

れる。特に PA 法は人工担体を用いるため、非特異的反応が少なく抗体のスクリーニングに適する。IgM, IgG 抗体を検出する。また、抗体のアビディティ(抗体結合力)に影響を受け、アビディティの上昇とともに抗体価が上昇する傾向がある。日本では麻疹の感染症流行予測調査では PA 法を用いている。

5. 酵素免疫測定法(enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA, enzyme immunoassay ; EIA)

マイクロプレートに固相化した抗原に、検体(血清)を反応させた後、2次抗体として酵素標識抗ヒト IgG 抗体を反応させる(間接法)、抗ヒト IgM 抗体を固相化し検体を反応させた後、抗原を反応させ、2次抗体として酵素標識された抗原に対する抗体を反応させる捕捉法などがある。酵素の基質を添加して吸光度で抗体量を測定する方法である。標識酵素としてペルオキシダーゼ(HRP)などを用いる。標準品を用いて検量線を作成し、抗体価を定量することができ、IgG, IgM 抗体を区別して測定することが可能である。高感度で特異性も高いが自己抗体などによる非特異的反応がみられることがある(図7)。

6. 間接蛍光抗体法(indirect fluorescent antibody technique ; IFA)

細胞組織、ウイルス感染細胞などをスライドガラス上に固定して、階段希釈した被検体を反応させ、次いで蛍光標識した抗ヒト抗体を反応させる。検体中に抗原と結合する抗体が存在すれば、蛍光顕微鏡下で蛍光を発色する。蛍光標識抗ヒト抗体を換えることで抗体をクラス別(IgG, IgM, IgA)に検出することが可能である。蛍光が観察される検体の希釈倍率によって抗体価を表す。一方、観察者の主観が入りやすく、検査の品質を均一化することは困難であるという欠点がある。一般に感度は高い。また、非特異的反応や誤差を生じやすい。



感染症の診断における 抗体測定の問題点 —麻疹における経験から

麻疹は WHO が排除(できれば根絶)を目指し

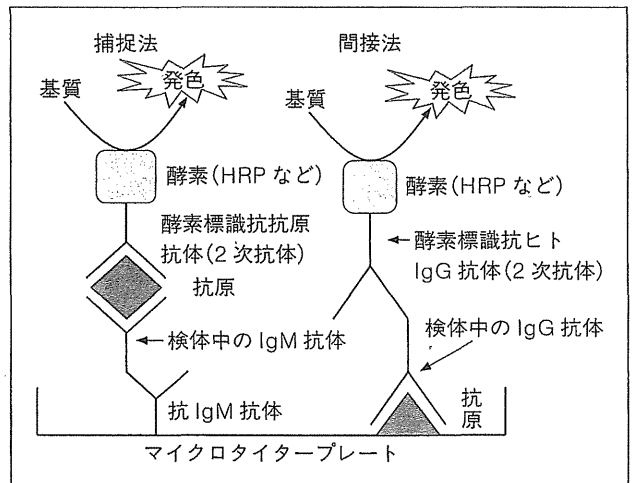


図7 ELISA 法の測定原理

ているウイルス性感染症で、日本では 2012 年までの排除を目標としている(本誌「麻疹風疹実験室ネットワーク」1322 頁参照)。WHO は排除の認定に検査診断に基づいた全数報告のサーベイランス体制の基で、年間、人口 100 万人当たり 1 人以下の患者発生率であることを求めている。日本では急性期の感度の高さから RT-PCR 法によるウイルスゲノム検出による診断を勧めているが、実際は民間の検査施設に依頼される血清学的診断による報告例も多い。

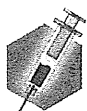
現在、民間の検査施設で行われている麻疹抗体測定法は HI 法, NT 法, PA 法, ならびに IgG-ELISA 法, IgM-ELISA 法と多様である。かつては保険点数が低いことから CF 法も行われていたが、感度、特異性がほかの方法と比較して劣ること、短い期間で抗体が消失するなどから現在では対応していない。

麻疹の血清学的診断は、その迅速性を考慮して IgM-ELISA 法による急性期血清の IgM 抗体価を測定することが多い。しかし IgM 抗体は、患者が来院し検体を採取できる可能性が高い発疹出現後 3 日目ごろまでには十分に上昇していない可能性があることを考慮すべきである。逆に麻疹 IgM 抗体は、類似のウイルス性の発疹性感染症である伝染性紅斑の病原ウイルスであるパルボ B 19 ウイルスや突発性発疹のヒトヘルペスウイルス-6 型などの感染による IgM 抗体と免疫学的に交差することが知られており、IgM 抗体価 0.8 ~ 5.0 程度の判定保留域、あるいは低陽性値の場合、再度回復期の血清を採取し、急性期血清とと

もにIgG抗体価(あるいはIgM抗体価)を測定し、抗体価の有意な上昇を確認することがより確実な診断のために望まれる。その際、これら血清学的な測定法による抗体価は、絶対値として捉えられるほど安定していないので急性期、回復期の血清を同時に測定し、比較することが重要である。また、修飾麻疹や麻疹の再感染ではIgG抗体、IgM抗体の動態が初感染時の反応とは異なることが明らかになってきた。検査診断の結果だけから診断するのではなく、臨床症状、疫学情報、病歴、ワクチン接種歴などとともに総合的に考察し、診断する必要がある。

現在の麻疹IgM検査は、スクリーニング的な意味でも使用されており、患者数の減少が検査数の減少につながる可能性が考えられる。検査数が同等数で患者数が減少した場合、測定法の感度、特異性の割合は一定であることから、非特異的に陽性となる偽陽性の割合が増加していくことが知られている。麻疹の排除の最終段階では患者数が少なくなることから、偽陽性が増加すると予想され、これらを鑑別できるような検査法も考慮しなければならない。

また、海外で用いられるELISAキットの抗体価表示は、WHOで値付けされた国際標準品に基づいた国際単位(international unit; IU)である。一方、日本で使用されているIgG-ELISAキットは主に国内の製造所のものであるが、EIA価と呼ばれる独特の単位を用いている。EIA価から国際単位への換算法がまだ明確にされてなく、海外データとの比較が困難なのが現状である。国際協調(ハーモナイゼーション)の観点からも改良が望まれている。また、診断によく使用されるHI法は、麻疹の場合、サルの赤血球を用いることから近年は入手が困難になっている。また、動物愛護の観点からも今後は使用できなくなる可能性も考えられ、ほかの方法への転換を考える必要がある。



おわりに

抗体測定を主とする血清学的検査法は免疫状態

の把握や診断に重要な役割を担ってきた。しかし、麻疹のような古典的な感染症ですら、終生免疫や不顕性感染がないという考えが否定されてきたのはごく最近のことであり、病気の実態は今後も徐々に解明されていくだろう。それとともに抗体検査の結果にも新しい解釈を加えていく必要がある。血清学的検査は絶対的な診断法や測定法ではないことを常に念頭に置き、適切な時期に採取した検体を目的に則した検査法で測定し、結果を考察したうえで利用することが重要である。

文献

- 1) 国立予防衛生研究所学会(編): ウイルス実験学 総論 改訂第2版. 丸善, pp 214-324, 1964
- 2) 多田富雄(監訳): 免疫学イラストレテッド. 南江堂, pp 9-119, 1986
- 3) 大里外誉郎(編): 医科ウイルス学 改訂第2版. 南江堂, pp 211-222, 2000
- 4) 国立感染症研究所 HP: 感染症流行予測調査, ポリオ抗体保有状況
<http://idsc.nih.go.jp/yosoku/Polio/Serum-P2009.html> (2010年6月21日現在)

Summary

Significance and limit of antibody test for viral diseases

Katsuhiro Komase¹⁾

Antibodies, which are produced from B cells, contribute to humeral immunity, widely. Antibody check and measurement of antibody titer are used for investigation of immunological status of person or a group, diagnosis for infectious diseases as well as surrogate maker at clinical trial for vaccine development, and provide important information against infectious diseases. But the results obtain from the antibody test of various methods are sometimes diverse and happens to lead to wrong diagnosis. In this article, I give an outline about significance and problem of antibody check against viral infectious diseases.

[Rinsho Kensa 54: 1230-1238, 2010]

- 1) Department of Virology III, National Institute of Infectious Disease, Gakuen 4-7-1, Masahi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

日本の麻疹・風疹の現状と問題点

Current status and problem of measles & rubella in Japan

特集

駒瀬 勝啓
KOMASE Katsuhiko

感染症制御のための公衆衛生の役割 | Key words 麻疹 風疹 麻疹排除計画

麻疹は高い病原性・致死率を示し、また風疹は胎児に障害を残す先天性風疹症候群 (congenital rubella syndrome : CRS) をもたらすことから、現在でも公衆衛生上重要な感染症である。一方、麻疹、風疹には、有効性、安全性が高いワクチンがあることからワクチンで予防可能な疾患とされている。世界保健機関 (WHO) では、天然痘、ポリオについて麻疹排除を目指し具体的な目標達成年を掲げて推進している。また麻疹に次いで風疹、CRS の排除も視野にいられている。日本では以前から予防医学としてのワクチンの有用性への認識が不十分で、麻疹、風疹への対応も遅れていた。しかし2012年の麻疹排除をめざして、2006年からMRワクチン2回接種制を導入し、2007年に「麻疹に関する特定感染症予防指針」を告示し、やっと麻疹対策に重い腰をあげつつある。本稿では麻疹・風疹の現状と問題点について述べる。

麻疹, 風疹

麻疹、風疹はともに発熱、発疹を主症状とする急性のウイルス性疾患である。麻疹ウイルスは空気感染、飛沫感染、接触感染等により伝搬し、基本再生産数 (1人の感染者が治癒するまでの間に2次感染させる人数) は12~18と高く、最も感染力の強いウイルスの一つである。不顕性感染はほとんどない。集団内での流行を防ぐために必要な集団免疫率は83~95%といわれている。現在、麻疹の死亡率は先進国では0.1%程度まで低下しているが、開発途上国では近年でも5~10%に至る

ことがある¹⁾。2007年において全世界の麻疹による死亡者数は約20万人と推計されている²⁾。風疹ウイルスは主に飛沫感染し、基本再生産数は5~7、集団免疫率は80~85%といわれている。15~30%が不顕性感染である。一方、妊娠初期の女性が風疹ウイルスに感染すると、心疾患、難聴、白内障などのCRSを胎児にもたらすことがある。風疹制御の目的はCRSを防ぐことにある。麻疹ウイルス、風疹ウイルスともにヒトのみが自然宿主である。また、それぞれ血清学的には単一なウイルスと考えられており、1960~70年代に開発されたワクチンは現在流行している麻疹ウイルス、風疹ウイルスにも有効である。

国立感染症研究所 (東京都) ウイルス第3部第1室 室長

表1 ワクチン接種キャンペーン

Campaign	方法/目的	対象
Catch up	Initial mass vaccination (徹底した初回接種)	9ヵ月～14歳のすべての子供
Keep up	Routine vaccination (高い接種率の維持)	12ヵ月のすべての子供
Follow up	Periodic mass vaccination (周期的な再接種：未接種、PVF への対応)	1～4歳のすべての子供(4年毎)

PVF：Primary vaccine failure

麻疹排除計画，風疹/CRS 排除計画

1960年代に有効性，安全性に優れた高度弱毒生麻疹ワクチンが開発されたことから，WHOは1974年に結核，ポリオ，百日咳，ジフテリア，破傷風とともに麻疹をEPI(Expanded Programme on Immunization)の対象疾患とし，地球規模で麻疹ワクチン接種を推進してきた。その結果，1980年代は20～40%であった世界のワクチン接種率は，2000年には約70%，2007年には約82%に達し，それに伴い2000年には約77.7万人と推定されていた麻疹による死亡者数も2007年には約19.7万人まで減少してきている²⁾。その間，1994年にWHO南北アメリカ大陸地域(PAH)では麻疹排除の目標年を2000年と定め，2002年に麻疹排除を達成している。この時実施されたワクチン接種戦略，すなわちCatch-up, Follow-up, Keep-upキャンペーンがその後の麻疹排除の基本的な戦略となっている(表1)³⁾。日本が所属するWHO西太平洋地域(WPR)でも2005年に排除達成目標年を2012年と定め，韓国では2006年に排除を達成し，オーストラリアもそれに近い状況である⁴⁾。

一方，先進国を中心に麻疹ワクチンのかわりに麻疹・風疹・おたふく風邪混合(MMR)ワクチン，あるいは麻疹・風疹混合(MR)ワクチンが使用されていることから，PAH, WHOヨーロッパ地域(EUR)では，2010年までに風疹，CRSの排除も目指している⁵⁾⁶⁾。しかし，まだ多くの国では風疹ワクチンが定期接種化されておらず，他の地域では風疹，CRS排除の具体的な目標年を設置していない。

WHOの麻疹排除の定義

WHOは麻疹排除の定義を状況に応じて変更を加えているが，現在は「適切なサーベイランスの基で，常在するウイルスによる麻疹症例が12ヵ月間以上ないこと」としている。この状態の判定基準として，①年間の麻疹発生率が人口100万人あたり1人未満であること，②流行があってもそれが海外から持ち込まれた麻疹ウイルスが原因であること，③その流行の80%以上が10人未満の小規模であること，④(このような状況を維持できるように)2回の麻疹を含むワクチンの接種率がともに95%以上であること，をあげている。

また，適切なサーベイランスとして，①検査診断に基づいた全数報告制，②WHOによって認定された組織(National laboratory：国立感染症研究所)による検査診断体制，③WHOの指定するindicator(指標)を満たす診断体制⁷⁾，をあげている。

日本の対応

1966年に麻疹ワクチンが，1978年に風疹ワクチンが導入されて以来，接種率が50～60%の時期が長かったにもかかわらず，麻疹，風疹の発生数，死亡数は，確実に減少してきた。2001年に患者数20～30万人と推定される麻疹の流行が起こったことをきっかけに，麻疹ワクチン接種キャンペーンが各地で実施され，接種率は80～90%近くになった。2006年にはMRワクチンでの2回接種が導入された。欧米で1990年代から実施されWHOでも標準接種法とされていた2回接種がやっと導入さ

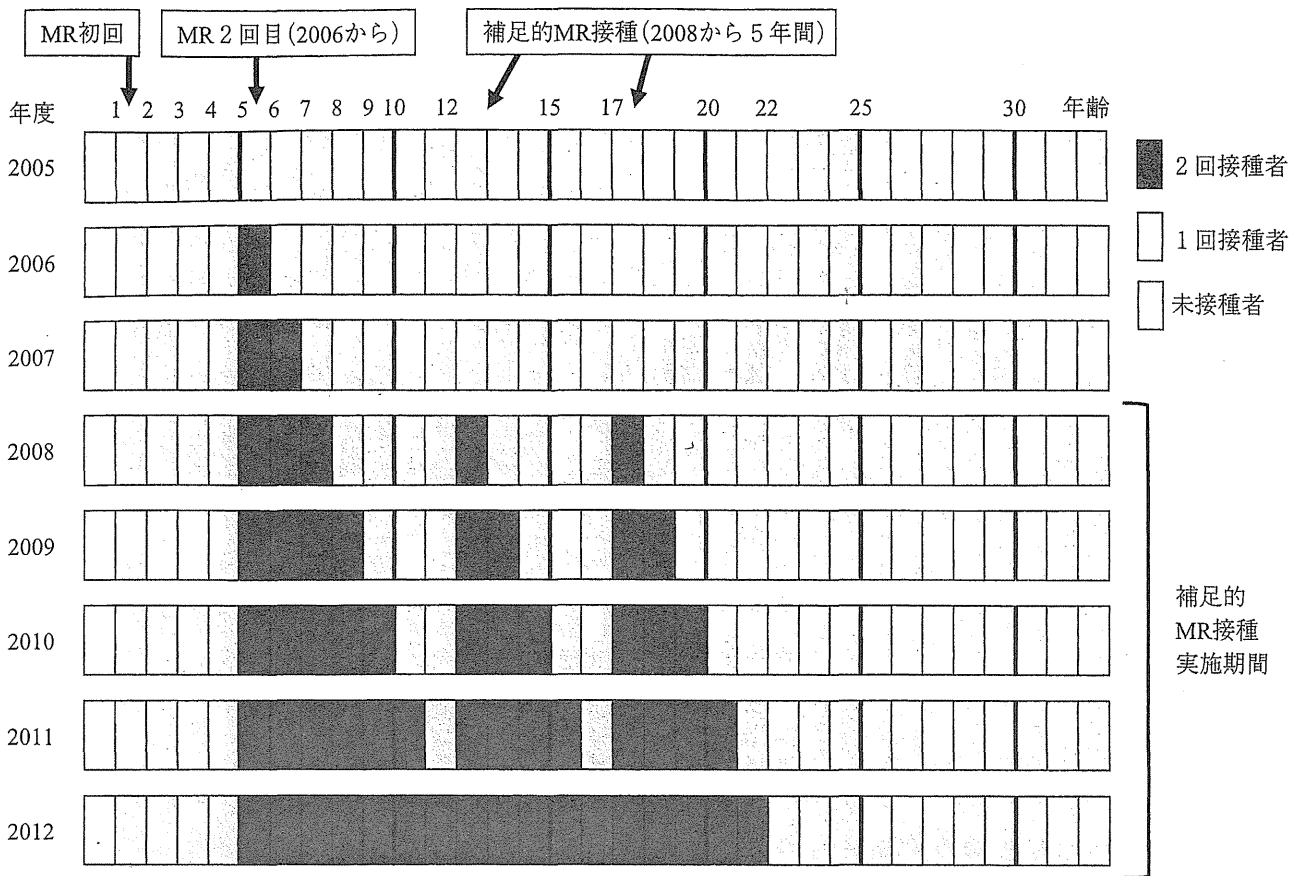


図1 MR ワクチン接種スケジュールと接種機会

れたわけである。WPR が2012年を麻疹排除目標年と設定したのも大きく作用した。2007年になり成人を中心とした麻疹が流行し、中学、高校、大学等で学校閉鎖、入試の中止などが広がり社会問題となった。

厚生労働省は2007年12月に「麻しんに関する特定感染症予防指針」を告示し、平成24年度までに麻疹の排除を達成し、その後も麻しんの排除の状態を維持することを目標とし6つの方針が示された。とくに重要なのが補足的予防接種の導入と全数報告性への変更である。成人麻疹の対策として10代の麻疹、風疹の抗体保有率が低い年齢層へ免疫を強化する目的で、2008年から5年間の時限つきで13歳(中学1年生相当)ならびに18歳(高校3年生相当)にMR ワクチンによる補足的予防接種を導入した(3期、4期)。これにより2012年までに6～22歳はMR ワクチンの接種機会を2回持つことになる(図1)。また、従来のサーベイランス体制を強化する目的で、定点報告であった麻疹、

風疹をともに全数報告に変更し、麻疹患者数が減少した時点では検査診断を必須とした。

最近の麻疹発生動向とワクチン接種率

2007年、2008年に成人を中心に麻疹の流行があった。2008年は全数報告制に移行したことから、初めて実際の麻疹、風疹の感染者数が把握された。麻疹患者は約11,000人と2001年の推定患者数と比較して1/20～1/30の規模である(図2)⁸⁾。2009年の患者数はさらに減少し、11月現在、患者数は約700人である。しかし2009年においても人口百万人あたり約5.4人の患者数であり、WHOの麻疹排除の判定基準に適合するためには、さらに1/5以下にする必要がある。一方、2008年のワクチンの接種率は、1歳を対象とした第1期、94.3%、小学校入学前の2期が91.9%、中学1年生相当の3期が85.2%、高校3年生相当の4期が77.3%

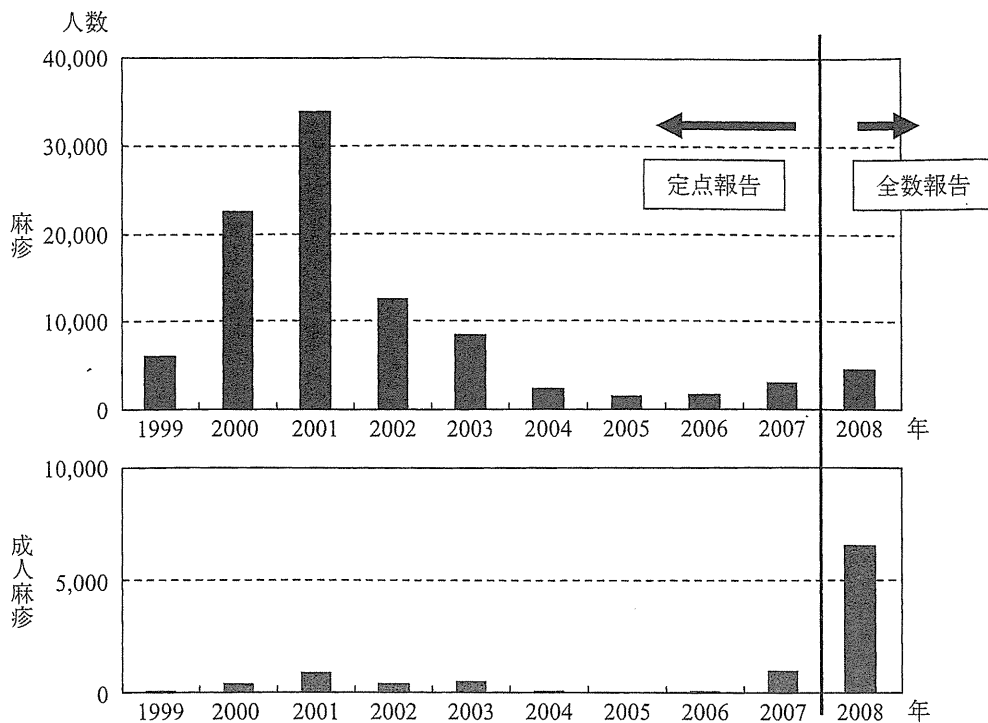


図2 麻疹報告者数の推移(国立感染症研究所感染症情報センター 発生動向調査週報より作製)

であり、95%はまだ遠い数字である⁹⁾。とくに3期、4期は自我の芽生えた中・高校生が対象だけに、当初から接種率の低迷が懸念されていた。

高い接種率を実現した地区では、学校と連携し、学校からの生徒への度重なる呼びかけや接種の確認、集団接種する環境を整える等を実施していた。保健所、医師会だけでなく、教育委員会や学校との連携がワクチン接種率向上に必要であろう。

全数報告制と検査診断体制

2008年の麻疹報告のうち約60%が、2009年のうち約40%が臨床診断のみの報告である。「麻しんに関する特定感染症予防指針」では症例数が減少傾向の時には検査診断は必須とあり、全例検査診断するよう周知する必要がある。また、現在、検査の主体が検査センターによるIgM測定である。IgM測定は、WHOも標準検査法としているが、発症初期の検出感度がやや低く、麻疹感染者を早期に正確に確認し、迅速に感染者を隔離し、接触者へ適切に対応するという点では次善の方法である。また、しばしば類似の発疹発熱性疾患である

突発性発疹や伝染性紅斑の原因ウイルスに対するIgM抗体と交差反応する欠点がある。

一方、現在、感染研、地衛研、保健所を結んだ麻疹検査診断ネットワークが構築され、ウイルスゲノム検出法による診断を実施する体制ができている(図3)¹⁰⁾。麻疹排除の最終段階においては、ウイルスの由来を検証する必要があり、ウイルスの遺伝子型の情報は重要となること、さらにNational Laboratoryである感染研が精度管理に加わっていることから、WHOの要件も満たしていることから、麻疹検査診断ネットワークによる麻疹検査診断体制を麻疹サーベイランスの中心とする必要がある。その際、医療機関と地衛研を結ぶ保健所の活動がますます期待される。

風 疹

2000年以前は4、5年毎に流行を繰り返してきたが、2000年以降は大きな流行はない。しかし、2004年に地域的な小さな流行があり、その前後で10名以上のCRSをもつ子供が生まれた。妊娠を考えている女性は、風疹の流行にかかわらず抗体

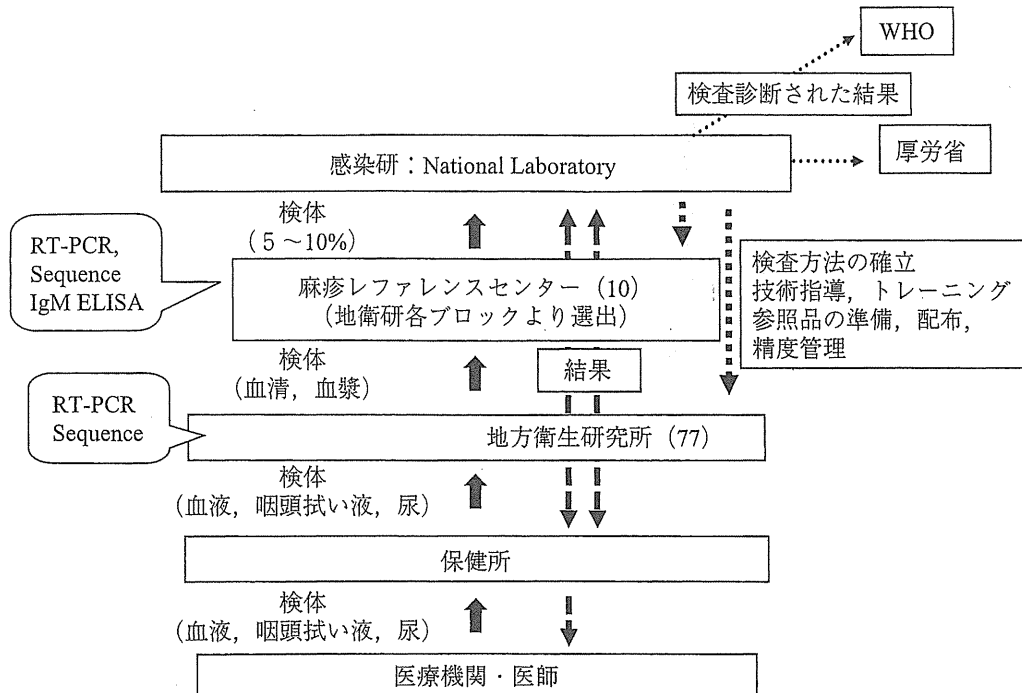


図3 麻疹検査診断ネットワーク(駒瀬ら IASR vol. 30 pp45-47, 2009より改変)

検査や風疹ワクチンの接種が勧められる。

おわりに

麻疹を排除するという目標達成には、当然ながら単に感染症を減少させる以上に多くのハードルを超えなければならない。海外ではCatch up等の大掛かりなキャンペーンや、小学校入学時にワクチン接種証明の提出を義務付ける等の方法を用いている。これらの方法は麻疹排除やその後の維持に有効であるが、日本では受け入れられにくい。公衆衛生に関わる人間だけでなく、社会全体が麻

疹排除、それに続く風疹排除を達成するという意識を共有することが重要であろう。2009年は成人への麻疹感染の比率が減り、従来のように1歳前後の乳幼児への感染の比率が増えている。ワクチン接種により集団免疫率をより高め、免疫のない乳幼児への麻疹暴露の機会を減少させ感染者数を減ずることが、麻疹排除達成への次の一歩となる。また、そのような状況になればMRワクチンを使用する日本では風疹の排除も目前となり、CRSの脅威も減ずる。人々の公衆衛生への意識が重要である。

文献

- 1) Grais RF, Dubray C, Gerstl S, et al : Unacceptably high mortality related to measles epidemics in Niger, Nigeria, and Chad. PLoS Med 4(1) : 0122-0129, 2007.
- 2) World Health Organization, Progress in global measles control and mortality reduction, 2000-2007, Wkly Epidemiol Rec 83(49) : 441-448, 2008.
- 3) de Quadros CA, Izurieta H, Venczel L, et al : Measles Eradication in the Americas : Progress to date, JID 189(suppl 1) : S227-S235, 2004.
- 4) Heywood AE, Gidding HF, Riddle MA, et al : Elimination of endemic measles transmission in Australia, Bull World Health Organ 87 : 64-71, 2009.
- 5) Meissner HC, Reef SE, Cochi S, Elimination of rubella from the United States ; a milestones on the road to global elimination, Pediatrics 117 : 9330935, 2006.
- 6) WHO regional office for Europe, Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection, WHO Europe region strategic plan 2005-2010.

- 7) World Health Organization, Western Pacific Regional Office, Monitoring Measles Surveillance and Progress Towards Measles Elimination, MEASLES BULLETIN 1 (Issue 13) Sept : 1-6, 2007.
- 8) 国立感染症研究所感染症情報センター：麻疹2008年，病原微生物検出情報(月報) IASR 30(2) : 29-30, 2009.
- 9) 国立感染症研究所感染症情報センター HP，麻疹予防接種情報
http://idsc.nih.go.jp/disease/measles/01.html.
- 10) 駒瀬勝啓，木村博一，長野秀樹ほか：麻疹検査診断体制ならびに検査診断法について，病原微生物検出情報(月報) IASR 30 : 45-47, 2009.

■総合臨牀・既刊特集一覧■

詳細はホームページ <http://www.nagaishoten.co.jp>でもご覧頂けます

2008年(平成20年)

1月号	ノーベル賞の医療への貢献	定価2,520円/〒148円	2月号	脳卒中一予防・治療の最前線	定価2,625円/〒148円
2月号	虚血性心疾患診療の新時代	定価2,520円/〒148円	3月号	スリープ・リテラシー向上のために	定価2,625円/〒148円
3月号	見落としがちな内分泌疾患	定価2,520円/〒148円	4月号	心不全2009	定価2,625円/〒148円
4月号	臨床血液学 -新たなエVIDENCEの実践に向けて	定価2,520円/〒148円	5月号	尿を科学する	定価2,625円/〒148円
5月号	特定健診・特定保健指導の実際	定価2,520円/〒148円	6月号	抗菌薬適正使用 -グローバルスタンダードを目指して	定価2,625円/〒148円
6月号	肝がん撲滅へ向けて	定価2,520円/〒148円	7月号	甲状腺疾患をマスターする	定価2,625円/〒148円
7月号	糖尿病診療に必要な検査ABC	定価2,520円/〒148円	8月号	貧血を診る	定価2,625円/〒148円
8月号	禁煙を科学する	定価2,520円/〒148円	9月号	消化管疾患-診断と治療の進歩	定価2,625円/〒148円
9月号	肺がん-がん津波への備え	定価2,520円/〒148円	10月号	咳嗽-そのcommonで多様な疾患領域	定価2,625円/〒148円
10月号	後期高齢者をどう診ていくか	定価2,520円/〒148円	11月号	肺高血圧症-基礎と臨床の最前線	定価2,625円/〒148円
11月号	変貌する感染症-人類の備えは十分か?	定価2,520円/〒148円	12月号	経口糖尿病治療薬のすべて	定価2,625円/〒148円
12月号	一般医に必要なリウマチ診療の知識	定価2,520円/〒148円			

2010年(平成22年)

2009年(平成21年)

1月号	Regenerative Medicine 期待される21世紀の新しい医療	定価2,625円/〒148円	1月号	高血圧診療- 新ガイドラインでどう変わる	定価2,625円/〒148円
			2月号	痛風・高尿酸血症をめぐって	定価2,625円/〒148円

2004年増刊	救急マニュアル2004	定価8,400円/〒450円	2007年増刊	DATAで読み解く内科疾患	定価8,400円/〒450円
2005年増刊	臨床医のための 超音波診断アトラス	定価8,400円/〒450円	2008年増刊	新版処方計画法	定価8,925円/〒450円
2006年増刊	日本のプライマリ・ケア よくある健康問題100	定価8,400円/〒450円	2009年増刊	今すぐに役立つ 輸液ガイドブック	定価8,610円/〒450円

定価は税込の価格です

抗原抗体反応

(抗原測定, 抗体測定)

KOMASE KATSUHIRO

駒瀬勝啓

◎国立感染症研究所ウイルス第三部

要旨 ウイルス感染症の診断やウイルスの研究には、ウイルスの同定や血清中の抗体価の測定が重要である。本稿では現在広く用いられている抗原抗体反応を利用したウイルス同定法、測定法を概説する。

はじめに

生体に抗原(微生物等)が侵入した時、生体内ではそれらを異物(非自己)として認識し排除するように働く。この排除のための一連の反応を免疫反応と呼ぶ。抗体は免疫反応の結果、Bリンパ球より産生される分子で、抗原に特異的に結合し排除にあたる。ここでいう「抗原に特異的」とは、例えば、麻疹ウイルスという抗原に結合する抗体は、インフルエンザウイルスやB型肝炎ウイルスの抗原には結合しないことを意味する。この抗体と抗原の特異的な結合を抗原抗体反応といい、その結果生じた結合体を抗原抗体複合体と呼ぶ。この抗原抗体反応の特異性を利用して、抗体を用いて検体中のウイルスの同定をしたり、逆に抗原を利用して血清中の抗体の有無や抗体価を測定、診断することが広く行われている。本稿では、抗原抗体反応を利用したウイルス検出法、診断法を概説する。

■ウイルス抗原検出法

1. 免疫染色法 (immunostaining assay)

抗体が抗原特異的に結合する性質を利用して、目的とするウイルスに対する抗体を用いてウイル

ス感染細胞や感染組織からウイルス抗原を検出する方法である。すなわち免疫染色法は、抗原抗体反応とその結果を目視できるようにするための発色反応からなる。一般に感染細胞や感染組織をスライドガラス上に固定し、そこで抗体と反応させ、顕微鏡下で観察し抗原を検出する。抗原抗体反応を可視化する方法としては以下のものがある。

1) 蛍光抗体法 (fluorescent antibody technique : FA)

蛍光色素を標識した抗体を検体と反応させ、反応後のスライドガラスを、紫外線を照射できる蛍光顕微鏡で観察する。検体内に抗体と反応するウイルス抗原が存在すると、抗原抗体反応が起こり、抗体がそこに留まり、抗体に標識された蛍光色素が紫外線によって励起され蛍光が観察される。

2) 酵素抗体法 (enzyme antibody technique)

酵素で標識した抗体を用いて抗原を検出する方法である。酵素としてはペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase : HRP) やアルカリフォスファターゼ (alkaline phosphatase : AP) などが用いられ、それぞれの酵素によって色素を形成する基質を反応させ、抗原抗体反応を検出する。酵素反応によって発色する色素を観察するため、

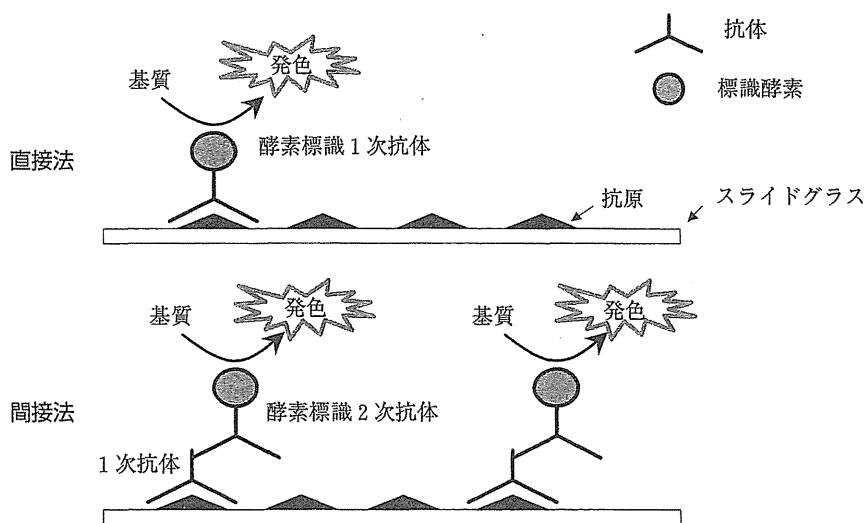


図1 免疫染色法 (酵素抗体法)

光学顕微鏡で観察できること、長期の保存が可能など蛍光抗体法より有利な点がある。

3) 金コロイド法 (colloidal gold technique)

抗体に金粒子等を結合させて、抗原抗体反応を可視化する。主に電子顕微鏡で観察する時に用いる。

また、免疫染色法には以下の2つの方法がある(図1)。

1) 直接法 (direct method)

ウイルスに特異的な抗体(1次抗体という)を、直接蛍光色素や酵素で標識し、検体と反応させる方法。1回の抗原抗体反応と発色反応からなる。

2) 間接法 (indirect method)

1次抗体には標識せずに、1次抗体を認識する抗体(2次抗体という)を蛍光色素、酵素などで標識した標識2次抗体を用いる。2次抗体とは、例えばウサギを免疫して1次抗体を作製したのならば、ウサギ抗体〔ウサギ免疫グロブリン(IgG)〕を認識する抗体をいう。検体と1次抗体を反応させ、続いて標識2次抗体を反応させる。1次抗体が検体中の抗原と抗原抗体複合体を形成すれば、その複合体の1次抗体を標識2次抗体が認識、結合し、基質の添加により発色する。2回の抗原抗体反応と発色反応からなる。また、例えば標識抗ウサギ抗体があれば、ウサギを免疫して作製した

すべての1次抗体に使用でき、感度も高くなるという利点がある。

2. ウェスタンブロッティング (western blotting) 法

ウェスタンブロッティング法は、感染細胞や感染組織を電気泳動した後にメンブランに転写し、メンブラン上で抗原抗体反応を行い検体中の抗原蛋白質を検出する方法である。この方法では単に抗原蛋白質を検出するだけではなく、抗原蛋白質のおおよその分子量や、蛋白質がリン酸化等の修飾を受けているかなども抗体を使い分けることで検出できる。ウイルス抗原を含む検体を陰イオン性界面活性剤であるSDSや還元剤である2-メルカプトエタノールを含むbufferで溶解し、蛋白質の立体構造を破壊し線状にする。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を行い、蛋白質を分子量によって分画、展開した後、ゲル内の蛋白質を電氣的にメンブランに転写し固定する。抗原蛋白質が転写されたメンブランをウイルスに対する抗体と反応させ、さらに、APやHRPなどの酵素で標識した2次抗体を反応させる。メンブラン上の抗原と結合した1次抗体が存在すれば、酵素標識された2次抗体と1次抗体間で抗原抗体反応が起きる。発色基質による発色、

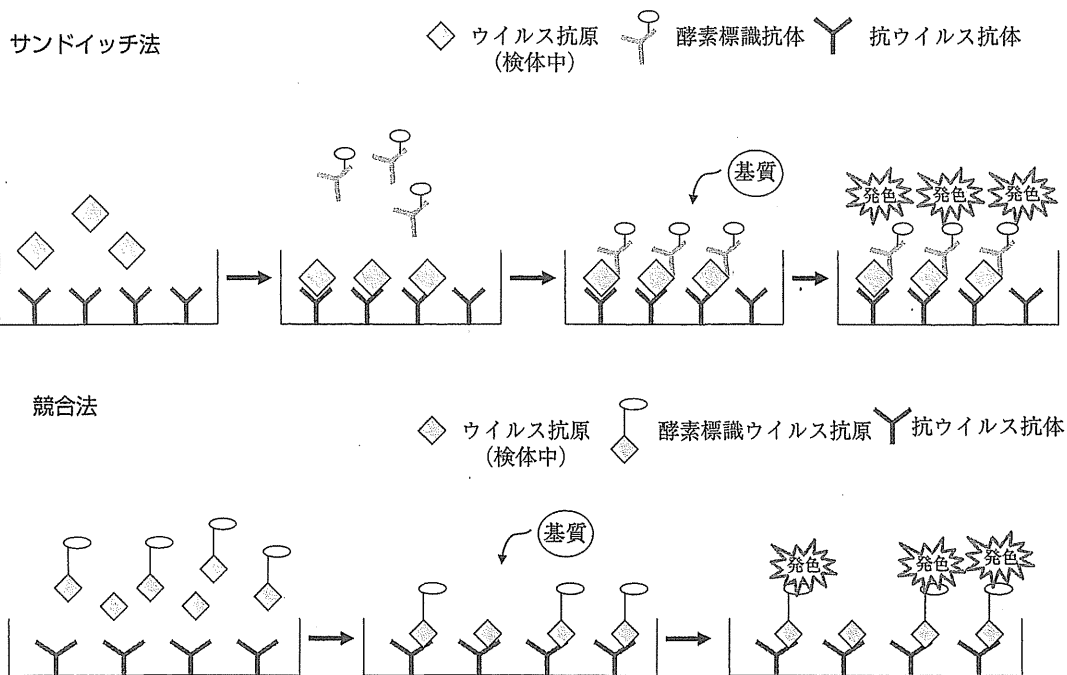


図2 酵素免疫測定法 (抗原検出)

あるいは化学発光させてX線フィルムへ露光し抗原を検出する。近年は発色法に比べて感度が高い化学発光法が汎用されている。

3. 免疫拡散法 (immunodiffusion techniques)

アガロースや寒天などのゲルに抗原と抗体を拡散させ、両者が最適な濃度で混合した時に形成される不溶性の沈降物を観察することで抗原抗体反応を検出する方法である。抗原の同定やある程度の定量が可能である。あらかじめ抗血清を含んだゲルにウイルス抗原を拡散させ、抗原の濃度によりゲル内に抗体との沈降線を形成させる一元放射免疫拡散法 (single radical immunodiffusion : SRD) や、ゲルに複数の穴をあけ、そこにウイルス抗原、抗体を別々に入れて両者がゲル内に拡散し、最適な条件で混合することにより生じる沈降線の現れ方から抗原抗体反応の異同等を判定する二重免疫拡散法 (double immunodiffusion, ouchterlony) 等がある。SRD法はインフルエンザワクチンの抗原量を定量する方法として用いられている。

4. 酵素免疫測定 (enzyme-linked immunosorbant assay : ELISA) 法

検体中に含まれる抗原、あるいは抗体の濃度を測定する時に用いられる。マイクロプレート (96 well プレート) に固相化 (固定) した抗体、あるいは抗原に検体を反応させ、次いで酵素で標識した2次抗体を反応させる。発色基質を加えて発色させ、発色の程度を吸光度計で測定する。抗原量の定量には、同時に濃度がわかっている標準品の吸光度を測定し検量線を作成して、そこから算出する。抗原の検出法にはサンドイッチ法と競合法がある (図2)。

1) サンドイッチ法 (sandwich method)

目的のウイルスに対する抗体を96 well プレートに固相化し、検体を加え固相化した抗体と反応させる。プレートに非特異的に結合した検体を洗浄して除去し、酵素標識した抗ウイルス抗体 (標識抗体) を加え、抗原抗体反応を行う。標識抗体には固相化に用いた抗体が認識する抗原エピトープと異なるエピトープを認識する抗体を用いる。抗原が存在すると抗原を抗体がサンドイッチ状にはさむ複合体 (固相化抗体-抗原-酵素標識抗体)

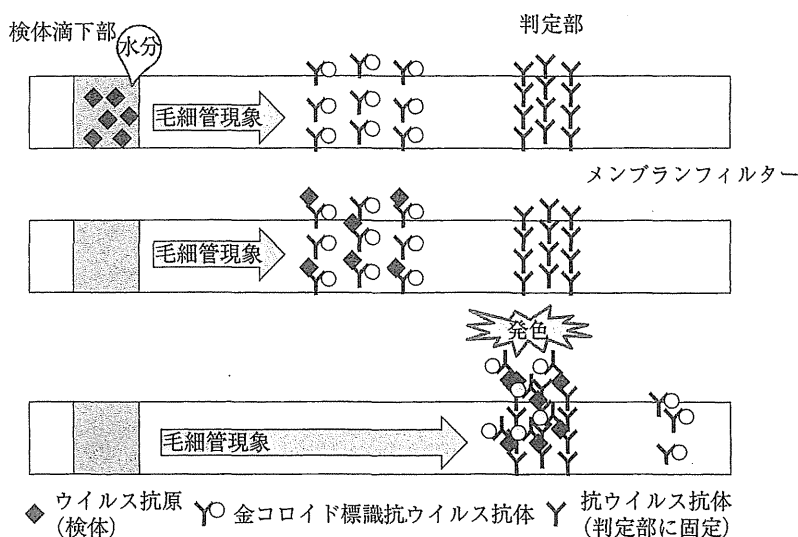


図3 イムノクロマト法の原理

を形成する。検体と反応しなかった標識抗体を洗浄して取り除き、発色基質を加え吸光度を測定する。抗原量と吸光度はほぼ相関する。

2) 競合法 (competitive method)

目的のウイルスに対する抗体を 96 well プレートに固相化し、ウイルス抗原を含む検体と酵素標識した抗原を同時に添加し、抗原抗体反応を行う。洗浄後、酵素の発色基質を添加し発色させ、吸光度を測定する。検体中に抗原が多い時には、固相化した抗体と反応する標識抗原の割合が減少し吸光度は低くなる。

5. イムノクロマト法 (immunochromatographic assay)

イムノクロマト法は操作が簡単で、特別な機器が不要な上、30分程度で結果が得られることからベッドサイドでの診断用として広く用いられている。近年、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ロタウイルス等の診断キットが複数の会社から開発されているが、感度、特異度等の性能はキットにより異なる傾向にある。メンブラン上の一方(判定部)には対象とする抗ウイルス抗体を固定し、中程に金コロイド(または酵素)標識抗ウイルス抗体を塗布しておく。もう一端の検体

滴下部に滴下された検体中のウイルス抗原は、毛細管現象によってメンブラン中を移動し、金コロイド標識抗体と反応し、金コロイド標識抗体-抗原複合体を形成する。この複合体は展開液によりさらにメンブラン上を移動し、判定部で固定された抗ウイルス抗体に捕捉され、金コロイド標識抗体-抗原-抗体のサンドイッチ複合体を形成する。この複合体の形成により金コロイドが集積、発色しメンブラン上にラインが出現する(図3)。

■抗体検出法

1. 中和法 (neutralization test : NT)

抗体がウイルスと結合すると、ウイルスの細胞への感染能を減少させることを利用して抗体を測定する方法である。中和法の実施にはウイルスの分離、培養が可能であることが条件となる。ある一定の感染価を持つウイルスと階段希釈した血清を混合した後、この混合液を培養細胞に感染させる。プラーク数などが一定比率以下(通常50~90%)に減じる最高希釈倍率によって抗体価を表すプラークリダクション法、マイクロプレートに培養した細胞で、細胞変成が出現する血清濃度で中和抗体価を測定するマイクロタイター法などがある。中和法は一般に感度、特異性が高く、

感染防御能と高く相関すると考えられているが、培養細胞を用いるため機器、施設が必要であり、技術的にも習熟を要する。また、ウイルスによってはバイオセーフティを考慮する必要がある。中和法ではIgG, IgM, IgA抗体が検出される。

2. 赤血球凝集抑制法 (hemagglutination inhibition test : HI test)

インフルエンザウイルス、麻疹ウイルス等のウイルスは、ある特定の動物の赤血球と結合する性質を持つ。これらのウイルス抗原と赤血球を混合するとウイルスを仲立ちにして赤血球が凝集する。この現象を赤血球凝集 (hemagglutination : HA) という。HI試験は、抗体がウイルスと結合することでHA能を抑制する性質を利用して、検体中のウイルス抗体を測定する方法である。血清を階段希釈し、ウイルス抗原と反応させた後、動物の赤血球と反応させる。血清中にウイルス特異的な抗体が存在した場合、抗原と結合してHA活性が抑制される。抗体価はHA活性の抑制を示す最大の血清希釈倍数で表される。HI試験は感度がよく、比較的簡単で一度に多くの検体の測定が可能であるが、HA能を持たないウイルスには使用できない。またHI抗体価は必ずしも中和抗体価とは一致しないことが知られている。検体の血清中に非特異的な血球凝集能が残ることや、採取した個体によって赤血球の感度が異なることがある。HI試験ではIgG, IgM, IgA抗体が検出される。

3. 補体結合試験 (complement fixation test : CF test)

抗体と抗原が結合して抗原抗体複合体を形成すると、補体はその抗体部分に非特異的に結合する。一方、補体は感作ヒツジ赤血球 (溶血素を結合させた赤血球) を溶血させるという性質を持つ。これらの性状を利用して血球の溶血を指標に、検体中に抗原特異的な抗体が存在するかを検査する方法である。事前に非働化した検体の階段希釈列を

作製し、各希釈検体を抗原と混合し、それに補体を加え反応させた後、感作赤血球を添加する。検体中に抗原特異的な抗体が存在する場合、抗原抗体複合体が形成され、そこに補体が結合し、反応液中のフリーな補体が減少し溶血が阻止される。抗体価は溶血が阻止される最大希釈血清倍数で表す。感度は中和、HI試験より劣り、特異性も低い。抗原として準備できるほとんどのウイルスで利用できるが、感度、特異性がやや劣るため感染症の診断には向かない場合がある。

4. 受身凝集反応 (passive aggregation : PA) 法

表面にウイルス抗原を付着させた赤血球、あるいはラテックス粒子、ゼラチン粒子などの人工担体が抗体と反応すると赤血球、人工担体が凝集することを利用した抗体検査法。凝集を起こした最高希釈倍率をもって抗体価とする。簡便で短時間に結果が得られ、感度、特異性に優れる。赤血球の凝集で抗体を検出する方法を受身血球凝集反応 (passive hamagglutination : PHA)、人口担体を用いるものを粒子凝集反応 (particle agglutination : PA) 法という。PA法は人工担体を用いるため、非特異的反応が少なく抗体のスクリーニングに適する。

5. 酵素免疫測定法

原理は抗原検出に用いる酵素免疫測定法と同様で、マイクロプレートに固相化した抗体、抗原と検体との間で抗原抗体反応を行い、酵素の基質を添加して吸光度で抗体量を測定する方法である (図4)。標準品を用いて検量線を作成し、抗体価を定量することができ、IgG, IgM抗体を区別して測定することも可能である。以下の方法がある。

1) 間接法 (indirect method)

96 well プレートにウイルス抗原を固相化し、検体 (ヒト血清) を反応させた後、2次抗体として酵素標識抗ヒトIgG抗体を反応させ、基質を加え発色させる方法。

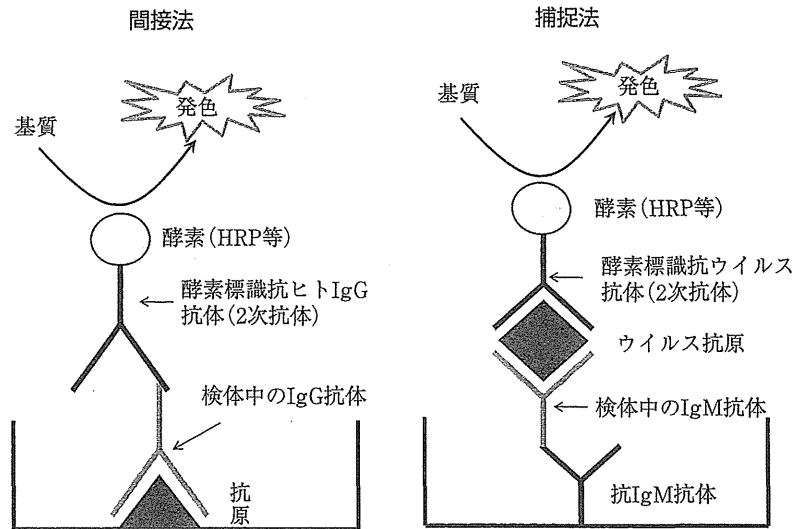


図4 酵素免疫測定法の抗体測定原理

2) 捕捉法 (capture method)

主にIgM抗体を検出に用いる。抗ヒトIgM抗体をマイクロプレートに固相化する。検体(ヒト血清)を反応させた後、ウイルス抗原を反応させる。次いでウイルス抗原に対する酵素標識された抗体(標識2次抗体)を反応させ、基質を加えて発色を測定する。IgM抗体検出時の非特異的反応の原因となるリウマチ因子(IgG抗体に対する自己抗体, IgM抗体が優位である)の影響を少なくすることができるためIgM検出に用いられる。

6. 間接蛍光抗体法 (indirect fluorescent antibody technique : IFA)

ウイルスに対する抗体の測定を目的に間接蛍光抗体法を実施する時は、ウイルスの感染細胞などをスライドガラス上に固定して、階段希釈した被検体を反応させ、次いで蛍光標識した抗ヒト抗体(標識2次抗体)を反応させる。検体中にウイルス抗原と結合する抗体が存在すれば、蛍光顕微鏡下で蛍光を発色する。蛍光標識抗ヒト抗体を代え

ることで抗体をクラス別(IgG, IgM, IgA)に検出することが可能である。一般に感度は高いが、非特異的反応や誤差を生じやすいという欠点がある。

おわりに

ウイルスを同定する方法、並びにウイルスに対する抗体の測定法を概説した。これらはウイルス感染症の診断に用いられているが研究の場面でも汎用されている技術である。抗原抗体反応は抗原の純度、抗体の結合能などで結果が一様にならないことも多い。自ら抗原抗体反応を利用した検出系を確立するには、よい抗原、抗体を用意するとともに反応温度、時間、pH、buffer成分等を事前によく検討し、手技を習熟する必要がある。

文献

- 1) 多田富雄監訳：免疫学イラストレイテッド，南江堂，東京，1986。
- 2) 医科ウイルス学(改訂第2版)，大里外誉郎編，南江堂，東京，2000。
- 3) ウイルス実験学 総論(改訂第2版)，国立予防衛生研究所学友会編，丸善，東京，1964。

* * *

ウイルス検査の意義

Diagnostic test of viral infection

特集

加瀬 哲男

KASE Tetsuo

感染症制御のための公衆衛生の役割 Key words ウイルス検査 ウイルス分離 抗原検出 核酸検出 抗体検査

ウイルス感染症を診断するには、ウイルス学的診断法または血清学的診断法が用いられる。とくにウイルス学的診断は、病原微生物を患者検体から直接検出するもので、病因診断としての意義は高い。ウイルス学的診断には、生きたウイルスを検出するウイルス分離、ウイルス蛋白を検出する抗原抗体反応、ウイルス遺伝子を検出する核酸検出法などがある。ここではこれら検出法のそれぞれの特徴を述べるとともに、その情報がもたらす公衆衛生学的意義について考察してみたい。



ウイルス感染症の診断

ウイルスは、生きた細胞にのみ寄生して増殖する微生物である。ウイルスの構造は、単純でその遺伝子(DNA か RNA のどちらか一方)と数少ない構造蛋白からなり、ウイルスの複製はそのほとんどを宿主細胞の機構に依存している。そのため通常ウイルスの宿主域はあまり広くなく、ヒトにのみ感染性を有するウイルスも多い¹⁾。

ウイルス感染症の診断はもっぱら流行状況と臨床症状によることが多いが、正確な病因診断をするためには、ウイルス学的診断あるいは血清学的診断が必要となってくる。ウイルス学的診断には、生きたウイルスを検出するウイルス分離、ウイルス蛋白(抗原)を検出する方法、ウイルス遺伝子(核酸)を検出する方法、あるいは、ウイルス粒子を

直接見る電顕観察などがある²⁾。ウイルス分離は最もオーソドックスな方法であり、病因学的には最も信頼性が高いとされているが、一般的に臨床現場で行われることは少ない。ウイルス抗原を検出する方法として酵素抗体法(EIA)がある。EIAは多くのウイルス感染症に用いることが可能であり、その汎用性は高い。さらに簡便性と迅速性を究めた免疫クロマトを原理とする商品が多く販売されるようになってきた。

また、汎用性においては最も優れた検出法は、ウイルス核酸を検出する方法である。PCRあるいは、RT-PCRが多くの感染症の診断に取り入れられている。最近では原理が異なったLoop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)法³⁾などの核酸増幅法も導入されている。電顕観察はいうまでもなく特別な施設でのみ可能であるが、下痢症の一部や未知のウイルス感染症の診断には、不可欠である。主なウイルス感染症についての病因診断に

表1 主なウイルス感染症における病因診断*

ウイルス名	疾患名	ウイルス分離	抗原検査	遺伝子検査*	抗体検査
天然痘ウイルス	天然痘	しない(BSL4)	可能	可能	しない
ラッサウイルス	ラッサ熱	しない(BSL4)	しない	可能	しない
クリミア・コンゴ出血熱ウイルス	クリミア・コンゴ出血熱	しない(BSL4)	しない	可能	しない
エボラウイルス	エボラ出血熱	しない(BSL4)	しない	可能	しない
マールブルグウイルス	マールブルグ出血熱	しない(BSL4)	しない	可能	しない
アデノウイルス	咽頭結膜熱	病原体サーベイルランス	する(迅速あり)	する	する
アデノウイルス	流行性角結膜炎	病原体サーベイルランス	する(迅速あり)	する	する
単純ヘルペスウイルス	性器ヘルペス	可能	する(迅速あり)	する	する
水痘帯状疱疹ウイルス	水痘・帯状疱疹	可能	する	する	する
ヒトヘルペスウイルス6型	突発性発疹	可能	しない	する	する
パピローマウイルス	子宮頸癌	不可能	しない	する	しない
B型肝炎ウイルス	B型肝炎	不可能	する	可能	可能
ヒトパルボウイルスB19	伝染性紅斑	可能	しない	可能	可能
インフルエンザウイルス	インフルエンザ	病原体サーベイルランス	する(迅速あり)	する	可能
RSウイルス	RSウイルス感染症	可能	する(迅速あり)	可能	可能
ムンプスウイルス	流行性耳下腺炎	可能	しない	可能	可能
麻疹ウイルス	麻疹	病原体サーベイルランス	しない	可能	しない
狂犬病ウイルス	狂犬病	可能(BSL3)	可能	可能	可能
ロタウイルス	感染性胃腸炎	可能	する(迅速あり)	可能	可能
ノロウイルス	感染性胃腸炎	不可能	する(迅速あり)	可能	可能
SARSコロナウイルス	SARS	可能(BSL3)	可能	可能	可能
日本脳炎ウイルス	日本脳炎	可能	する	可能	可能
ウエストナイルウイルス	ウエストナイル熱	可能(BSL3)	可能	可能	可能
デングウイルス	デング熱	可能	する(迅速あり)**	可能	可能
C型肝炎ウイルス	C型肝炎	不可能	する	可能	可能
風疹ウイルス	風疹	可能	しない	可能	可能
ポリオウイルス	ポリオ	病原体サーベイルランス	しない	可能	可能
エンテロウイルス	手足口病	病原体サーベイルランス	しない	可能	可能
エンテロウイルス	ヘルパンギーナ	病原体サーベイルランス	しない	可能	可能
エンテロウイルス	無菌性髄膜炎	病原体サーベイルランス	しない	可能	可能
ヒト免疫不全ウイルス	エイズ(AIDS)	可能(BSL3)	可能	可能	可能

*: 表中の「する」は通常病院内およびラポレベルで実施されるものを示している, 「可能」はラポ以上のレベルで特別に実施できるものを示す

** : 研究目的でのみ使用可

病原体サーベイルランス: 感染症発生動向調査で実施するもの

BSL: バイオセーフティレベルをいい, BSL4はP4施設, BSL3はP3以上の施設が必要

用いられる方法の可否について表1にまとめた。



検査材料の選択と採取時期

すべてのウイルス学的検査のなかで最も重要な

ことは、検査材料の選択と、いつ採取されるかということである。それには、おのおののウイルスの増殖器官と排泄部位および排泄期間を知っておく必要がある。当然のことながら、呼吸器系感染症は、気道粘膜より侵入・増殖し、排泄される。

また、腸管感染症は、経口的に侵入し、腸管内で増殖し、便中に排泄される。しかしながら多くのアデノウイルスウイルスは、呼吸器系組織で増殖し、排泄されるが、腸管でも増殖し便中にも多数排泄される。また、麻疹ウイルスは気道粘膜から侵入し、血行性に全身感染に至る。そのため、ウイルスの検出には気道分泌物だけでなく血液検体が最も適している。逆に、無菌性髄膜炎の患者便からはエンテロウイルスがしばしば検出される。この場合、病因論的には正確とはいえ、やはりウイルス性髄膜炎と診断するには髄液から検出されるべきである。

ウイルスの排泄期間も個々のウイルス感染症によって異なるが、一般的には臨床症状が出現し始めた早期に検査材料を採取することが望ましい。ただし、インフルエンザでは、あまり発病初期だと検出できないという報告もある。抗体検査においても採血の時期が最も大きな要因となる。すなわち、有意な抗体上昇が確認できるように採血されなければ、病因診断は難しい。

ウイルス検査の公衆衛生への関わり

元来、ウイルス感染症の診断は流行状況と臨床症状によってなされてきた。しかしながら、最近の傾向としては、病原ウイルスを確定することによって、より正確に診断することが社会から求められるようになってきた。ウイルス感染症の診断法の進歩は著しく、またその診断情報もインターネットの発達によって迅速に公開されるようになり、公衆衛生においても、広く利用されるようになってきた⁴⁾⁵⁾。ただし、一般的に公開される情報は検出方法の精度にまで言及されたものでないことは留意しておくべきである。以下にはそれぞれの検査法の特徴にまとめた。

ウイルス分離

ウイルス分離は時間と手間がかかるが、ウイル

ス感染症診断のゴールドスタンダードである。ウイルス学的、免疫学的、疫学的な詳細な知見を得るためには、ウイルス分離すなわち生きたウイルスの入手が不可欠である。ただし、現在でもノロウイルスなど分離不可能なもの、あるいはロタウイルスのように非常に分離しにくいウイルスもあり、これらのような培養細胞で増殖しない、あるいは増殖しにくいウイルス性疾患はウイルス分離検査の対象にならない⁶⁾。

元来ウイルス分離の公衆衛生における役割は、流行ウイルスを把握し臨床診断をより正確にするものであった。また回顧的ではあるが、臨床診断を確認するという一面もある。この方法には即時性はなく、常に後方視的な診断となり、患者の治療に直接結びつくものではない。公衆衛生学的には病原体サーベイランス情報として公開され、例えばエンテロウイルス感染症やインフルエンザにおけるウイルスの血清型別情報などが発信される。すなわち、今年の夏季はコクサッキーウイルスA10型が主に流行したとか、2008～2009年の冬期のインフルエンザはAH1亜型とAH3亜型が混合流行していたというような情報となる。さらにはインフルエンザウイルスにおいては、ワクチン株との抗原性の違いなどもウイルスが分離されてはじめてわかることである。

ウイルス蛋白(抗原)の検出

抗原抗体反応を用いたウイルス蛋白(抗原)の検出は、特異性、汎用性が高く、実験室レベルではほとんどのウイルス感染症の診断に応用できる。各ウイルス抗原に対する抗体(あるいは標識抗体)も多数市販されており、蛍光抗体法(FA)やEIAを診断に用いた報告例は多い。ウイルス抗原の検出は、生きたウイルスを必要とするのではないので固定した組織等にも応用できるという利点はあるが、一方検体中に一定量以上の抗原量が必要とされるため、通常感度はウイルス分離よりは低くなる。

ウイルス感染症の迅速診断キットは、この抗原抗体反応系を用いたものがほとんどであり、検査にかかる所要時間は10～60分である。キット化された製品では特殊な高額機器は必要なく、キットを購入するだけで検査が完結するようになっている。

市販されているウイルス感染症の迅速診断キットの検出系としては、EIA、イムノクロマトグラフィ（免疫クロマト）⁷⁾、ラテックス凝集反応が用いられている。キットを使用するポイントとしては、抗原量が十分に確保できる検体でテストすることである。これは、適切な時期に、適切な部位から、適切な方法で検査材料を採取することが最も重要であることを示している。抗原抗体反応系を用いたウイルスの検出技術は、現在のところ迅速診断としては最も優れたデバイスであり、これからますますいろいろなウイルス感染症への発展が期待される。

ウイルス感染症の診断において、迅速診断キットの出現は画期的であった。ウイルス感染症を臨床現場で診断し、リアルタイムで情報を発信できるということは臨床医にとってもは革新的なできごとであったと考えられる。またこのことは公衆衛生担当者にとっても非常に有益であると思われる。少なくとも臨床診断と簡易キットといえども微生物検査を組み合わせるものからなり、診断確度は数段向上していると思われる。感染症サーベイランスは通常微生物検査の結果を含まないものも多いが、迅速診断キットによって診断された疾病の動向把握はより正確なものとなり、精度を高めたものとして信頼性の向上に寄与したことは間違いない。

迅速診断キットの検査時間は、酵素抗体法では30～60分ぐらい、免疫クロマト法では10～20分ぐらいで結果を得ることができる。とくに免疫クロマト法ではベッドサイドで検査可能であり、これらの方法は直接治療方針を決定する。また一部の疾患においては、この結果を集計して全国に情報提供しているものもある。免疫クロマト等の結果

は、詳細なウイルス学的情報は欠如しているのに、病原体情報としての価値は低いが、臨床診断と結びついた速報性は強く、リアルタイムでの情報発信に繋がっている。とくにインフルエンザなどの呼吸器疾患では、臨床症状だけでは、類症鑑別できないことも多いので、迅速診断キットは診断精度を高めることに役立っている。

しかしながら、簡易診断はあくまでスクリーニングまたは診断の補助に使われるべきものである。確定診断やウイルス学的情報を得るには詳細な検査が必要であることはいうまでもない。



ウイルス遺伝子(核酸)の検出

1990年代から行われるようになったPCRあるいはRT-PCRの普及によって、検体中のウイルス核酸を検出するというアイデアは、普遍的となった。これまでウイルス分離に比して補助的な意味合いで使用される方法であったが、最近の報告では、ウイルス分離の難易度とは関係なく、ラボレベルでは最も多用される方法となった。これは技術的な進歩が大きく、非常に便利で自動化が進み、また、感度を上げながらコンタミネーションの可能性を低減させるように開発が進んでいるためである。また、コンタミネーションに関しては、作業動線の改良や核酸抽出過程の自動化によっても大きく軽減することができる。

ただしこの方法の基本的性格は、ウイルスの持つ生物活性とはまったく関係なく、核酸を試験管内で化学的に増幅させることである。そのため、ウイルスの生死やウイルス粒子の存在にも関係なく、極少量の病原体の核酸でも検出される。ウイルス分離も感染性粒子が1つでもいれば、陽性となりえるが、この場合は感染性の証明となるので病因論的には支障がない。増幅した核酸を検出する場合は、ウイルスの生死や存在形態とは無関係にウイルス遺伝子の存在を確認するだけである。ゆえに増幅核酸を検出することと病因論を結びつけるには、患者の臨床症状や周囲の疫学情報を鑑

みて決定する必要があることはいうまでもない。

なかでもプローブを用いるリアルタイム (RT-) PCR は、反応液中のプローブと PCR 産物がハイブリダイゼーションすることによってその特異性が保証され、また対照とするプラスミドから対象ウイルスのコピー数がほぼ正確に計算できる⁸⁾。この方法は、コンタミネーションの危険性も低く、検体処理から結果判定まで数時間で終了できる。現在のところ、高額機器が必要であること、およびすべてのウイルスに対する適切なプライマーとプローブの知見が得られていないことから、診断できるウイルスは限られているが、将来、最も汎用される方法と思われる。

現在、PCR を代表とする増幅核酸の検出法は、あらゆる感染症の病原体診断に応用可能である。多くの病原体においてその遺伝子情報が公開され、既知の病原ウイルスでは、すべてのウイルスについて検出できるといっても過言でない。とくに日本に存在しないような狂犬病や多くの出血熱ウイルスについても検出系の確立は可能である。

また、最近では LAMP 法をはじめとして PCR 法とは原理は異なるが、標的核酸を人工的に増幅させる方法が多数報告されるようになった。LAMP 法は必ずしも高額機器を必要としないので、一般病院や発展途上国においても利用できるなどの利点がある⁹⁾。多くの感染症で最適なプライマー等が見つかれば、その応用性は広いと思われる。

その他の指標

ウイルス感染症においては新興感染症や出現頻度が非常に低い感染症では、電顕観察も有用な手段である。Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) が出現したときは、その原因が電顕観察によっていち早くコロナウイルスであることが示された。

血清中の抗体測定による診断は、通常ペア血清を用いなければならないので、レトロスペクティブな診断方法であるが、麻疹などのいくつかの感染症では、IgM 抗体を測定することによって急性期の確定診断が可能となる。もちろん、この場合もほとんどが特定のラボレベルでの検査となる。

おわりに

ウイルス感染症を診断する意義について、検査の方法論ごとにまとめてみた。実際はおのおのの疾病ごとに、その検査法が異なり、その解釈も異なるので、各疾患別に病原検索する意味が異なってくるのは当然である。ただし、原則的に検査の意義というものは不変であると思われる。今の情報過多の時代に正確な分析を行うために、検査方法の特徴を知ることは重要なことであると思われる。

文 献

- 1) 加瀬哲男：ウイルスとは—その生態と検出— 防菌防黴 33(10)：543-549, 2005.
- 2) 加瀬哲男：ウイルス感染症の診断—現状と将来— 総合臨牀 52(1)：18-21, 2003.
- 3) 栄研化学株式会社 Eiken GENOME SITE <http://loopamp.eiken.co.jp/>
- 4) 国立感染症研究所 感染症情報センター：感染症発生動向調査 週報 <http://idsc.nih.gov/idwr/index.html>
- 5) 国立感染症研究所 感染症情報センター：病原微生物検出情報 <http://idsc.nih.gov/iasr/index-j.html>
- 6) 加瀬哲男：ウイルスの分離、同定法の現状 臨床医 29(11)：1951-1954, 2003.
- 7) 愛知県衛生研究所：衛研技術情報 イムノクロマトグラフィー法の原理と特徴 2006年 VOL30 NO4 <http://www.pref.aichi.jp/eiseiken/2f/20063004.pdf>
- 8) 北條浩彦(編)：原理からよくわかるリアルタイム PCR 実験ガイド—基本からより効率的な解析まで必要な機器・試薬と実験プロトコール 羊土社, 2007.



世界麻疹排除計画と世界麻疹風疹実験室ネットワーク

(Vol. 31 p. 35-36: 2010年2月号)

「麻疹排除」へ向けての世界の取り組みを理解するためには、麻疹の恐ろしさを正しく認識する必要がある。かつてはわが国でも「命定め」と恐れられた麻疹も、予防接種の普及によって罹患者は大幅に減少し、同時に国民の栄養・衛生面の向上、医療の質の向上によって致死率も大きく低下した（先進国における麻疹による致死率は約0.1%である）。小児科医といえども、麻疹による死亡者をみる機会は非常に少なくなっている。しかし、世界では依然として年間十数万人（数年前までは年間40～70万人）の麻疹による死亡者が報告されている¹⁾。発展途上国の乳幼児では、麻疹による致死率が20%を超えることも珍しくなく、小児の主要な死亡原因のひとつである²⁾。また、高い病原性に加えて、伝染力が非常に強いことも、麻疹が恐れられる大きな原因である。

幸いなことに、麻疹ウイルスには、血清型がひとつしかなく、30年以上も前から利用されているワクチンが未だに有効である。しかも、麻疹の生ワクチンは、効果・安全性ともに非常に優れており、ワクチンの接種を徹底することによって麻疹の流行を完全に無くすることができる。世界保健機関（WHO）は、「麻疹排除」（常在する麻疹ウイルスによる伝播の無い状態）を目標とする地域と、「麻疹による死亡者の大幅な減少」を目標とする地域とに分けて、積極的なワクチン接種活動を行っている。以前から、麻疹対策を精力的に行ってきた汎アメリカ地域（PAH）では、2000年にすでに「麻疹排除」が達成されている。アフリカ地域（AFR）と南東アジア地域（SEAR）では、今のところ排除を目標とすることは困難で、「麻疹による死亡者の大幅な減少」が目標となっている。ヨーロッパ地域（EUR）、東地中海地域（EMR）では今年（2010年）が麻疹排除の目標年である。日本を含む西太平洋地域（WPR）の委員会は、「2012年までに麻疹を排除する」という目標を2005年に公式に発表している。WPRにおいては、すでに37カ国のうちの半数以上の国で、排除もしくは排除に近い状況になっている³⁾。韓国は2006年に麻疹排除の達成を宣言している⁴⁾。オーストラリアもまた、2005年以降、排除の状態にあると報告されている⁵⁾。一方、日本では2008年に年間約1万1千例の麻疹患者が報告されており、中国では約13万例の報告があった。この数はWPRにおける麻疹症例の実に97%以上を占めている³⁾。数年前に、日本から伝播したと考えられる海外での麻疹症例が度々発生したため、以来、わが国は「麻疹輸出国」と揶揄されてきた。2007年6月に国際保健規則（International Health Regulation: IHR）が改訂され、その対象疾患が、黄熱、コレラ、ペストから、国際的な公衆衛生上の脅威となりうる、あらゆる事象へと広げられるようになったため、麻疹の流行国から排除国への伝播が、より一層、厳しく監視されるようになってきている。世界全体が麻疹排除に向けて積極的に取り組んでいる今、世界と協調して麻疹排除に向けた適切な施策を施すことは、わが国の国民の健康や公衆衛生上のためだけでなく、国際的なわが国の立場を守る上でも非常に重要なことである。2007年12月にわが国でも「麻疹に関する特定感染症予防指針」が告示され、十代への補足的ワクチン接種や、定期接種率向上のための取り組みが積極的に行われ、2009年の麻疹報告数は、前年の約1万1千例から約740例へ大幅に減少した。

「麻疹排除」を達成するためには、麻疹含有ワクチンを2回接種すること、そして、その2回の接種率を各々95%以上にすることが必要であると考えられている。ワクチンの接種を推進してゆくとともに、流行の実態を把握することは、ワクチン政策の効果や是非を検証し、また、伝播を効果的に抑制するための対策を考える上で非常に重要である。加えて、麻疹患者の全数を適切に把握することができる質の高いサーベイランス網を備えていることは、麻疹が排除されたことを立証するために必要であり、「麻疹排除」を宣言するための要件とされている。麻疹患者を繰り返し診たことのある臨床医にとって、典型的な麻疹症例を臨床的に診断することは、容易なことであろうが、今後、成人麻疹や、ワクチンの免疫が減弱したために発生した非典型的な麻疹症例の割合が増加すると予想される。また、麻疹症例が全国で年間数百例程度あるいはそれ以下になった状況では、流行との繋がりがはっきりしない孤発例が多くなり、診断をますます難しくすると考えられる。麻疹の排除を達成するためには、1例の見逃しが、政策の大きな後退を招く危険性が高いことから、麻疹の可能性が少しでも考えられる症例や、あるいは臨床的に確定できると考えられる症例においても、確実に検査診断を実施することが重要である。同時に、麻疹ウイルスの遺伝子型を解析して、その由来、流行ルートを明らかにすることがWHOからも強く求められている。大部分の麻疹あるいは、その疑い症