、食品を摂取することによる経口感染と、患者の糞便中に排泄されたウイルスの接触伝播による糞便—経口感染（二次感染）である²⁾。ノロウイルスは生カキなどによる食中毒の起因因子であるが、施設内、病院内で二次感染としての集団感染も多発している。

2. 気道系ウイルス感染

症状は軽微なものから重篤なものまで幅が認められる。気道感染を起こすウイルスにはインフルエンザ、パラインフルエンザ、respiratory syncytial (RS)、アデノ、エンテロ、ライノ、コロナなどが知られている。感染経路は飛沫感染および汚染された手指および器物を介しての感染であるが、予防的措置としては患者の隔離、マスク、ガウン、手袋の使用および手洗い、うがいの励行や手指の消毒などがあげられる。インフルエンザの流行では高齢者では肺炎などの重篤な合併症を起こす場合が多く、しばしば死因となる。小児の脳炎、脳症の合併が社会的にも問題となっているが、ワクチン接種、抗ウイルス薬の投与も日常的に行われている。

インフルエンザウイルスでは咳嗽などによる飛沫感染が主である。RS ウイルスなどではウイルスで汚染された手指による鼻粘膜や眼粘膜への接触感染が多い。かぜ症候群症例などを診療する際には、原因微生物が不明であることが多く、飛沫感染のみならず接触感染するウイルスも多いため、病院感染対策にはマスク着用とともに手指消毒も重要である。

インフルエンザは世界的に流行を続けている呼吸器系感染症であり、北半球では1～2月を中心とする冬に流行する。感染性が強く、多くの健常人が感染し、発熱、頭痛、腰痛、筋痛、上気道炎、全身倦怠感などのかぜ症候群様症状を起こす。通常は1週間程度で自然緩解する。病院内でもインフルエンザ集団感染が多発しており、医療従事者のワクチン接種が重要な予防策である。

インフルエンザウイルスはA型、B型、C型の3属に分類され、A型はさらに抗原性の種類により、鳥インフルエンザウイルスも含めて、15種類のH抗原、9種類のN抗原に分類される。通常ヒトに感染しうるA型はH 1～3かつN 1～2であり、B型、C型もヒトに感染する。日本を含め世界的に流行しているのは、A(H1N1)型(ソ

連かぜ), A (H3N2) 型 (香港かぜ), B 型の 3 種類である。過去には A (H2N2) 型ウイルスの大流行があり, 近年は A (H1N2) 型による感染もみられる。

重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome : SARS) は非定型肺炎を特徴とした呼吸器感染症である。下痢を伴う場合も多く, 呼吸管理や集中治療を要する重症例もしばしば発生する。致死率は14~15%といわれ, 老人に重症例が多く, 小児はあまり罹患しない。集団感染事例の多くが病院感染であり, 病院における対策が重要である。消毒の対象物は患者の気道分泌物, 糞便, 吐物, 血液, 体液などで汚染された箇所, 患者に使用した器具・物品や病室等である。一般にコロナウイルスの消毒薬感受性は良好であるが, アルコールないし500~1,000ppm 次亜塩素酸ナトリウムによる清拭または30分浸漬, あるいは80°C10分間の熱水消毒などにより行う。

冬季のウイルスによる院内感染の対策と課題

院内感染防止の目的で感染者の隔離も行われる。ハイリスク患者の隔離や見舞客の制限も行われている。手洗いの励行のみならず, ガウンやゴーグルの使用も効果的である。感染対策の専門スタッフの編成も実施可能な場合は感染防止に関する効果が報告されている。ウイルス院内感染の効果的な予防のためには日常的に実施が可能な迅速診断法の確立が不可欠であるが, 実際には簡便な診断用キットの入手が困難であったり, 保険診療上の点数の設定の無いウイルス検査も多い。

症状が認められない場合でも無症候性のウイルス排出も認められるため, 感染源になりそうな部位や物に接触した場合には滅菌消毒 (不活化) が必要である。

おわりに

冬季のウイルス感染は閉鎖された空間で急速に拡大することが特徴であり, 感染症サーベイランスの情報が参考となることもある。有効なワクチンが開発されていないウイルス感染では感染源対策が重要である。一般にウイルスの活動性感染の評価は困難を極める。院内感染の予防に関してはこのような冬季のウイルス感染症の特性に関する理解が必要であろう。

文献

- 1) Swanink CMA, Voss A : Viruses. Wenzel R, Edmond M, Pittet D et al (Eds), A guide to infection control in the hospital, B. C. Decker Inc., Hamilton, Ontario, Canada, 1998, p159-165
- 2) Pacini DL, Brady MT, Budde CT, Connel MJ, Hamparian VV, B Hughes JH : Nosocomial rotaviral diarrhea : pattern of spread on wards in a children's hospital. J Med Virol 23 : 359-366, 1987

マイコプラズマ肺炎

沼崎 啓

小児看護 2005年5月 第28巻第5号 通巻第348号

へるす出版

マイコプラズマ肺炎

沼崎 啓*

Numazaki Kei

* 国立感染症研究所ウイルス第三部第三室室長

要旨：肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)は、5歳以上の小児の非定型(異型)肺炎の病原体としてはもっとも頻度の高いものの一つであるが、呼吸器以外の多彩な全身の臨床症状の随伴も知られている。マイコプラズマ感染症は他の呼吸器感染症とは臨床像、診断法、治療薬の選択などの点で異なる特徴を有する。本稿では、小児のマイコプラズマ感染症対策に関する最近の知見を紹介した。

Key Words：*Mycoplasma pneumoniae*, 非定型肺炎, マクロライド, 肺外合併症

はじめに

肺炎マイコプラズマ(*Mycoplasma pneumoniae*)は肺炎球菌などと並んで市中肺炎(community-acquired pneumonia)の重要な因子として知られ、外来患者における罹患率の高さも指摘されている。長期間にわたり持続する咳嗽、喀痰、発熱などのかぜ症候群の軽度の臨床症状や乏しい理学的所見に引き続き、胸部X線所見では著しい異常陰影や浸潤像を呈することが非定型(異型)肺炎の特徴である¹⁾。

非定型肺炎は、細菌性の定型肺炎と対比させるための名称で、胸部X線写真で一過性の肺浸潤像を呈する非細菌性肺炎という概念で包括されている。報告によっても異なるが、通常、異型肺炎の30～40%、流行年には60%程度が肺炎マイコプラズマによるものといわれているが、アデノウイルスやクラミジアなどによっても発症する。

*M. pneumoniae*は5歳以上の小児の異型肺炎の病原体としてはもっとも一般的なものであるが、ほかに気管支

炎、胸膜炎、咽頭炎、中耳炎、副鼻腔炎などの呼吸器感染症を発症する(表1)。また呼吸器病変以外の多彩な全身の臨床症状の随伴も知られている²⁾。*M. pneumoniae*感染症では他の起因子による呼吸器感染症との鑑別も臨床的に重要な問題となっている。

潜伏期と感染性のある期間

*M. pneumoniae*感染症の潜伏期間は約2～3週で、主として飛沫感染で閉鎖的環境において流行することもある。神奈川県衛生研究所が*M. pneumoniae*の家族内感染を調査した報告によると、初発者発病から続発者発病までの間隔は7日以内～28日で、15～21日がもっとも多く(43例中21例)、平均14日であった。

*M. pneumoniae*は細菌に分類されるが、細胞壁をもたないので、多形態性を示し、ペニシリン系、セフェム系などの細胞壁合成阻害の抗菌薬には感受性を示さない。分離には培地上にて2～4週間を必要とし、操作もやや煩雑で、他の菌増殖による検査不能例も発生する。感染様式は感染患者からの飛沫感染と接触感染によるが、地

表1 ●マイコプラズマ感染症の臨床像

I. 一般的なもの
1. 無症候性感染
2. 咽頭炎, 気管支炎, 肺炎, 胸膜炎などの呼吸器感染症
II. 比較的まれなもの
1. 脳炎, 髄膜炎, 脊髄炎, 末梢神経炎, ギラン・バレー症候群, 急性散在性脳脊髄炎(ADEM)およびその他の中枢神経系障害
2. 非定型発疹, 多型滲出性紅斑, スティーブンス・ジョンソン症候群
3. 肝炎, 肝機能障害, 肝脾腫, 脾炎
4. 溶血性貧血, DIC, 血球貪食症候群
5. 関節炎
6. 筋炎, 心筋炎
7. 中耳炎

域での感染拡大の速度は遅い。

病原体は侵入後, 粘膜表面の細胞外で増殖を開始し, 気道の粘膜上皮を破壊する。気道粘液への病原体の排出は初発症状発現前2～8日でみられ, 臨床症状発現時にピークとなり, 高いレベルでの排出が約1週間続いたあと, 4～6週間以上にわたり排出が続く。感染により特異抗体が誘導されるが, 持続期間はさまざまであり, 再感染もよく認められる。

マイコプラズマはヒトおよび動物に広く感染する病原体であり, *Mycoplasma* 属と *Ureaplasma* 属に分類されており, ヒトから分離同定されるマイコプラズマには14種類のものが知られている。これらのうち, 病原性が確定されているものは *M. pneumoniae*, *M. hominis*, *M. genitalium* および *Ureaplasma urealyticum* である。

M. pneumoniae による呼吸器感染症は臨床的に重要であるが, *M. genitalium* および *U. urealyticum* の泌尿生殖器感染も知られている。*M. genitalium* は男性の非クラミジア性非淋菌性尿道炎の20～30%から検出され, 子宮頸管炎患者からも正常妊婦に比較して有意に高い頻度で検出される。*M. penetrans* は AIDS 患者の尿より分離され, 疾患とのかかわりも示唆されている。このほかに小児科領域で *U. urealyticum* は上行性経羊水感染や産道感染によって新生児, とくに未熟児に慢性呼吸障害などを引き起こす可能性も報告されている。

M. pneumoniae は細胞内に DNA, RNA, リボゾーム

を有し PPLO などの培地上に自己増殖する。*M. pneumoniae* は細胞壁を保有せず, 三層からなる限界膜で包われていることから多型性であり, 球形の形状をとる場合には直径300nm 程度の大きさである。細胞壁合成阻害剤であるペニシリン系, セフェム系, β -lactam 系抗生物質は無効であるが, 50℃ 2分程度でその半分は不活化する。感染した *M. pneumoniae* は major attachment protein である P1蛋白で線毛上皮細胞の線毛間に付着し, 増殖を繰り返して気道に損傷を与える。

動物実験におけるリンパ球サブセットの検討では, *M. pneumoniae* 感染において CD8および CD25陽性細胞の増加を認めている。サイトカイン産生能の検討では IFN- γ および IL-10の高値を認めている。

これらの事実から, マイコプラズマ感染症の発症には常在細菌叢の存在が関与していることに加え, その発症病理には活性リンパ球や IFN- γ を中心とした Th-1系の宿主免疫応答が重要なトリガーとなっていることが示唆されている。

IL-6は無菌性髄膜炎や脳炎などの中枢神経系症状の合併例において上昇が認められる。夏型過敏性肺臓炎とマイコプラズマ肺炎で血清 KL-6値を比較検討した結果では, 前者で血清 KL-6値が高値を示したのに対し, マイコプラズマ肺炎では有意な上昇は認められない。

病院, 家庭, 保育園, 幼稚園, 学校などの小集団では散発性の流行を認めることもある。以前は4年のサイクルで周期性に流行を繰り返すとされたが, 近年ではこの周期にも変化が認められ, 3～5年の流行の幅がある。血清学的に診断されたマイコプラズマ肺炎について検討した結果では, 1988年以降は周期性が不明確となったという。

地域的な小流行例も認められ, 発症は一般に秋から冬が多い。マイコプラズマ肺炎の成立に関しては, 宿主の細胞性免疫反応や再感染の関与も推定されている。年齢的には学童に多く, 9～11歳にピークを認めることが多いが, 施設によっては4歳でピークを認めたという。この年齢分布は *C. pneumoniae* 感染症の年齢分布とは若干異なるものである。

マイコプラズマ肺炎は4～5歳以下の年齢層において発症頻度が低いとされるが, 2歳以下の乳幼児例も報

告されている。*M. pneumoniae* の P1 蛋白の遺伝子解析では I 型と II 型の流行の周期性の変化も報告されている³⁾。非流行年に認められるものは低年齢に多いという報告もあるが、年齢パターンに変化はないという報告もある。

肺炎、気管支炎を中心とする下気道感染症における起炎病原微生物の関与の実態について調査した結果では、下気道感染患児 921 例からの起炎因子の検出頻度は RS ウイルス 20.4%，インフルエンザ菌 9.8%，肺炎球菌 10.3%，*M. pneumoniae* 27.4% であった⁴⁾。これらの症例のうち複数起炎因子による肺炎は 25.6% で認められた。*M. pneumoniae* 感染が判明した P1 遺伝子の型別では II 型が大部分を占めた。5 歳未満の症例では RS ウイルスなどの検出率が高かったが、*M. pneumoniae* は全年齢層を通じて通年性に高率に検出された。

症 状

原発性非定型肺炎の概念は、前述のように臨床症状が比較的軽く、胸部 X 線上は著明な陰影を認めるというものである。通常、白血球増多はなくペニシリン系、セファロスポリン系などの抗生物質が無効ではあるが、比較的予後良好な肺炎というのが一般的である。胸部 X 線所見に比較して理学的所見には乏しいことも特徴としてあげられる。

異型肺炎の病原体はマイコプラズマ、クラミジア、ウイルスを始めとして多種にわたることから、臨床症状のみから病因診断に至ることは困難なことが多い。流行状況や家族内感染の有無も診断の助けとなることがある。

異型肺炎の約 30% 前後あるいは 30~60% を占めるとされる *M. pneumoniae* 肺炎も特徴的所見に乏しいことも多いが、発熱と咳嗽を主訴とすることが多い。咳嗽は病初期には乾性であるが次第に喀痰を伴う湿性のものとなり、発作性に夜間や早朝に出現することもある。咽頭痛、胸痛、眼球結膜充血、発疹などを伴うこともある。肺門リンパ節の腫脹を認めることもある。聴診では小水泡音や呼吸音の減弱など他の肺炎と同様の所見を認める。重症例では胸膜炎や胸水貯留を認める。乳幼児では喘鳴や呼吸困難を伴うこともある。また、*M. pneumoniae* は気管支喘息の発作を誘発したり、遷延させることもある。

肺炎は *M. pneumoniae* 感染者の約 3~5% に起こり、細菌性感染の場合にみられる膿性の喀痰は伴わず、症状がかなり遷延して頑固な乾性咳嗽が続く特徴がある。また、発熱、頭痛、咽頭痛、悪寒、全身倦怠など通常の呼吸器感染症状以外に、下痢、嘔吐などの消化器症状が認められることが多い。

乳児期から小児期にかけての喘息患児および非喘息患児において検討した結果では、喘息患児においてはいったん上昇した血清特異抗体の低下は認められていない。このような背景から喘息患児におけるマイコプラズマの持続感染も示唆されている。3 歳以下では多くの喘息患児に喘鳴を認めるが、喘鳴の随伴は年長の喘息患児では約半数程度である。マイコプラズマの I 型アレルゲンとしての役割も認められている。

診 断

M. pneumoniae 感染の胸部 X 線所見は肺区域・肺葉型、間質型、気管支肺炎型などに分類されるが、間質性の浸潤像を主体とするものが多い。陰影は、中・下肺野または肺門部に多く、1~3 週で消失することが多い。肺炎の胸部 X 線像では気管支肺動脈周囲間質陰影の拡大も特徴的である。

開胸肺生検の組織学所見では、肺胞内や気管支肺動脈周囲間質への炎症性細胞浸潤および肺泡道内の肉芽組織が認められている。胸部 CT 像では気管支および細気管支の拡張、壁肥厚像と小葉中心性粒状陰影を基本的な所見とする。

検査所見では、白血球は $10,000/\text{mm}^3$ 以下で増加しないことが多いが、 $20,000/\text{mm}^3$ 以上となることもある。回復期には好酸球増多も認められるが、赤沈値は正常から亢進するものまで幅がある。CRP 値は一般に軽度から中程度の陽性所見を示す。

M. pneumoniae と肺炎球菌による感染は小児の市中肺炎の 60% までに達するという報告もある。両因子の重複感染に関しては、*M. pneumoniae* による入院症例の約半数に肺炎球菌感染を認めたという⁵⁾。一方、肺炎球菌感染患児の約 10% では *M. pneumoniae* 感染を認めた。ほかの細菌やクラミジアなどとの重複感染も報告されている。*M. pneumoniae* の二次感染は経過の遷延化、重症化

表 2 ●マイコプラズマ感染症の実験室内診断法

-
- I. 分離培養法
 - II. 血清学的診断法
 - 1. 補体結合反応 (CF)
 - 2. 間接 (受身) 赤血球凝集反応 (IHA, PHA)
 - 3. 酵素抗体法 (EIA, ELISA)
 - 4. 粒子凝集反応 (PA)
 - 5. 高比重粒子凝集反応 (HDPa)
 - 6. 代謝阻止反応 (MI)
 - 7. 発育阻止反応 (GI)
 - 8. 寒冷凝集反応 (CHA) (補助的)
 - III. PCR, nested PCR 法
 - IV. DNA プローブ法
 - V. 直接蛍光抗体法 (DFA)
-

をもたらすという報告もある⁶⁾。

診断は一般に、血清中の特異抗体上昇の確認、もしくは患者の臨床材料よりの *M. pneumoniae* の分離による (表2)⁷⁾⁸⁾。分離培養はもっとも基本的な方法ではあるが、結果判明までに通常 1～4 週間という長時間を必要とし、手技もやや煩雑であるため、これを実施している施設は国内では限られているのが現状である。

実際には、*M. pneumoniae* が咽頭・気管支・肺などの材料より分離されれば診断的価値が高い。患者の咽頭・喀痰より得られた臨床検体を PPLO 培地 (寒天、液体および重層培地) に接種し、37℃ にて 7～10 日間培養し、寒天培地の場合、コロニー確認の後クローニングを行い、*M. pneumoniae* の生物学的性状 (赤血球吸着能、溶血能など) を利用し同定を行い、最終的には *M. pneumoniae* の抗血清を用いてのディスク法 (paper disc diffusion 法) によって同定する。

直接的蛍光抗体法 (DFA) は、咽頭ぬぐい液の抽出液をアセトン固定後、FITC 標識抗マイコプラズマモノクローナル抗体を作用させ、蛍光顕微鏡にて検鏡する方法である。本方法は迅速に結果を得ることができるが検出率にばらつきがみられ、特異性にも問題があり、検出感度がやや低いことも指摘されている。

早期診断を目的として PCR 法による咽頭からの *M. pneumoniae* DNA の検出法が開発されている。PCR 法は高感度かつ短時間で結果が得られることより、臨床的に有用性が高い診断法である。また PCR 法は、*M.*

pneumoniae の検出とともに他のヒト由来マイコプラズマの同定も可能である。そのほかに流行株の特異性や抗生物質治療中株の検出や抗生物質への耐性因子の検討も可能である。DNA プローブ法もヒト・動物のマイコプラズマ感染症の早期診断に用いられているが、感度がやや PCR 法に劣る。

臨床的に異型肺炎が疑われた 34 症例を対象に DNA プローブ法や nested PCR 法などの遺伝子検査法を実施した結果では、DNA プローブ法は分離培養法とほぼ同等の成績であったが、nested PCR 法では血清学的診断法や分離培養法で陰性の検体でも陽性結果を示すこともある。中枢神経系合併症と診断された 37 例 (無菌性髄膜炎 7 例、脳炎 30 例) の脳脊髄液および血清を検体とした結果では、脳脊髄液からマイコプラズマ DNA が検出されたものは無菌性髄膜炎では 7 例中 1 例で、7 日以内に神経症状を発症した脳炎では 17 例中 13 例であったという。

血清診断法としては、一般的には補体結合反応 (CF)、間接的赤血球凝集反応 (IHA または PHA、おもに IgM、IgG 抗体測定)、粒子凝集 (particle agglutination, PA) 反応、ELISA 法などが一般的である⁹⁾。そのほかにも代謝阻止反応 (MI、おもに IgM 測定) などが用いられている。方法により感度の違いがみられることもあり、確実な診断を得るのが困難な場合もあるため、複数の診断法を併用することも必要な場合がある。

CF 法での抗体価は感染後 1 週間程度で上昇し始め、1 カ月くらいでピークに達したのちに低下する。PA 法でも感染後 1 週間くらいで上昇し、2～6 週間程でピークに達するが、主として IgM 抗体が測定されるため、CF 法に比較して急速に低下する。一般的に CF 法は主として IgG クラスの抗体、PA 法は IgM クラスの抗体を測定するため、病態把握には両方を行うことが望ましいとされる。

単独血清は CF で 64 倍以上、IHA (PHA) で 320 倍以上を陽性とするが、ペア血清で 4 倍以上の抗体価の上昇あるいは単独血清でも高抗体価 (CF で 128 倍または PHA で 640 倍以上など) の出現が確認されれば診断的価値が高い。血清診断法の問題点としては、ペア血清による場合 1～2 週間の日時を要することや、乳幼児からの採血の問題により早期診断が困難なことなどがある。また、ほ

かのウイルス感染などの影響による抗体反応によって抗体価の変動がみられる場合もあり、慎重な判断が必要な場合もある。

発育阻止抗体は感染防御に関与し、抗体によるマイコプラズマのブドウ糖代謝阻止 (MI) を指標として測定される。MI 抗体の保有率は年齢が上がるほど上昇する。寒冷凝集反応 (CHA) は本症の診断においては補助的に用いられる。

抗原検査における蛍光抗体法 (ウィップレス) は分離培養法との比較で感度は90.3%, 特異度67.6%程度とされる。血清特異的 IgM 抗体検査におけるイムノカードマイコプラズマ抗体 (IC) 法はきわめて短時間で検出可能であるものの、検出感度などで検討課題も指摘されている。

合併症

M. pneumoniae 肺炎の合併症としては胸膜炎、空洞形成などの肺合併症のほかに、中枢神経系、循環器系、消化器系、血液系合併症などの多彩な肺外合併症も知られている。肝機能障害は高頻度で認める。肝障害の程度は一般に軽度で、ASL, ALT 値は100KU 程度の上昇にとどまる。肺炎球菌性肺炎では他の起炎菌による肺炎に比べて血清ビリルビンが上昇しやすい傾向を認めるが、本症では軽度の上昇を認める。肝障害の出現時期は発症時が多いが、回復期に上昇する場合もある。

中枢神経系合併症では髄膜炎、脳炎、ギラン・バレー症候群などが知られている^{10)~12)}。皮膚病変としては非定型発疹、多型浸出性紅斑、スティーブンス・ジョンソン症候群の合併も多い。末梢神経炎、筋炎、心筋炎、中耳炎、関節炎などの合併も報告されている。また DIC (播種性血管内凝固症候群) や血球貪食症候群の合併も報告されている¹³⁾。

一般に小児においては、中枢神経系合併症は初発の呼吸器症状から10日以降に出現する。*M. pneumoniae* 感染後に急性散在性脳脊髄炎 (ADEM) を発症した例の髄液検査では軽度の細胞増多を呈し、血清抗体の持続高値と MRI 上で両側大脳深部白質に散在性病変を認めている。呼吸器症状の強い ADEM では *M. pneumoniae* 感染に伴うものも念頭におく必要がある。このような症例では、メチルプレドニゾロンのパルス療法が著効を示すことも

あり、発症に抗 Gal-C 抗体を介した自己免疫機序が関与している可能性も推定されている。

治 療

M. pneumoniae 肺炎の治療には蛋白合成阻害剤であるマクロライド系、テトラサイクリン系抗生物質が一般に用いられる¹⁴⁾¹⁵⁾。臨床治療成績よりみて *M. pneumoniae* の除菌作用はマクロライド系よりテトラサイクリン系抗生物質、とくにミノサイクリン (MINO) の除菌作用が強く、投与 3~5 日で気道上から除菌することが可能である。CAM やニューキノロン系抗生物質もかなり強い除菌効果が認められた報告もみられる。

テトラサイクリン系薬剤では MINO がマイコプラズマ肺炎のみならず、細菌の重複感染にも有効である。実際にはテトラサイクリン系薬剤では菌芽の色素沈着、骨の発育や造血能に対する副作用の問題もあり、おもに 8 歳以上の小児が投与の対象となる。

M. pneumoniae の臨床株および血清型が異なるヒト由来 *U. urealyticum* 14 株についてニューキノロン系抗菌剤およびマクロライド系抗生物質に対する感受性を最少発育阻止濃度 (MICs) および最少殺菌濃度 (MBCs) で測定した結果では、ニューキノロン系抗菌剤のうちグレパフロキサシンおよびスバルフロキサシンが強い活性を示し、以下オフロキサシン、シプロフロキサシンの順であった。

マクロライド系ではロキシシスロマイシン、クラリスロマイシン (CAM) が強い抗菌力を示し、次いでエリスロマイシン (EM)、ジョサマイシンの順であったという。ニューキノロン系の抗菌剤では、その MBCs は MICs 値より 3~5 倍の値を示したのに対し、マクロライド系抗生物質では MICs 値の 100~1,000 倍以上の高い MBCs 値を示すものが認められる。

マイコプラズマ肺炎は細菌性肺炎に比較して一般的に重篤な経過をとることは少ない。本症の治療においての問題点の一つは、本症の確診が得られるまで日数がかかる場合が多く、疑診にて治療を行わねばならないことである。肺炎の治療を行う際、胸部 X 線陰影は改善し炎症反応も陰性化しているにもかかわらず、長期にわたり咳嗽が持続することが多くみられる。一般には胸部 X 線所

見の改善後、なお1週間くらいの化学療法を行う必要があるとされる。

肺炎の治療効果判定の一般的指標としては、治療開始後の白血球数、CRP、赤沈値の正常化、発熱の消失、胸部X線所見の改善などがあげられる。これらの結果から、最近ではCAMやアジスロマイシン(AZM)などのニューマクロライド系薬剤の臨床的有用性も報告されている。重症例に対してはクリンダマイシンの点滴静注を用いることもある。

EM耐性株は23SrRNA遺伝子の2063位あるいは2064位に点変異を起こしており、2063位変異株は14員環マクロライド抗生物質に、2064位変異株はこれらに加えて16員環抗生物質に対しても高度の耐性を示す。

中枢神経系合併症の発症に関しては免疫学的機序の関与も推定されている。髄液で異常所見が認められても培養やPCR法で*M. pneumoniae*が検出されないこともある。*M. pneumoniae*感染症ではその75%で脳組織に対する自己抗体の出現を認めることがあるものの、神経症状とは必ずしも相関しない。*M. pneumoniae*呼吸器感染症においても高率に免疫複合体が検出されている。これらの症例では静注用 γ グロブリンの投与が症状の改善に効果を示すこともある¹⁶⁾。

病棟における感染対策

感染症法における取り扱いではマイコプラズマ肺炎は4類感染症定点把握疾患であり、全国約500カ所の基幹定点医療機関から毎週報告されている。診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下のいずれかの方法によって病原体診断や血清学的診断がなされたものが報告の対象となる。具体的には気道から病原体が検出された場合や血清抗体の有意な上昇または血清抗体の著明な高値(PHA抗体価640倍以上、CF抗体価128倍以上)を認めた場合などである。

学校保健法における取り扱いでは、本疾患は学校において予防すべき伝染病のなかには明確に規定されていない。学校で流行した場合、必要があれば、学校長が学校医の意見を聞き、第3種学校伝染病としての措置を講じることができる。条件によっては出席停止の措置が必要と考えられる伝染病の一つとして例示されている。登

校・登園については、急性期が過ぎて症状が改善し、全身状態の良いものは登校可能となっており、流行阻止の目的というよりも、患者本人の状態によって判断すべきであると考えられる。

自験例

以下に、最近経験した具体的な症例を呈示する。

【症例1】 13歳、男児。

発熱、発疹、湿性咳嗽、嘔気、食欲不振を主訴に入院した。入院後の腰椎穿刺の結果では細胞増多を認め、髄液中のマイコプラズマ抗体も高値であった。胸部X線所見では左下肺に浸潤影を認めた。諸検査の結果、マイコプラズマ肺炎に伴う肝機能障害と髄膜炎と診断された。さらに経過中の発疹の出現および消退に伴い、色素沈着を認めた。また、マイコプラズマ肺炎の回復期に起立性調節障害も合併した。

【症例2】 12歳、男児。

複視を主訴に入院した。入院時の身体所見で項部硬直、小脳症状をはじめとする多彩な神経症状を認めた。血清マイコプラズマ(PA)抗体は2,560倍と上昇し、髄液検査では単核球増多を認めた。これらの所見より、マイコプラズマ感染に伴う髄膜炎として化学療法を中心とする治療を開始したが、神経症状の改善は認められなかった。MRIでは右脳幹に散在するT₂高信号領域を認めた。抗GM1抗体の上昇を認めたが、PCR法では脳脊髄液からマイコプラズマDNAは検出されなかった。この時点でマイコプラズマ感染後の脳幹脳炎の診断を得て、 γ グロブリン静注を3日間続け、その後に神経症状の劇的な改善を認めた。

おわりに

肺炎マイコプラズマは抗菌薬の有効な病原体として位置づけられ、小児科の日常診療において遭遇する機会も多い。本性は臨床像、診断に至る過程、治療薬の選択などで他の小児感染症とは異なる特徴を有する。

現在では、非定型肺炎の診断と治療に関してもさまざまな進歩も認められるが、マイコプラズマ感染症の病態に関しては依然として不明な点も少なくない。

今後の本感染症の研究の進歩に期待するとともに、第

一線の多くの施設でも実施が可能な迅速診断および安全で有効性の高い治療法の確立に関しても新たな展開を期待するものである。

文 献

- 1) 沼崎啓：肺炎マイコプラズマ。小児科診療，66：2201-2208，2003。
- 2) Cassell, G. H., Cole, B. C. : Mycoplasmas as agents of human disease. N. Engl. J. Med., 304 : 80-89, 1981.
- 3) Numazaki, K., Umetsu, M., Adachi, N. : *Mycoplasma pneumoniae* infection and its genotypical characterization in children of Hokkaido, Japan. In Vivo, 17 : 421-424, 2003.
- 4) Numazaki, K., Chiba, S., Umetsu, M., et al. : Etiological agents of lower respiratory tract infections in Japanese children. In Vivo, 18 : 64-72, 2004.
- 5) Toikka, P., Juven, T., Virkki, R., et al. : *Streptococcus pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* coinfection in community acquired pneumonia. Arch. Dis. Child, 83 : 413-414, 2000.
- 6) Hammerschlag, M. R. : *Mycoplasma pneumoniae* infections. Infectious Diseases in Clinical Practice, 11 : 123-129, 2002.
- 7) Daxboeck, F., Krause, R., Wensch, C. : Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin. Microbiol. Infect., 9 : 263-273, 2003.
- 8) Nagayama, Y., Sakurai, N., Yamamoto, K., et al. : Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from children with lower-respiratory-tract infections. J. Infect. Dis., 157 : 911-917, 1988.
- 9) Jacobs, E. : Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections ; a critical review of current procedures. Clin. Infect. Dis., 17 (Suppl. 1) : S79-82, 1993.
- 10) Pfausler, B., Engelhardt, K., Kampfl, A. et al. : Post-infectious central and peripheral nervous system diseases complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection ; report of three cases and review of the literature. Eur. J. Neurol., 9 : 93-96, 2002.
- 11) Smith, R., Eviatar, L. : Neurologic manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infections ; diverse spectrum of diseases ; a report of six cases and review of the literature. Clin. Pediatr., 39 : 195-201, 2000.
- 12) Papaevangelou, V., Falaina, V., Syriopoulou, V. et al. : Bell's palsy associated with *Mycoplasma pneumoniae* infection. Pediatr. Infect. Dis. J., 18 : 1024-1026, 1999.
- 13) Chrysanthopoulos, C., Eboriadou, M., Monti, K. et al. : Fatal disseminated intravascular coagulation caused by *Mycoplasma pneumoniae*. Pediatr. Infect. Dis. J., 20 : 634-635, 2001.
- 14) Hammerschlag, M. R. : *Mycoplasma pneumoniae* infections. Current Opinion in Infectious Diseases, 14 : 181-186, 2001.
- 15) Bebear, C., Dupon, M., Renaudin, H. et al. : Potential improvements in therapeutic opinions for mycoplasmal respiratory infections. Clin. Infect. Dis., 17 (Suppl. 1) : S202-207, 1993.
- 16) Sakoulas, G. : Brainstem and striatal encephalitis complicating *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia ; possible benefit of intravenous immunoglobulin. Pediatr. Infect. Dis. J., 20 : 543-545, 2001.

臨牀看護 5 月号

特集●新人ナースマニュアルⅡ

【初めての夜勤に必要な知識と技術】

発熱の知識と技術●中富美香(独立行政法人国立病院機構別府医療センター看護部)，他
痙攣の知識と技術●大関廣子(東京警察病院看護部)，他
意識障害の知識と技術●遠山圭子(東京慈恵会医科大学附属病院看護部)，他
呼吸停止の知識と技術●仙石永久(岐阜市民病院看護部)，他
心停止の知識と技術●久保さと子(慶応義塾大学病院看護部)
心原性ショックの知識と技術●重田奈美(呉共済病院看護部)
感染性ショックの知識と技術●倉本昭子(独立行政法人国立病院機構長崎医療センター看護部)，他
出血性ショックの知識と技術●坂本ゆり(国立大学法人愛媛大学医学部附属病院看護部)
急性胸痛の知識と技術●西川友香理(昭和大学病院看護部)，他
呼吸困難の知識と技術●松森智香(済生会熊本病院看護部)，他
急性腹症の知識と技術●三橋恭子(日本医科大学付属病院看護部)
急性頭痛の知識と技術●鈴木美香(埼玉医科大学総合医療センター看護部)，他
心電図の基礎知識●山見千晶(高松赤十字病院看護部)，他

Original Article

Reactivity of Genotypically Distinct Hepatitis B Virus Surface Antigens in 10 Commercial Diagnostic Kits Available in Japan

Toshiaki Mizuochi*, Yoshiaki Okada, Kiyoko Umemori,
Saeo Mizusawa, Shinichiro Sato¹ and Kazunari Yamaguchi

*Department of Research on Blood and Biological Products,
National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 208-0011 and
¹Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo 063-0002, Japan*

(Received December 14, 2004. Accepted January 19, 2005)

SUMMARY: Hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) is one of the most important serological markers of current HBV infection. However, there are significant antigenic variations of HBsAg caused by genotypic diversity as well as mutation of the HBV genome. It is predictable that amino acid substitutions occurring in the HBsAg "a" determinant of a particular HBV genotype will affect the sensitivity of some diagnostic kits, since all the diagnostic kits currently available utilize monoclonal and/or polyclonal antibodies against the "a" determinant. One possible concern is that there may be a significant variation in the sensitivity of HBsAg diagnostic kits to HBsAg encoded by HBV of different genotypes, which might result in a failure to detect HBsAg of a particular HBV genotype. In this study, we assessed the reactivity of HBsAg specimens derived from three different HBV genotypes (A, B, and C) that are prevalent in Japan by 10 commercially available EIA (enzyme immunoassay), CLIA (chemiluminescent immunoassay), and CLEIA (chemiluminescent enzyme immunoassay) diagnostic kits. Specimens included both clinical samples and recombinant HBsAg. Our results showed that all the diagnostic kits evaluated were able to detect HBsAg irrespective of HBV genotypes. At the same time, it is apparent that some, but not all of the kits showed clear differences in sensitivity to the three HBV genotypes.

INTRODUCTION

Antigenic variation of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) "a" determinant should be taken into consideration when a diagnostic kit with high specificity/sensitivity is designed. Since all the diagnostic kits for detection of HBsAg utilize an antibody against the major epitope, i.e., the "a" determinant, amino acid substitution in this region would be accountable for diagnostic failures. There are three major causes of variations in HBsAg: differences in subtype, differences in genotype, and mutations. HBsAg is classified into four major serological subtypes, i.e., adr, adw, ayr, and ayw (1,2). The diagnostic kits currently available are able to detect all of them with only a slight sensitivity variation. There is, however, a significant variation in the sensitivity of diagnostic kits for detection of naturally occurring or vaccine-inducing mutants mainly in the "a" determinant region (3). Therefore, when designing diagnostic kits, if we employ a monoclonal antibody (mAb) that recognizes amino acid residues but is subject to mutation, the result will be a failure to detect the mutant HBsAg. For performing sensitive and accurate blood donor screenings, we need a robust assay system that does not overlook any positive specimens. Since the incidence of HBV mutation in specimens from the general population is rather low, this may not be a major problem. In contrast, genotypic variation in HBV could become a serious problem if some diagnostic kits fail to detect HBsAg of particular genotypes.

Based on an intergroup divergence of 8% or more in the complete nucleotide sequence, HBV has been classified into eight genotypes, designated as A to H (4-7). The prevalence of specific genotypes varies geographically (8, 9). Genotypes B and C are prevalent in Japan, and only a small population contracts HBV of genotype A (9,10). Recently, however, there has been an increase in the number of acute hepatitis B patients infected with HBV of genotype A, especially in metropolitan areas in Japan (11). And there is an accumulating body of evidence that certain HBV genotypes correlate with the severity of liver disease (12-14) and with the susceptibility to anti-viral drugs (15-18). It is thus important to detect HBsAg derived from various HBV genotypes without a sensitivity divergence. To date, there has been no published study examining whether or not commercially available HBsAg diagnostic kits are able to detect genotypically distinct HBsAg - e.g., HBsAg derived from HBV genotypes A, B, and C - with equal efficacy. The lack of such information threatens to undermine our confidence in the reliability of these diagnostic kits. Accordingly, the objective of the present study was to compare the sensitivity of 10 diagnostic kits available in Japan to serum/plasma samples containing HBsAg as well as recombinant HBsAg derived from HBV of genotypes A, B, and C. None of the diagnostic kits examined here failed to detect HBsAg of genotypes A, B, and C at a concentration of 0.2 IU (international units)/ml. There were, however, obvious differences in the sensitivity to various HBV genotypes in some kits. Possible explanations for the reactivity differences found in genotypically distinct HBsAg in some diagnostic kits will be discussed.

MATERIALS AND METHODS

Specimens: Serum samples from HBsAg-positive blood

*Corresponding author: Mailing address: Department of Research on Blood and Biological Products, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama-shi, Tokyo 208-0011, Japan. Tel: +81-42-561-0771 ext 335, Fax: +81-42-562-7892, E-mail: miz@nih.go.jp

donors were kindly provided by Hokkaido Red Cross Blood Center. They were genotyped by direct sequencing and found to be of either genotype B or C. Genotype A HBsAg-positive plasma samples were obtained from International Reagents Corporation (Kobe, Japan). Recombinant HBsAg of genotypes A, B, and C were obtained from culture supernatants of genotype-defined HBV gene-transfected HuH-7 cells. In brief, extracted HBV-DNA from HBsAg-positive plasma was amplified by using a TaKaRa LA PCR™ Kit (ver.2.1; TaKaRa, Tokyo, Japan) with sense primer **GGCTCTTCTTTTCA** CCTCTGCCTAATCA (1821-1841) and antisense primer **GGCTCTTCAAAAAGTTGCATGGTGCTGG** (1825-1806), both of which were modified by Günther et al. (19). Sap1 sites sequences (bold letters) were added to remove HBV DNA from vector. The amplified HBV full genomes were cloned using a TOPO XL-PCR cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) and their genotypes were determined by sequencing. The plasmids containing HBV full genomes were transfected into HuH-7 by lipofectin reagent (Invitrogen). Culture supernatants were harvested after 2 days and stored at -20°C until use.

Diagnostic kits for HBsAg: The 10 diagnostic kits utilized in this study are listed in Table 1. Tests were performed according to the manufacturer's instruction.

Statistical analysis: Statistical analyses were carried out using Student's *t* test.

RESULTS

The HBsAg concentration of each specimen was first determined by utilizing ARCHITECT HBsAg QT (Abbott Japan Co., Ltd., Chiba, Japan), which is the only quantitative assay kit approved in Japan, and expressed in IU/ml. The concentration of each specimen was adjusted to 10 IU/ml with a multi-marker negative matrix (Accurun 810; BBI Co., Ltd., Boston, Mass., USA). Specimens were then diluted to make test samples of three different concentrations, i.e., 0.04, 0.2, and 1.0 IU/ml. These test samples derived from various HBV genotypes were then analyzed with 10 diagnostic kits, including ARCHITECT HBsAg QT, as shown in Table 1. In the preliminary experiments, each specimen was analyzed by 10 different diagnostic kits and the reactivity, which was expressed as IU/ml, COI (cut off index), or other measures depending on the kit utilized, was plotted along with the arbitrary HBsAg concentration pre-determined by ARCHITECT HBsAg QT. The measures were intentionally omitted

from the y-axes of Fig. 1 so that the kits could not be identified. Each curve showed a good linearity, at least in the range from 0.04 IU/ml to 1.0 IU/ml of HBsAg (data not shown). Therefore, values corresponding to the concentration of 0.2 IU/ml HBsAg were chosen and plotted for each genotype as shown in Fig. 1. It was concluded that all the HBsAg samples, irrespective of their genotypes, tested positive in every assay kit, at least at the concentration of 0.2 IU/ml. There were, however, considerable differences in the sensitivity to HBsAg of various HBV genotypes in some assay kits. For example, in kit no. 7, sensitivity to genotype B was significantly lower than those to genotypes A and C. Figure 2 summarizes the difference in sensitivity to various genotypes in each assay kit. Assay kits no. 1 to 4 and 8 to 10 showed a marginal variability in sensitivity to the HBsAg of the three different genotypes as the ratio against genotype A was close to 1.0 in each of these kits. In contrast, assay kits no. 5 to 7 showed a considerable variability in sensitivity to each genotype.

DISCUSSION

In the present study, 10 highly sensitive diagnostic kits (EIA [enzyme immunoassay], CLIA [chemiluminescent immunoassay], and CLEIA [chemiluminescent enzyme immunoassay] kits) currently available in Japan were examined for their sensitivity to HBsAg encoded by HBV of three distinct genotypes, A, B, and C. It was concluded that all the kits examined were able to detect HBsAg of all the genotypes at the concentration of 0.2 IU/ml. This is a sufficient level of sensitivity according to the "Guidance for Industry" issued by the FDA (20) or the "CTS" (Common Technical Specification) defined by the EU (21). Our results thus validated the sensitivity of all the diagnostic kits to HBsAg of genotypes A, B, and C, which are dominant in Japan. However, it was concurrently demonstrated that some diagnostic kits showed a substantial difference in sensitivity to the three genotypes (Figs. 1 and 2, kit no. 5, 6, and 7). This apparent sensitivity difference may stem from the antibodies employed in the "capture" or "detection" phase in the diagnostic kits. As shown in Table 1, kits no. 1 to 4 employed a mAb for the "capture" phase and a polyclonal antibody (pAb) for the "detection" phase. These four kits showed little or no sensitivity differences to the three genotypes (Figs. 1 and 2). A similar result was obtained for kit no. 8, which employed a pAb for "capture" and a mAb for "detection". In the case of kit no. 7, however, there was a noticeable difference in sensitivity to the three genotypes. As shown in Table 1, kit no. 7 employed a mAb for both "capture" and "detection". Both of these mAbs may have had a poor affinity to the amino acid residues unique to genotype B. On the other hand, kits no. 5, 6, and 7 had a higher sensitivity to genotype C than to the other genotypes (Figs. 1 and 2), probably because the antibodies employed in these kits have a high affinity to the amino acid residues unique to genotype C. Kits no. 9 and 10 showed only a slight difference in sensitivity to the three genotypes (Figs. 1 and 2), despite the fact that both kits employed a mAb for both the "capture" and "detection" phases. The manufacturer's unpublished information revealed that they employed two mAbs with different epitope specificities. One of the mAbs recognizes the "loop 1" region (a.a. 124-137) of the "a" determinant, whereas the other recognizes the "loop 2" region (a.a. 139-147). Since the "loop 1" region is assumed to be more conserved among various genotypes than the

Table 1. HBsAg diagnostic kits used in this study

No.	Method	Antibody (capture/detection)
1	CLIA	monoclonal/polyclonal
2	EIA	monoclonal/polyclonal
3	CLIA	monoclonal/polyclonal
4	EIA	monoclonal/polyclonal
5	EIA	monoclonal/monoclonal($\times 2$) ¹⁾
6	CLEIA	polyclonal/monoclonal($\times 2$) ¹⁾
7	CLEIA	monoclonal/monoclonal($\times 2$) ¹⁾
8	CLEIA	polyclonal/monoclonal
9	CLIA	monoclonal/monoclonal
10	CLIA	monoclonal/monoclonal

CLIA: chemiluminescent immunoassay.

EIA: enzyme immunoassay.

CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay.

¹⁾($\times 2$): Two different monoclonal antibodies.

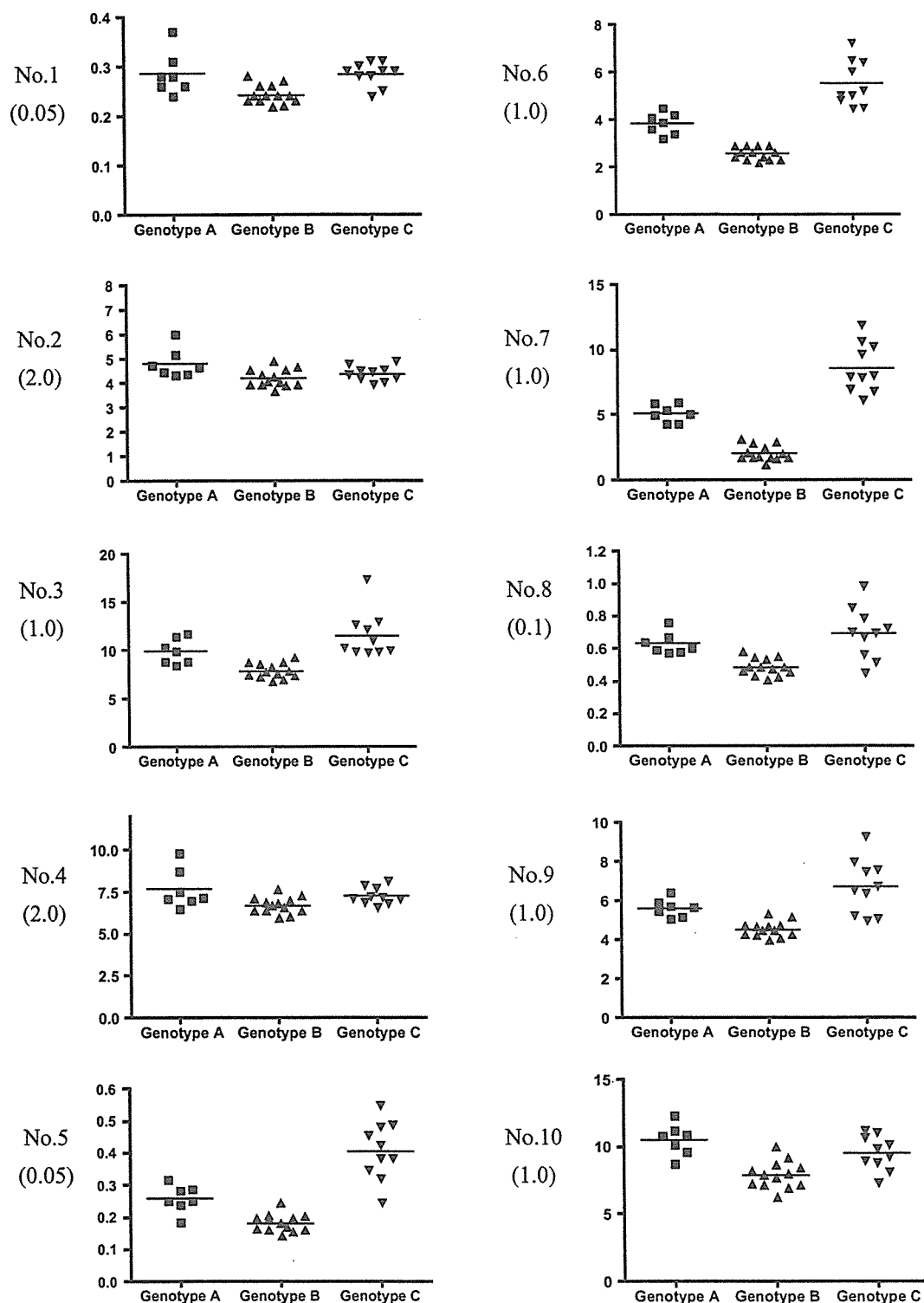


Fig. 1. HBV genotypic preferences of each test kit. Detection of HBsAg derived from HBV of genotypes A, B, and C. A total of 30 specimens containing HBsAg (0.2 IU/ml), including 7 samples of genotype A (■), 13 samples of genotype B (▲), and 10 samples of genotype C (▼), were assayed by utilizing 10 diagnostic kits listed in Table 1. Horizontal bars indicate the means of measured values. The number in the parenthesis is the cut-off value for each diagnostic kit to evaluate the reactivity of a specimen. Statistically significant ($P < 0.1$) differences in the mean measures between two genotypes were noticed in the following kits. No. 5: B vs. C. No. 6: A vs. B and B vs. C. No. 7: A vs. B, B vs. C, and C vs. A.

“loop 2” region, kits no. 9 and 10 were able to detect all the genotypically distinct HBsAg with only minimal divergence.

These results are reminiscent of the previously published studies that pointed out the failure of some diagnostic kits in detecting mutant HBsAg (3,22-25). In those studies, monoclonal-based assays often failed to detect mutant

HBsAg, such as the G145R mutation in the “a” determinant region. It was also suggested that mutations affecting immunoassay performance occurred mainly in the “loop 2” region (3).

In conclusion, all the diagnostic kits examined in this study were able to detect HBsAg regardless of their HBV

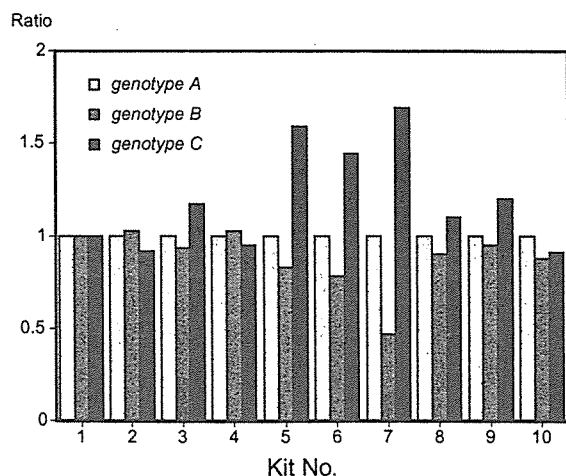


Fig. 2. Comparison among various HBsAg diagnostic kits. Variation in sensitivity of 10 diagnostic kits to HBsAg of genotypes A, B, and C. The mean value obtained by each diagnostic kit was divided by the corresponding value obtained by ARCHITECT HBsAg QT to normalize it. Then the calculated value for genotype B specimen was divided by the calculated value for genotype A to obtain the ratio of "genotype B vs. genotype A". In the same way, the ratio of "genotype C vs. genotype A" was calculated. For each diagnostic kit, therefore, the ratio for genotype A is always "1" and the ratios for genotypes B and C are expressed as the bar's height. Since we utilized ARCHITECT HBsAg QT as a tentative standard, the ratios of this kit are theoretically "1". If the ratio is close to "1", the variation in sensitivity to genotype B (or genotype C) would be minimum, whereas, if not, the variation would be substantial.

genotypes. In some kits, however, sensitivity was significantly diversified among the three HBV genotypes. When mAbs are utilized for both the "capture" and "detection" phases, it is recommended that at least one antibody recognizes an epitope that is conserved among HBV genotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the manufacturers who kindly supplied us with the HBsAg diagnostic kits and helped us in performing the assays.

REFERENCES

1. Le Bouvier, G. L. (1971): The heterogeneity of Australia antigen. *J. Infect. Dis.*, 123, 671-675.
2. Bancroft, W. H., Mundon, F. K. and Russel, P. K. (1972): Detection of additional antigenic determinants of hepatitis B antigen. *J. Immunol.*, 109, 842-848.
3. Coleman, P. F., Chen, Y.-C. J. and Mushahwar, I. K. (1999): Immunoassay Detection of hepatitis B surface antigen mutants. *J. Med. Virol.*, 59, 19-24.
4. Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y. and Mayumi, M. (1988): Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*, 69, 2575-2583.
5. Norder, H., Courouge, A. M. and Magnius, L. O. (1994): Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 198, 489-503.
6. Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F. and Rossau, R. (2000): A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.*, 81, 67-74.
7. Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H. and Magnius, L. O. (2002): Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J. Gen. Virol.*, 83, 2059-2073.
8. Magnius, L. O. and Norder, H. (1995): Subtypes, genotypes and molecular epidemiology of the hepatitis B virus as reflected by sequence variability of the S-gene. *Intervirology*, 38, 24-34.
9. Chu, C. J. and Lok, A. S. F. (2002): Clinical significance of hepatitis B virus genotypes. *Hepatology*, 35, 1274-1276.
10. Fung, S. K. and Lok, A. S. F. (2004): Hepatitis B virus genotypes: Do they play a role in the outcome of HBV infection? *Hepatology*, 40, 790-792.
11. Kobayashi, M., Arase, Y., Ikeda, K., Tsubota, A., Suzuki, Y., Hosaka, T., Saito, S., Kobayashi, M., Suzuki, F., Akuta, N., Someya, T., Matsuda, M., Sato, J. and Kumada, H. (2003): Clinical feature of hepatitis B virus genotype A in Japanese patients. *J. Gastroenterol.*, 38, 656-662.
12. Mayerat, C., Mantegani, A. and Frei, P. C. (1999): Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral. Hepat.*, 6, 299-304.
13. Kao, J. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2000): Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, 118, 554-559.
14. Orito, E. and Mizokami, M. (2003): Hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma in Japan. *Intervirology*, 46, 408-412.
15. Kao, J. H., Wu, N. H., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S. (2000): Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J. Hepatol.*, 33, 998-1002.
16. Wai, C. T., Chu, C. J., Hussain, M. and Lok, A. S. (2002): HBV genotype B is associated with better response to interferon therapy in HBeAg(+) chronic hepatitis than genotype C. *Hepatology*, 36, 1425-1430.
17. Kao, J. H., Liu, C. J. and Chen, D. S. (2002): Hepatitis B viral genotypes and lamivudine resistance. *J. Hepatol.*, 36, 303-304.
18. Zollner, B., Petersen, J., Puchhammer-Stockl, E., Kletzmayer, J., Sternecker, M., Fischer, L., Schroeter, R. and Feucht, H. H. (2004): Viral features of lamivudine resistant hepatitis B genotypes A and D. *Hepatology*, 39, 42-50.
19. Günther, S., Li, B.-C., Miska, S., Kruger, D. H., Meisel, H. and Will, H. (1995): A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J. Virol.*, 69, 5437-5444.
20. Food and Drug Administration, U. S. (2004): Guidance for Industry. A modified lot-release specification for hepatitis B surface antigen (HBsAg) assays used to test blood, blood components, and source plasma donations. April 2004.
21. European Union (1998): Common Technical Specifications (CTS) for products defined in Annex II, List A of Directive 98/79/EC: CTS for the manufacturer's release testing of reagents and reagent products for the detection, confirmation and quantification in human specimens of markers of HIV infection (HIV 1 and 2), HTLV I and II, and hepatitis B, C, D (Immunological assays only).

22. Ireland, J. H., O'Donnell, B., Basuni, A. A., Kean, J. D., Wallace, L. A., Lau, G. K. K. and Carman, W. F. (2000): Reactivity of 13 in vitro expressed hepatitis B surface antigen variants in 7 commercial diagnostic assays. *Hepatology*, 31, 1176-1182.
23. Zaaijer, H. L., Vrieling, H. and Koot, M. (2001): Early detection of hepatitis B surface antigen and detection of HBsAg mutants: a comparison of five assays. *Vox Sang.*, 81, 219-221.
24. Levicnik-Stezinar, S. (2004): Hepatitis B surface antigen escape mutant in a first time blood donor potentially missed by a routine screening assay. *Clin. Lab.*, 50, 49-51.
25. Moerman, B., Moons, V., Somner, H., Schmitt, Y. and Stetter, M. (2004): Evaluation of sensitivity for wild type and mutant forms of hepatitis B surface antigen by four commercial HBsAg assays. *Clin. Lab.*, 50, 159-162.

資料

国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なる HBV genotype由来HBs抗原の検出

水落 利明 岡田 義昭 梅森 清子 水沢左衛子
佐藤進一郎 山口 一成

臨 床 検 査

第49巻 第9号 別刷

2005年9月15日 発行

医学書院

国内で販売されている10種類の高感度キットを用いた異なるHBV genotype由来HBs抗原の検出*

水落利明¹⁾/岡田義昭¹⁾/梅森清子¹⁾/水沢左衛子¹⁾/佐藤進一郎²⁾
山口一成¹⁾

【SUMMARY】 国内で販売されている10種類の高感度HBs抗原検出キットを用いて、HBV(B型肝炎ウイルス)genotype A, B, C由来のHBs抗原(HBVウイルス外被抗原)の検出を行った。すべてのキットにおいて、genotypeの違いにかかわらずHBs抗原(0.2 IU/ml)は陽性と判定された。しかし、キットによってはgenotype間での検出感度に明らかな差が見られるものがあった。ミュータント(変異)HBs抗原検出における問題点と比較してその原因を考察した。

【KEYWORDS】 HBV, genotype, HBs抗原検出キット

■ 緒言

HBs抗原の血清学的検出は、HBV感染の簡便、迅速かつ重要な指標である。このHBs抗原をコードするHBVには、その遺伝子配列から、現在までに8種類の遺伝子型(genotype)が存在することが報告されている¹⁾。そしてこのようなgenotypeの違いにより肝炎病態、および抗ウイルス薬剤への反応性が異なる可能性が指摘されている^{2,3)}。現在日本国内で検出されるHBVのgenotypeは、Cが約70%、Bが約30%であり、ほとんどがこれら両者に由来しているが、頻度は低いながらgenotype AのHBVも検出される。本来このgenotype Aは、アフリカ、北米、南米、ヨーロッパ諸国に多くみられる遺伝子型であるが、近年このgenotype AのHBV感染が、特に都市部の急性肝炎患者で増加傾向にある⁴⁾。

表1 各HBs抗原検出キットにおける測定法と抗体の由来。各キットの原理/方法、および使用抗体

No.	Method	Antibody (capture/detection)
1	CLIA	monoclonal/polyclonal
2	EIA	monoclonal/polyclonal
3	CLIA	monoclonal/polyclonal
4	EIA	monoclonal/polyclonal
5	EIA	monoclonal/monoclonal(×2)*
6	CLEIA	polyclonal/monoclonal(×2)*
7	CLEIA	monoclonal/monoclonal(×2)*
8	EIA	polyclonal/monoclonal
9	CLIA	monoclonal/monoclonal
10	CLIA	monoclonal/monoclonal

CLIA: chemiluminescent immunoassay (蛍光免疫法)

EIA: enzyme immunoassay (酵素免疫法)

CLEIA: chemiluminescent enzyme immunoassay (蛍光酵素免疫法)

* (×2): 異なる2種類のモノクローナル抗体を使用

現在日本国内で販売されているHBs抗原検出キットは30種類を越えるが、これまでHBV genotypeの異なるHBs抗原の反応性を、これら種々のキットで検討した報告はなく、特にgenotype AのHBVによりコードされるHBs抗原の反応性についての知見が求められている。今回、国内で販売されている10種類の高感度(EIA, CLIA, CLEIA)HBs抗原検出キットを用い、genotype A, B, Cの各検体(recombinant抗原を含む)の測定を試みたのでその結果を報告する。

* Reactivity of Genotypically Distinct Hepatitis B Virus Surface Antigens in 10 Commercial Diagnostic Kits Available in Japan

1) MIZUOCHI Toshiaki, OKADA Yoshiaki, UMEMORI Kiyoko, MIZUSAWA Saeko, YAMAGUCHI Kazunari: Department of Research on Blood and Biological Products National Institute of Infectious Diseases, Tokyo 国立感染症研究所 血液・安全性研究部(〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1)

2) SATO Shinichiro: Hokkaido Red Cross Blood Center, Sapporo 北海道赤十字血液センター検査部

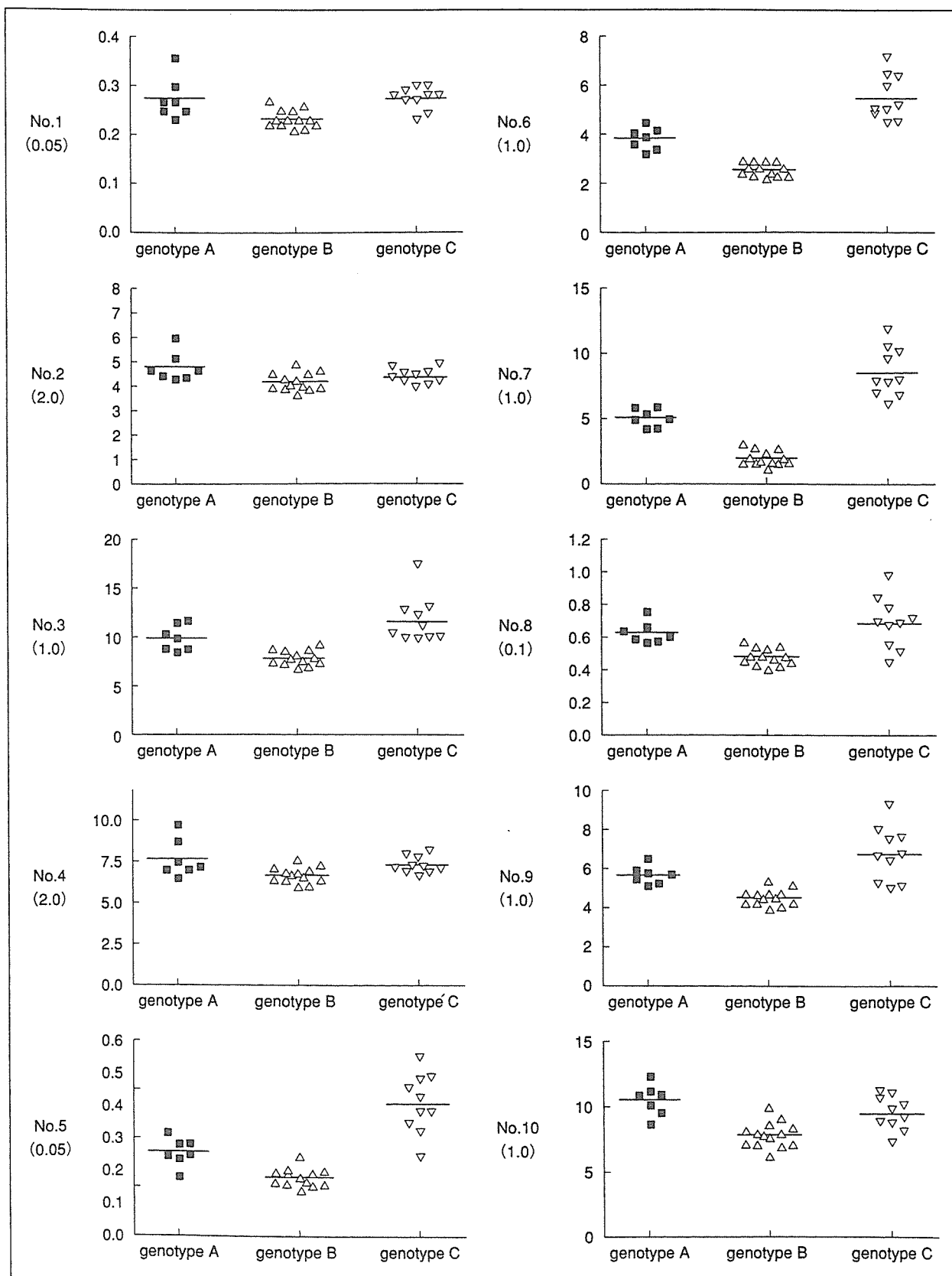


図1 各キットを用いた genotype 別 HBs 抗原量の測定結果

表1に示した10種類のキットを用いて0.2 IU/mlの濃度に調整した検体(genotype A:7検体, genotype B:13検体, genotype C:10検体)を測定した。図の中の直線は各測定値の平均値を示す。()内に示した数値は各キットにおいて、検体を陽性と判定するカットオフ値である。なお, genotype A, Bについて各1検体, genotype Cについては2検体の recombinant 抗原を測定したが, これらの検体がほかの native な検体に比較して, 特に異なった反応性を示すことはなかった。