

Takahashi, K Kaminogawa, S	of IgA <sup>+</sup> B cells				
Kaji, T Ishige, A Hikida, M Taka, J Hijikata, A Kubo, M Nagashima, T <b>Takahashi, Y</b> Kurosaki, T Okada, M Ohara, O Rajewsky, K Takemori, T	Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory	J Exp Med	209	2079-2097	2012
Onodera, T <b>Takahashi, Y</b> Yokoi, Y Ato, M Kodama, Y Hachimura, S Kurosaki, T <b>Kobayashi, K</b>	Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection	Proc Natl Acad Sci USA	109	2485-2490	2012
<b>Ohnishi, K</b> <b>Takahashi, Y</b> Kono, N Nakajima, N Mizukoshi, F Misawa, S Yamamoto, T Mitsuki, Y Fu, S Hirayama, N Ohshima, M Ato, M Kageyama, T Odagiri, T Tashiro, M <b>Kobayashi, K</b> Itamura, S Tsunetsugu-Yokota, Y	Newly established monoclonal antibodies for immunological detection of H5N1 influenza virus	Jpn. J. Infect. Dis.	65	19-27	2012
Yuki, N <b>Takahashi, Y</b> <b>Ihara, T</b> Ito, S Nakajima, T Funakoshi, K Furukawa, K <b>Kobayashi, K</b> Odaka, M	Lack of antibody response to Guillain-Barré syndrome-related gangliosides in mice and men after novel flu vaccination	J Neurol Neurosurg & Psychiatry	83	116-117	2012
小野寺大志 小林和夫 高橋宜聖	B細胞内因性TLRシグナルによるB細胞応答の制御機構	臨床免疫・アレルギー科	58	275-282	2012

庵原俊昭、中野貴司、 <u>落合 仁</u> 、渡辺正博、 <u>二井立恵</u> 、 <u>伊佐地真知子</u>	麻疹・風疹血清疫学と麻疹風疹混合(MR)ワクチンによる抗体反応からみた今後の麻疹および風疹対策.	日本小児科医学会報	39	120-123	2010
庵原俊昭	基礎疾患をもつ人への予防接種	日本小児アレルギー学会誌	24	193-202	2010
庵原俊昭	ワクチンと免疫	小児保健研究	69	830-832	2010
庵原俊昭	抗体検査：目的・結果・次にすることは	小児感染免疫	23	89-95	2011
庵原俊昭	麻疹、風疹、水痘、ムンプスの患者に接触したときの感染予防措置はどうすればよいですか	小児内科	43	s559-s561	2011
庵原俊昭	先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症の病態・診断・治療・予防(後方視的診断も含め)	産婦人科の実際	61	1301-1309	2012
庵原俊昭	ウイルス感染症の診断	臨床と微生物	39	649-655	2012
Suzuki J., Goto H., <u>Komase K.</u> , Abo H., Fujii K., <u>Otsuki N.</u> , <u>Okamoto K.</u>	Rubella virus as a possible etiological agent of Fuchs heterochromic iridocyclitis	Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol	248	1487-1491	2010
<u>Okamoto K.</u> , Fujii K., <u>Komase K.</u>	Development of a novel TaqMan real-time PCR assay for detecting rubella virus RNA	J Virol Methods	168	267-271	2010
<u>Otsuki N.</u> , Abo H, Kubota T, Mori Y, Umino Y, <u>Okamoto K.</u> , Takeda M, <u>Komase K.</u>	Elucidation of the full genetic information of Japanese rubella vaccines and the genetic changes associated with <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> vaccine virus phenotypes	Vaccine	29	1863-1873	2011
Baylis S.A, Heath A.B; Collaborative Study Group. ( <u>Saeko Mizusawa</u> as a member of the Collaborative Study Group)	World Health Organization collaborative study to calibrate the 3rd International Standard for Hepatitis C virus RNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays	Vox Sang	100	409-417	2011
水澤左衛子、岡田義昭	肝炎ウイルスの核酸増幅試験法のための標準品	臨床化学	41	234-239	2012
Chudy M, Hanschmann K.-M, Kress J, Nick S, Campos R, Wend U, Gerlich W, Nübling CW. ( <u>Saeko Mizusawa</u> as a member of the Collaborative Study Group)	First WHO International Reference Panel containing hepatitis B virus genotypes A-G for assays of the viral DNA	J Clin Virol	55	303-309	2012

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 2. ウイルス感染局所における記憶B細胞応答

高橋宜聖, 小野寺大志, 小林和夫

インフルエンザウイルスのような急性ウイルス感染では、B細胞記憶が感染防御に最も有効である。これまで、二次リンパ器官での記憶B細胞応答が主に解析されてきたが、近年、感染局所である非リンパ器官にも記憶B細胞の存在する可能性が指摘され、再感染ウイルスに対する防御反応への役割に関心が高まっている。ウイルス粒子は、それ自身でB細胞を活性化する高次抗原構造を有するが、感染局所に定着した記憶B細胞は、ウイルス粒子の抗原構造を直接感知することにより、二次リンパ器官での記憶B細胞とは異なるユニークな活性化制御を受けていると考えられる。

### はじめに

ウイルス粒子は、タンパク質、脂質、糖質、核酸から成る高次複合体を形成し、精製したタンパク質抗原と異なるB細胞の活性化能を有する。まず、インフルエンザウイルスをはじめとする複数のウイルスでは、エンベロープタンパク質が表面に高密度かつ規則的に配列した粒子構造を形成する。さらに、ウイルス粒子内部には、宿主細胞の pattern recognition receptor (PRR) のリガンドとなるウイルスDNA/RNAが含ま

れている。B細胞は、高密度かつ規則的に配列したエンベロープタンパク質をB細胞抗原受容体 (BCR) で認識し、BCRを介して取り込んだウイルス粒子内部のDNA/RNAをエンドソーム内、あるいは細胞質内のPRRを介して検知する。このように、B細胞はウイルスの2つの構造的特徴 (エンベロープ構造、DNA/RNA) を単独で認識することが可能である。興味深いことに、ナノ粒子内部にPRRリガンドを組み込んだ免疫原の使用により、B細胞の活性化と記憶応答を増強することに成功した例が近年報告された<sup>1)</sup>。この結果は、ウイルス粒子の構造的特徴をB細胞内在的に認識することが、その後のB細胞の分化・活性化、ならびにB細胞記憶の質的・量的な調節に重要である可能性を示唆する。

多くのウイルスは非リンパ器官から感染し増殖するため、感染初期においてB細胞がウイルス粒子構造を認識することは困難と考えられる。しかしながら、ウイルス感染後の非リンパ器官では異所性リンパ組織が形成され、ウイルス増殖近傍部位でのB細胞分化・活

#### [キーワード&略語]

記憶B細胞, インフルエンザウイルス, 肺, 胚中心

GC : germinal center (胚中心)

HEV : high endothelial venule (高内皮細静脈)

iBALT : induced bronchus-associated lymphoid tissue (誘導性気管支関連リンパ組織)

PRR : pattern recognition receptor (パターン認識受容体)

Memory B cell responses at the site of virus infection

Yoshimasa Takahashi/Taishi Onodera/Kazuo Kobayashi : National Institute of Infectious Diseases, Department of Immunology (国立感染症研究所免疫部)

性化が可能となる<sup>2)</sup>。本稿では、インフルエンザウイルス感染モデルを中心に、気道ウイルス感染後に感染局所で誘導される記憶B細胞応答に焦点を当て、二次リンパ器官で起こる記憶B細胞応答と比較しながら感染防御への役割について解説する。

## 1 インフルエンザウイルス感染に対する記憶B細胞の産生経路

### 1) 所属リンパ節でのB細胞分化

ウイルスは標的宿主細胞や増殖性、病原性の面で多種多様であり、すべてのウイルス感染に共通したB細胞応答について解説することは現時点で困難である。そのため、本稿では解析の進んでいるインフルエンザウイルスに着目し、このウイルスを気道感染させたマウスにおけるB細胞応答を中心に解説する。

経鼻接種されたインフルエンザウイルスは、主に気道上皮細胞に感染して増殖するが、ウイルス複製に必要な酵素の欠如から二次リンパ器官では増殖できない。そのため、初回感染後のウイルス抗原は、樹状細胞によって感染部位から二次リンパ器官に輸送され、ここでリンパ球の活性化が行われる(図1)<sup>3)</sup>。感染した樹状細胞は、細胞表面に感染ウイルス抗原を発現した状態で数日間生存可能である<sup>4)</sup>。ただし、濾胞樹状細胞が細胞表面に抗原を保持する場合は大きく異なり、感染した樹状細胞表面に発現する抗原は複製サイクル途中にあるウイルス抗原であり、ウイルス粒子の構造的特徴の多くは損なわれていると考えられる<sup>5)</sup>。この樹状細胞表面に発現したウイルス抗原をB細胞が認識し、活性化したB細胞の一部はB細胞濾胞内で胚中心(germinal center: GC)を形成する。胚中心におけるB細胞分化は抗体の親和性成熟を引き起こし、その結果、中和活性の向上したB細胞レパトアが記憶B細胞や長寿性プラズマ細胞プールに供給され、ウイルス再感染に備える。

このように、所属リンパ節で起こるB細胞分化は、主に樹状細胞上に発現したウイルス抗原断片により引き起こされるため、ウイルス粒子の構造上の特徴(高密度かつ規則的に配列されたB細胞エピトープとPRRリガンドの内在)をB細胞が認識することは困難であると予想され、タンパク質抗原の全身免疫後に誘導されるB細胞分化と類似する。また、所属リンパ節での

プラズマ細胞と胚中心B細胞の産生は迅速かつ多量であり、おそらくここがウイルス感染に対する主要な一次B細胞応答の場であると推察される<sup>6)7)</sup>。ただし、タンパク質抗原による全身免疫の場合と異なり、所属リンパ節の胚中心は感染後数カ月以上持続することが報告されており、この持続的な胚中心の形成が記憶B細胞に与える質的・量的な影響については今後の解析が待たれるところである<sup>7)</sup>。

### 2) 感染局所でのB細胞分化

感染初期のB細胞分化は所属リンパ節で起こる一方で、感染後1週間以上経過すると、肺でもリンパ組織が異所的に形成され、感染局所でのB細胞分化が可能となる<sup>2)</sup>。インフルエンザウイルス感染後、樹状細胞が肺の気管・血管周辺部に集積し、この樹状細胞を起点としてB細胞とT細胞が引き寄せられる<sup>8)</sup>。そして感染後10日までは、高内皮細静脈(high endothelial venule: HEV)周辺にB細胞濾胞やT細胞領域が備わったinduced bronchus-associated lymphoid tissue (iBALT)が発達し、少なくともこの構造は3カ月以上維持される<sup>9)</sup>。他のリンパ組織と同様、iBALTのB細胞濾胞には胚中心の形成が観察され、B細胞濾胞の辺縁部にはプラズマ細胞の集積が認められている<sup>2)10)</sup>。iBALTでの胚中心の形成は、所属リンパ節の胚中心に比べて数が少ないことや、体細胞突然変異の導入をはじめとした機能解析がいまだ不十分であることから、その正確な役割は不明である。これに対しiBALTへのプラズマ細胞の集積は感染後数カ月以上の長期間持続することから、肺におけるiBALTの形成と維持は、少なくともプラズマ細胞の定着に必要な微小環境を感染局所に提供するという面で重要と考えられる。実際、ジフテリア毒素を介して肺の樹状細胞を除去し、iBALT構造を破壊したマウスでは、肺のプラズマ細胞数が減少し気管内腔の中和抗体価が有意に低下する<sup>10)</sup>。このiBALTに長期間存在するプラズマ細胞が、骨髄に存在するプラズマ細胞と同様に長寿命であるかどうかは現時点で不明である。

## 2 記憶B細胞の定着部位

タンパク質抗原を免疫したマウスの解析から、脾臓内における記憶B細胞の定着部位が明らかにされつつある。しかしながら、気道ウイルス感染後に産生され

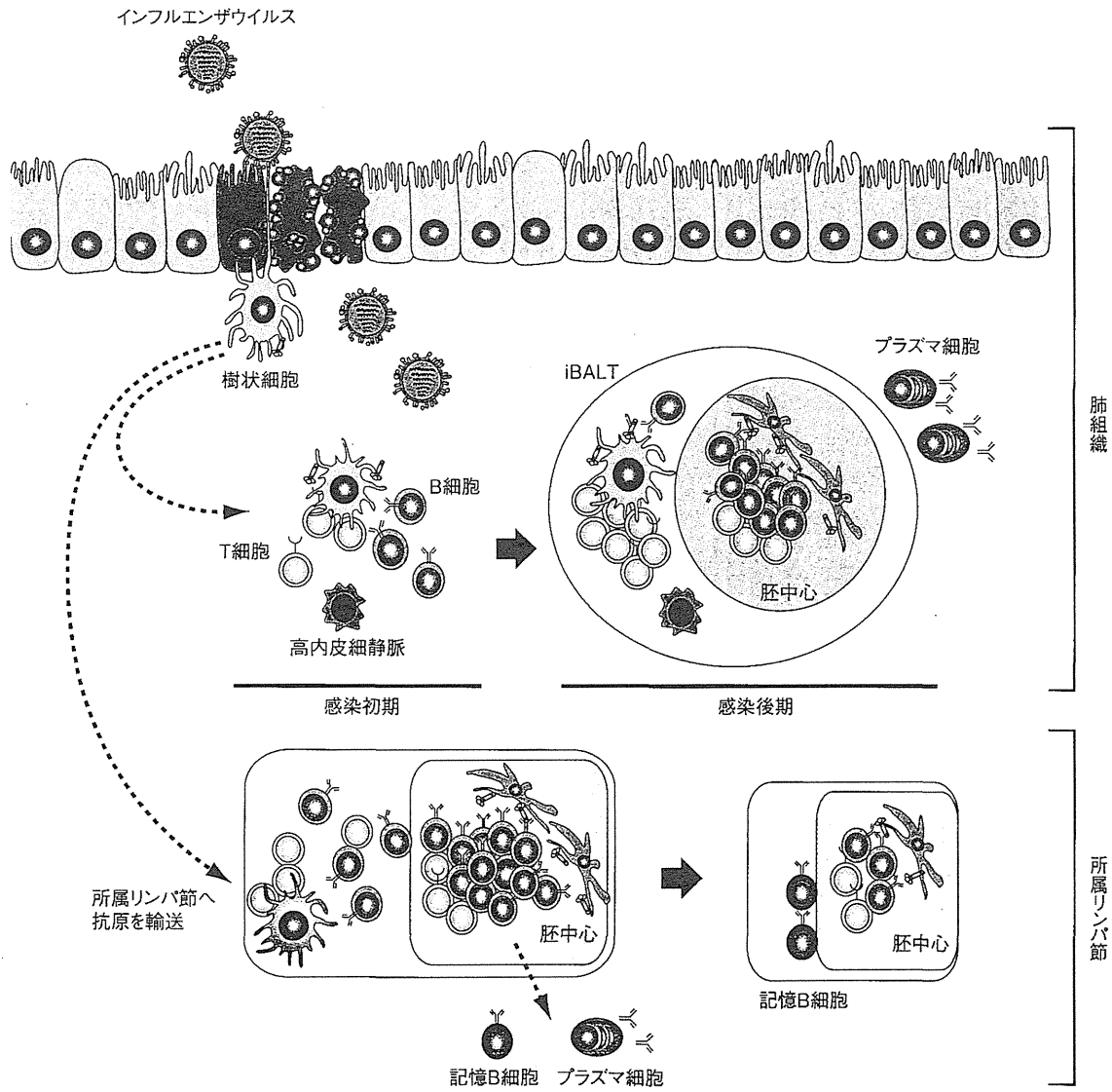


図1 インフルエンザウイルス初回感染後のB細胞分化部位  
 気道に感染したウイルス抗原は、所属リンパ節に運ばれてB細胞を活性化し、記憶B細胞やプラズマ細胞を産生する。その一方で、肺にiBALT (induced bronchus-associated lymphoid tissue) が形成され、この部位でのB細胞分化が可能となる (文献23を参考に作成)

た記憶B細胞の定着部位に関しては不明な点が多い。記憶T細胞の場合、脾臓、リンパ節、骨髄だけでなくウイルス感染部位である肺に定着し、二次リンパ器官と異なる表現型・機能を保持しながら感染防御に寄与することが証明されている<sup>11) 12)</sup>。また、CD8陽性記憶T細胞の少なくとも一部は、iBALT内に存在して再感染病原体への迅速な対応に備えていると考えられて

いる<sup>9)</sup>。これに対して記憶B細胞の場合、インフルエンザウイルス感染後の肺の細胞を*in vitro*でウイルス抗原とともに刺激するとプラズマ細胞が分化すること<sup>13)</sup>、さらに炎症性疾患を引き起こしたヒト肺組織の中に、ヒト記憶B細胞のマーカーであるCD27陽性B細胞が観察されることから<sup>14)</sup>、肺にも記憶B細胞が存在する可能性が指摘されているが、表現型の解析と*in*

vivoでの機能に即した直接的な証明は行われていない。

最近われわれは、インフルエンザウイルス感染後のマウスからウイルス特異的B細胞をフローサイトメトリーで純化・精製する実験系の確立に成功しており、表現型や再感染ウイルスに対する応答性、それに付随した感染防御能を細胞レベルで解析することが可能となった。その結果、インフルエンザウイルス感染後に、ウイルス特異的なB細胞が肺組織に出現し持続的に維持されることを確認している。このような感染局所におけるウイルス特異的な記憶B細胞の存在は、再感染したウイルス粒子の迅速な感知に役立つばかりでなく、記憶B細胞が感染局所においてウイルス粒子構造を直接認識することが可能となり、後述のような記憶B細胞活性化の制御にかかわることが予想される。

### 3 記憶B細胞の活性化と感染防御

#### 1) 感染局所での記憶B細胞の活性化

ウイルス初回感染後に産生された記憶B細胞は、プラズマ細胞と同様、肺において長期間維持されると考えられる。プラズマ細胞由来の抗体は、再感染したウイルスを速やかに中和することが可能であるが、再感染ウイルスの濃度が中和抗体のレベルを超えた場合には記憶B細胞が再活性化され、プラズマ細胞の迅速な補給が行われる。実際、インフルエンザウイルスを再感染したマウスの気道内腔において、中和抗体価の速やかな増加が観察されており、このことはウイルス再感染後に記憶B細胞が活性化し、プラズマ細胞を供給することを支持する<sup>10)</sup>。

感染局所である肺において、記憶B細胞がウイルス粒子構造を直接認識した場合、どのように再活性化されるのだろうか？ T細胞非依存的抗原で誘導されたIgM<sup>+</sup>記憶B細胞の場合を除き、クラススイッチした記憶B細胞が抗原依存的に再活性化する場合は記憶T細胞からのヘルパーシグナルを受けることが必要となる。しかしながら、記憶B細胞がウイルス粒子構造を認識した場合、クラススイッチした記憶B細胞であっても、T細胞非依存的に再活性化しプラズマ細胞に分化することが、サイトメガロウイルス (CMV) や水泡性口内炎ウイルス (VSV) の実験系で報告されている<sup>15) 16)</sup>。また、このT細胞非依存的な記憶B細胞の再活性化には、樹状細胞との相互作用も必要ではない<sup>17)</sup>。このこ

とから、記憶B細胞がウイルス粒子構造を直接認識した場合、他の細胞の介在を一切受けることなく、ウイルス粒子と記憶B細胞の接触のみでプラズマ細胞への分化に必要な活性化シグナルが伝達されると考えられる (図2)。このウイルス粒子による記憶B細胞の活性化は、抗原特異的T細胞や樹状細胞との相互作用を省略することにより迅速な中和抗体の産生を促すため、インフルエンザウイルスのような感染サイクルの短い急性ウイルス感染に対する防御反応ではメリットがあると考えられる。

#### 2) エフェクター機能

それでは、ウイルス粒子による記憶B細胞の直接的な活性化は、その後のエフェクター機能にいかなる質的な変化をもたらすのであろうか？ インフルエンザウイルス再感染後の気道内腔には、IgA抗体が高濃度で産生されることが報告されている<sup>10)</sup>。このIgA産生の増強は、T細胞や樹状細胞が産生するさまざまな液性因子が関与することに加え、ウイルス粒子による記憶B細胞の直接的な活性化が関与しているのかもしれない。実際、ヒト扁桃B細胞を用いた*in vitro*の解析から、ウイルスRNAはIgAクラススイッチを増強する作用のあることが報告されている<sup>18)</sup>。IgA抗体が同一の抗原特異性を有するIgGに比べてより高い結合親和性を示す例が報告されていることや<sup>19)</sup>、二量体の形成により単量体IgG抗体と比較して効率的なウイルス中和が可能なることから<sup>20)</sup>、気道局所でのIgA抗体産生の増強は感染防御により有効であると推察される。

さらに、細菌感染に対する一次B細胞応答のシステムではあるが、B細胞内在性のToll様受容体 (TLR) シグナルが、B細胞のインターロイキン-10 (IL-10) 産生を制御するという報告がされた<sup>21)</sup>。B細胞の産生するIL-10は、自己免疫疾患モデルにおいて抗炎症作用を示し、病態改善に関与していることはよく知られている。また、インフルエンザウイルス感染モデルにおいても、感染後の肺に分泌されるIL-10の抗炎症作用は過剰な炎症反応を抑制し、その結果、致死率を改善する可能性が指摘されており<sup>22)</sup>、ウイルスRNAがIL-10をはじめとした記憶B細胞由来のサイトカイン分泌にどのような影響を与えるのか、今後の解析が待たれるところである。

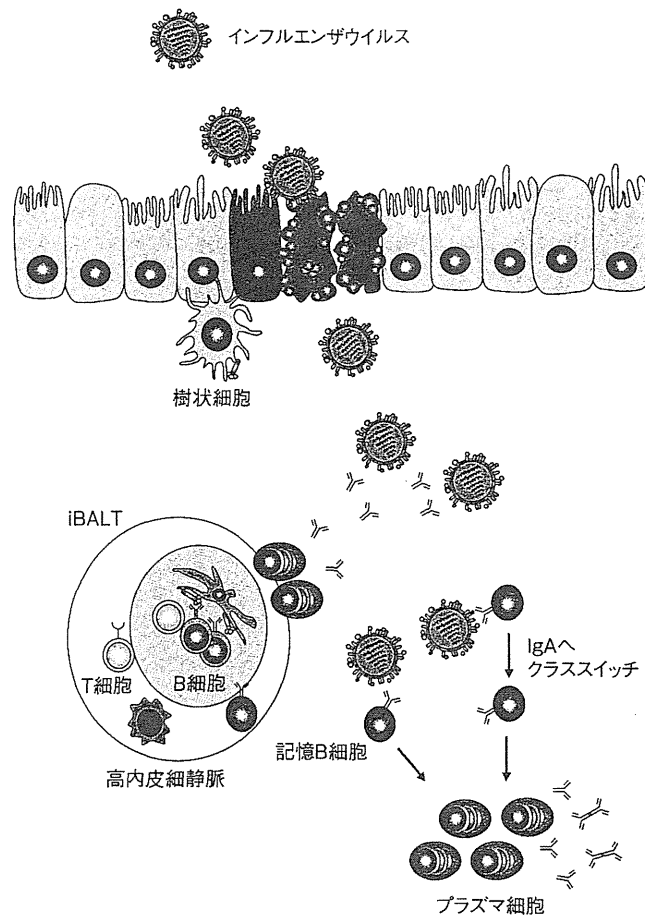


図2 再感染インフルエンザウイルスに対する記憶B細胞応答のモデル  
再感染したインフルエンザウイルスの抗原構造を感知し、肺の記憶B細胞は速やかにプラズマ細胞に分化すると考えられる

## おわりに

インフルエンザウイルスに代表される急性ウイルス感染症は、宿主に重篤・致死的な病態を誘発する可能性がある。そのため、ウイルス感染防御に重要なB細胞は、おそらく進化の過程でウイルス粒子構造の特徴(高密度B細胞エピトープと内在性DNA/RNA)をB細胞単独で認識して速やかに活性化する方法を獲得したのではなかろうか？さらに、ウイルス感染局所に記憶B細胞が定着し、迅速かつ直接的にウイルス構造を認識することによって、感染サイクルの短い急性ウイルス感染に対する速やかな応答を可能にすると同時に、より感染防御に有利なエフェクター機能を発現するの

かもしれない。

感染局所での記憶B細胞応答は、B細胞を取り巻く外的環境が他のリンパ組織と大きく異なり、これが記憶B細胞応答の質的・量的な差に繋がると考えられる。しかし、肺に存在する記憶B細胞は二次リンパ器官の記憶B細胞とは異なる表現型や機能を有し、抗原刺激に対してB細胞内在的にユニークな応答性を示す可能性も十分残されている。大変興味深いことに、ヒトの場合でも従来型の記憶B細胞と表現型の異なる新しい記憶B細胞サブセットが扁桃において見出されており、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)やマラリア感染者の末梢血中でこの細胞頻度が増加することから、感染免疫に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されてい



る。今後、感染局所に存在する記憶B細胞の表現型と機能解析を進めることにより、感染防御に必要な新しい記憶B細胞の姿が明らかになることを期待する。

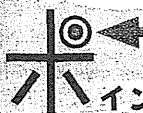
## 文献

- 1) Kasturi, S. P. et al. : Nature, 470 : 543-547, 2011
- 2) Moyron-Quiroz, J. E. et al. : Nat. Med., 10 : 927-934, 2004
- 3) McWilliam, A. S. et al. : J. Exp. Med., 179 : 1331-1336, 1994
- 4) Bender, A. et al. : Immunobiology, 198 : 552-567, 1998
- 5) Ludewig, B. et al. : Eur. J. Immunol., 30 : 185-196, 2000
- 6) Coro, E. S. et al. : J. Immunol., 176 : 4343-4351, 2006
- 7) Rothausler, K. & Baumgarth, N. : Eur. J. Immunol., 40 : 366-377, 2010
- 8) Halle, S. et al. : J. Exp. Med., 206 : 2593-2601, 2009
- 9) Moyron-Quiroz, J. E. et al. : Immunity, 25 : 643-654, 2006
- 10) GeurtsvanKessel, C. H. et al. : J. Exp. Med., 206 : 2339-2349, 2009
- 11) Masopust, D. et al. : Science, 291 : 2413-2417, 2001
- 12) Reinhardt, R. L. et al. : Nature, 410 : 101-105, 2001
- 13) Joo, H. M. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105 : 3485-3490, 2008
- 14) van der Strate, B. W. et al. : Am. J. Respir. Crit. Care Med., 173 : 751-758, 2006
- 15) Bachmann, M. F. et al. : Eur. J. Immunol., 25 : 3445-3451, 1995
- 16) Hebeis, B. J. et al. : J. Exp. Med., 199 : 593-602, 2004
- 17) Weisel, F. J. et al. : J. Immunol., 185 : 4011-4021, 2010
- 18) Xu, W. et al. : J. Immunol., 181 : 276-287, 2008
- 19) Shimoda, M. et al. : J. Exp. Med., 194 : 1597-1607, 2001
- 20) Renegar, K. B. et al. : J. Immunol., 173 : 1978-1986, 2004
- 21) Neves, P. et al. : Immunity, 33 : 777-790, 2010
- 22) Sun, J. et al. : Nat. Med., 15 : 277-284, 2009
- 23) Takahashi, Y. et al. : Infect. Disord. Drug Targets, in press

### <筆頭著者プロフィール>

高橋宜聖：1996年、東京大学農学系研究科博士課程修了。メリーランド大学に留学し、抗体親和性成熟のメカニズムに関する研究に従事する。その後、国立感染症研究所免疫部に着任し、記憶B細胞の生体内ダイナミクスとその制御機構に関して研究を進め、CD95 (Fas) やRasの関与を明らかにした。現在はワクチン応用を視野にいれ、ウイルス感染防御に必要な記憶B細胞サブセットの同定と、その機能解析に精力を注いでいる。

## 7

ウイルス感染症の血清診断は、  
HI 法, CF 法, NT 法, EIA 法  
どれがいいの？

- ポイント**
- ① ウイルス感染症診断のゴールドスタンダードは、病変部位からのウイルス分離である。
  - ② ウイルス感染症の血清診断に急性期 EIA-IgM 抗体の測定が有用である。
  - ③ 免疫状態の把握には、ウイルス感染症に応じた感度と特異度が高い測定方法を用いるべきである。

a ウイルス感染症実驗室診断の現状<sup>1)</sup>

- ウイルス感染症の診断には実驗室診断が必要である。
- ウイルス感染症実驗室診断のゴールドスタンダードは、病変部位からのウイルス分離である。目的とするウイルスによりウイルス分離に用いる細胞が異なるので、ウイルス分離を行うときは、目的とするウイルスを連絡すべきである。
- ウイルス分離が困難なときは、病変部位からのウイルス蛋白の検出やウイルス核酸検出が行われる。
- 病変組織が得られたときは、免疫染色によるウイルス蛋白の検出や電子顕微鏡検査によるウイルス粒子の検出などの方法がある。
- ウイルス分離やウイルス核酸検出が困難なときは、血清検査を用いて実驗室診断を行う。

## b 血清診断と抗体測定方法

- ウイルス抗体検査は、①ウイルス感染症の実驗室診断、②ウイルス感染症に対する免疫状態の把握、を目的として用いられる。ウイルス抗体測定方法の特徴を表 1 に示す<sup>1)</sup>。
- 急性期 IgM 抗体の検出または、IgG 抗体の陽転化または有意上昇があると、実驗室的に確定診断される。酵素免疫法 (EIA) が開発されるまでは IgM 抗体の測定が困難であったが、現在は多種類のウイルス IgM 抗体が、コマーシャルラボで EIA を用いて測定が可能となっている。
- 麻疹、水痘などでは発症早期には IgM 抗体が時に陰性のことがあるので、臨床症状から麻疹や水痘が疑われるときは、発症 3 日後以降に再検査することが大切である。
- IgG 抗体の陽転化または有意上昇は、急性期の血清と発症後 2 週間以上あけた回復期の

**表1** ウイルス抗体測定方法の特徴

測定方法	長 所	短 所
中和法 (NT)	<ul style="list-style-type: none"> <li>抗体測定方法のゴールドスタンダード</li> <li>感染防御抗体を測定</li> <li>型特異性が高い</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>培養細胞とウイルスが必要</li> <li>時間と手間がかかる</li> <li>スクリーニングに向かない</li> </ul>
酵素免疫法 (EIA)	<ul style="list-style-type: none"> <li>IgM 抗体と IgG 抗体が測定可能</li> <li>感度と特異性が高い</li> <li>比較的操作简单</li> <li>大量の検体処理が可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>保険点数が高い</li> <li>感染防御抗体を測定していない</li> <li>有意上昇の定義が未確定</li> </ul>
赤血球凝集抑制法 (HI)	<ul style="list-style-type: none"> <li>型特異性がある</li> <li>比較的手技が簡単</li> <li>感染防御抗体を検出<sup>†</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>適切な赤血球の準備が必要*</li> <li>感度は NT よりも劣る</li> <li>赤血球凝集能をもつウイルスのみ測定可能</li> </ul>
補体結合法 (CF)	<ul style="list-style-type: none"> <li>すべてのウイルスで測定可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>比較的早期に抗体が消失</li> <li>感度, 特異度が比較的低い</li> </ul>

(文献1より一部改変)

\*測定するウイルスにより用いる赤血球の種類が異なる, 用いる赤血球によって感度が異なる

<sup>†</sup>ウイルスの種類により異なる, 感染防御抗体測定の基本は NT 法である

**表2** 免疫状態を確認するための抗体測定方法とワクチン接種基準

	測定方法	単位	陽性閾値	ワクチン接種基準*
麻 疹	NT	倍	≥ 2	≤ 2
	EIA	EIA 価	≥ 4.0	< 4.0
	PA	倍	≤ 16	≤ 128
風 疹	HI	倍	≥ 8	≤ 8
	EIA	EIA 価	≥ 4.0	< 4.0
	LA	IU/mL	≥ 10	< 10
水 痘	IAHA	倍	≥ 2	≤ 2
	EIA	EIA 価	≥ 4.0	< 4.0
	皮内テスト	mm	≥ 5	< 5
ムンプス	EIA	EIA 価	≥ 4.0	< 4.0

(文献2より一部改変)

NT: 中和法, EIA: 酵素免疫法, PA: 粒子凝集法, HI: 赤血球凝集抑制法, LA: ラテックス凝集法, IAHA: 免疫付着赤血球凝集法

\* 95% 以上の人の発症を予防する抗体価

血清を採取し, 中和法 (NT 法), 赤血球凝集抑制法 (HI 法), 補体結合法 (CF 法), EIA 法などで測定する。急性期と回復期を同じ方法で測定し, 測定誤差以上の抗体価上昇を認めたととき有意上昇と判定する。NT 法, HI 法, CF 法の有意上昇は 2 管 (4 倍) 以上の, EIA では 2 倍以上の上昇である。再感染 (带状疱疹を含む) やワクチン不全では発症早期に血清抗体価がすでに上昇しかけている例があるので, 症状がない抗体陽性者の抗体レベルと比較することが大切である。

- 免疫状態の把握に用いる血清抗体測定方法は, 感度と特異度が高い方法を用いるべきであり, CF は用いるべきでない<sup>2)</sup>。麻疹, 風疹, 水痘, ムンプスの免疫状態を確認するための抗体測定方法とワクチン接種基準を表 2 に示した。なお, この接種基準は一般の生活を送っている人において, 95% 以上の人の感染を予防する基準である。

- ☐ ウイルス感染の予防には液性免疫だけではなく細胞性免疫，粘膜免疫も関与しているので，基準以下の抗体価でも発症を免れる人は存在する<sup>3)</sup>



### ミニ知識「免疫に関与する細胞」

感染症の免疫に関与する細胞として，免疫ナイーブ細胞，免疫記憶細胞，免疫実行細胞がある。免疫実行細胞のプラズマ細胞が抗体を産生し，CD8<sup>+</sup>細胞がキラーT細胞として働く<sup>3)</sup>。一度誘導された免疫記憶細胞は消失することはないが，免疫実行細胞は刺激がないと減少し，抗体価が検出されなくなることがある。



### ここが落とし穴！

● 抗体価の有意上昇とは測定誤差以上の上昇であり，NT法，HI法，PA法では4倍以上，EIA法，LA法では2倍以上である。

● ワクチン接種前の抗体価が陰性のときは，免疫記憶細胞が誘導されていないか，誘導されていても抗体価が検出されないかである。1回の接種で抗体価の上昇がみられれば，二次免疫応答であり，免疫記憶があったと判断できる。1回の接種で抗体価の上昇がないときは，免疫記憶が誘導されていない状態である。

### 📖 文 献

- 1) 庵原俊昭：小児科診療 68：1992-1999, 2005
- 2) 庵原俊昭：臨床検査 53：1318-1321, 2009
- 3) Plotkin SA：Clin Infect Dis 47：401-409, 2008

## D

## 小児感染症の診断

## 1 ▶ 概念

宿主に病原体が感染した状態、イコール感染症ではない。生きた病原体が宿主に侵入、または皮膚や粘膜表面で増殖している状態は感染であり、病原体が感染した部位や血液に運ばれてほかの部位で増殖し、宿主に臨床症状を出現させた状態が感染症である。

臨床症状は、病原体の宿主への直接侵襲と、侵入した病原体に対する宿主の免疫反応から形成される。病原体の種類や宿主の免疫状態により、臨床症状の主たる要因が異なっている。免疫不全者における麻疹肺炎や麻疹脳炎は麻疹ウイルスの直接侵襲による組織傷害であり、免疫健全者における麻疹脳炎は免疫反応による二次性脳炎である。病原体の直接侵襲による臨床症状が主体の時は抗菌薬や抗ウイルス薬などの病原体の増殖を抑制する薬剤を用い、宿主の免疫反応が主体の時はステロイドなどの抗炎症薬による治療を考慮する。

感染症の診断はまず臨床症状から行い、その原因病原体が細菌なのかウイルスなのかを一般検査で判定し、病巣部位からの病原体検出によって確定診断する。病巣部位からの病原体検出が困難な時は、抗原検査や抗体検査が診断の助けとなる。

## 2 ▶ 臨床診断

歴史上、病気の診断は臨床症状からつけられており(症候群)、麻疹と風疹、天然痘と水痘のように類似の臨床症状を呈する疾患は同一の疾患と考えられていた。その後、微生物学、病理学、臨床医学の進歩とともに、それぞれの疾患を引き起こす病原体が発見され、病原体が同定された感染症では、病原体の感染によって引き起こされる臨床症状として感染症が理解され、診断されるようになった。

一方、咽頭炎や中耳炎のように病原体が異なっても類似の臨床症状を呈する疾患群があり、これらの疾患群では病原体による診断よりも、傷害された臓器ごとの診断名が現在も用いられている。細菌感染でもウイルス感染でも類似の症状が出現する疾患群では、適切な治療薬を選択するにあたり、一般検査や原因検査が必要である。ウイルス感染と診断した時は、原則、抗菌薬は用いない。

臨床症状により感染症の診断を行う時は、地域の流行状況、家族や集団生活の場での接触歴、各感染症の潜伏期間が、また、ワクチン予防可能疾患では予防接種歴が診断の参考になる。風疹の流行がない時の発疹性疾患に対して風疹と診断する時や、ムンプスの流行がない時の急性耳下腺腫脹例に対してムンプスと診断する時は、ウイルス学的な検討が必要である。

下痢症の原因を考える時は便性が有用である。膿粘血便の時は細菌感染症によるものであり、水様便の時はウイルス性か細菌毒素による下痢症である。下痢症の起因病原体を診断する時は、食べたものを確認する。卵料理とサルモネラ菌、鶏肉とカンピロバクター、牛肉と腸管出血性大腸菌(O157など)、魚介類と腸炎ビブリオ、カキなどの二枚貝とノロウイルスやA型肝炎ウイルスなどがある。10年前にはイカ菓子とサルモネラ菌感染が日本中で話題になった。また、ミドリガメなどの爬虫類からのサルモネラ菌感染も注意すべきである。

## 3 ▶ 一般検査診断

感染症の診断に参考となる一般検査は、白血球数、血液像、C反応性蛋白(CRP)である。細菌感染症では、好中球左方移動を伴う好中球優位の白血球数増多があり、CRPが中等度( $\geq 4$  mg/dL)

以上の陽性を示す。新生児や乳児では、重症の細菌感染症に罹患すると時に白血球数の減少を認めることがあるが、血液像は好中球の左方移動を伴う好中球優位である。細菌感染症ではマクロファージが活性化されており、IL-6やIL-8などのマクロファージ関連サイトカインが上昇する。なお、細菌感染の発症からCRP陽性になるまでに数時間要するため、感染症早期ではCRPが低値を示すことがある。

マイコプラズマ感染では、白血球数は正常かやや増加するが、血液像は好中球の左方移動を伴う好中球優位のパターンである。CRPは弱陽性である。百日咳ではリンパ球優位の白血球増多となる。

一般に軽症のウイルス感染症では白血球数は正常であり、麻疹やインフルエンザなどの高熱を伴う重症ウイルス感染症では白血球数は減少する。ウイルス感染に伴うインターフェロン $\gamma$  (IFN $\gamma$ )による骨髄抑制や白血球アポトーシスの関与が示唆されている。なお、呼吸器アデノウイルス感染症では、好中球優位の白血球増多があり、CRPも高値を示す。

細菌感染を繰り返す場合は、基礎疾患の有無を検討する。ブドウ球菌や大腸菌などのカタラーゼ非産生菌による感染を繰り返す場合は慢性肉芽腫症(CGD)を疑い、好中球の活性酸素産生能を検査する。細菌性中耳炎を繰り返す場合は、肺炎球菌やインフルエンザ菌などの莢膜多糖体に対する抗体産生(IgG 2分画)能が遅延または低下している危険性があり、IgG 2分画を検査する。IgG 2欠損はまれで、多くは抗体産生能の遅延であり、4歳頃には改善する。マクロファージの細胞内殺菌能が低下していると、サルモネラ菌、リステリア菌、結核菌、BCG菌、非結核性抗酸菌などの細胞内寄生菌感染が重症化する。CGD以外にもマクロファージを活性化させるT細胞系やIL-12-IFN $\gamma$ 系の異常に注意する。

ポリオウイルス、日本脳炎ウイルスなどの細胞融解性が強く血漿中にフリーウイルスが多く存在するウイルス感染症では、B細胞機能低下時に重症化する。一方、麻疹ウイルス、水痘帯状疱疹ウ

イルス(varicella-zoster virus; VZV)などの細胞親和性が強いウイルスでは、T細胞機能が低下していると重症化する。また、ナチュラルキラー(NK)細胞機能が低下しているとEBウイルス(Epstein-Barr virus; EBV)感染が重症化する。各種感染症が重症化する場合は、基礎疾患の有無を検索することが大切である。

#### 4 ▶ 病原診断(分離同定, 迅速診断)

病原体を診断する方法として、感染病巣から細菌やウイルスを分離する方法、迅速診断法を用いて細菌蛋白やウイルス蛋白を検出する方法、ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR)法やloop-mediated isothermal amplification (LAMP)法などの遺伝子工学手法を用いて細菌遺伝子やウイルス遺伝子を検出する方法などがある<sup>1-3)</sup>。感染症診断のgold standardは感染病巣からの病原体の分離同定である。細菌培養においては、培養検査前に抗菌薬が投与されていると、目的とする細菌が培養されない危険性がある。

感染病巣から細菌やウイルスを分離する際には、適切な部位から適切な方法でサンプルを採取し、適切な方法と温度でサンプルを移送し、適切な培地や培養細胞にサンプルを接種することが大切である<sup>1, 2)</sup>。目的とする細菌やウイルスに応じて使用する培地や培養細胞が異なっている。適切な培養結果を得るためには、患者の背景や病態を検査室(検査機関)に伝えるとともに、症状から疑っている病原体をコメントすることも大切である。臨床症状から原因病原体としての頻度が高い細菌やウイルスを表1, 2に示した。なお、肺炎、骨髄炎、関節炎、髄膜炎の起因菌診断には、血液培養が有用である。感染病巣以外から分離された細菌やウイルスの意味づけについては、その感染症の病態や臨床検査結果などを加味し、総合的に判断する。特にヘルペス群ウイルスのように持続感染しているウイルスが検出された時は、分離結果を慎重に評価する必要がある。

培養、迅速診断にかかわらず、上気道感染症の病原体を採取する際には、鼻咽頭(後鼻腔)からの

表 1 ▶ 感染症の病態と起因病原体細菌

1) 局所で増殖して発症	
中耳炎・乳様突起炎	肺炎球菌, インフルエンザ菌, モラクセラ菌, A 群レンサ球菌
上気道感染症	インフルエンザ菌, 肺炎球菌, モラクセラ菌, $\beta$ レンサ球菌
下気道感染症	インフルエンザ菌, 肺炎球菌, マイコプラズマ, 肺炎クラミジア
消化器感染症	病原性大腸菌, カンピロバクター, サルモネラ菌
尿路感染症	大腸菌
皮膚軟部組織感染症	ブドウ球菌, A 群レンサ球菌
生殖器感染症	クラミジア, 淋菌
2) 局所での増殖と産生された毒素により発症	
呼吸器感染症	百日咳菌, シフテリア菌, $\beta$ レンサ球菌
消化器感染症	毒素原性大腸菌(O157 など)
皮膚軟部組織感染症	破傷風, 劇症型レンサ球菌
3) 菌血症(敗血症)により運ばれた発症	
髄膜炎	インフルエンザ菌 b 型, 肺炎球菌, 髄膜炎菌, B 群レンサ球菌, 大腸菌, リステリア菌
骨髄炎・関節炎	ブドウ球菌, 肺炎球菌, インフルエンザ菌, サルモネラ菌
感染性心内膜炎	a レンサ球菌

表 2 ▶ 感染症の病態と起因病原体ウイルス

1) 局所で増殖して発症	
呼吸器感染症	インフルエンザウイルス, RS ウイルス, パラインフルエンザウイルス, ライノウイルス, アデノウイルス, メタニューモウイルス, コロナウイルス,
消化器感染症	ロタウイルス, 腸管アデノウイルス, ノロウイルス, サボウイルス, アストロウイルス, エンテロウイルス
粘膜感染症	HSV, アデノウイルス, エンテロウイルス,
生殖器感染症	HSV, パピローマウイルス
2) 局所での増殖とウイルス血症により運ばれて発症	
髄膜炎	エンテロウイルス, ポリオウイルス, ムンプスウイルス
肝 炎	A 型肝炎ウイルス, E 型肝炎ウイルス
3) ウイルス血症により運ばれて発症	
発疹性感染症	麻疹ウイルス, 風疹ウイルス, VZV, HHV-6, HHV-7, パルボウイルス B19
肝 炎	B 型肝炎ウイルス, C 型肝炎ウイルス
脳 炎	エンテロウイルス, ムンプスウイルス, 日本脳炎ウイルス
その他	ムンプスウイルス, CMV, EBV, HIV

HSV: 単純ヘルペスウイルス, VZV: 水痘帯状疱疹ウイルス, HHV-6: ヒトヘルペスウイルス 6 型, HHV-7: ヒトヘルペスウイルス 7 型, CMV: サイトメガロウイルス, EBV: EB ウイルス, HIV: ヒト免疫不全ウイルス

サンプル採取が優れている。耳鼻科用綿棒を用いて鼻前庭より挿入し、鼻咽頭に軽く突き当たった後、綿棒を回しながらサンプルを採取する。生理食塩水を用いて、鼻咽頭を洗浄後に吸引して採取する方法もある。

成人や高齢者では尿中肺炎球菌迅速検査が肺炎球菌感染症の診断に有用であるが、6歳以下の幼児では繰り返し肺炎球菌の感染を受けているため、診断的価値は低下する。髄膜炎起因菌の迅速

診断検査は、グラム染色検査と併せ起因菌の早期同定に有用な検査である。適切な抗菌薬早期使用の指標となる。

迅速診断の感度がよくなると、検出された病原体の臨床への関わりについて判断することが大切である。同じ病原体が感染しても、ホストの免疫状態により様々なレベルの臨床症状が出現する。インフルエンザウイルス感染時、迅速診断によりウイルス蛋白が検出されたとしても、インフルエ



ンザ様症状を呈する例や普通感冒症状を呈する例がある。

### 5 ▶ 抗体診断

多くのウイルス感染症や百日咳、マイコプラズマ、クラミジアなどの一部の細菌感染症では、抗体検査が診断に有用である。マイコプラズマでは血中 IgM 抗体の迅速診断キットが市販され臨床に用いられている。クラミジアでは IgA 抗体測定が活動性感染の診断に有用である。百日咳では、DPT ワクチンを受けていない場合は、百日咳様症状があり、流行株、ワクチン株にかかわらず凝集反応が陽性を示す場合は、百日咳と診断する。DPT ワクチンを受けている場合は、凝集反応が高値の場合は診断に有用である。

抗体検査でウイルス感染症を診断する方法として、①IgM 抗体を検出する、②抗体の有意上昇を確認する、の二種類の方法がある。IgM 抗体は主として酵素免疫測定(enzyme immunoassay : EIA)法で測定する。抗体の有意上昇とは、急性期に採取した血清と急性期から 2~4 週間経過した回復期に採取した血清の抗体価を同じ方法で測定し、測定誤差以上〔赤血球凝集抑制試験(hemagglutination inhibition test : HI)や中和試験(neutralization test : NT)では 2 管(4 倍)以上〕の抗体上昇を示すことである。EIA 法での測定誤差以上の上昇とは

EIA 価 2 倍以上の上昇である。EIA 法での有意上昇の定義は確立されていないが、2 倍以上の抗体価上昇または、HI 試験などと同様に 4 倍以上の抗体価上昇が用いられている。

ウイルス性髄膜炎や脳炎などの診断には、血清と同時に髄液のウイルス抗体価を測定する。血液髄液関門の破綻による血清 IgG の流入を除外するために、抗体インデックス〔=(髄液ウイルス抗体 / 血清ウイルス抗体価) ÷ (髄液 IgG / 血清 IgG)〕が用いられる。インデックスが 2 を超えると、そのウイルスが中枢神経系に感染している根拠となる。

血清抗体測定は、病原体に対する免疫状態を調べる時にも用いられる。この時には補体結合反応検査(complement fixation reaction test ; CF test)を原則用いない。主なウイルスに対する適切な抗体測定方法を表 3 に示した<sup>2)</sup>。EIA 法は他の測定方法に比べ検査費用が高価である。

血清抗体の陽性レベルと感染予防レベル、発症予防レベルは一致しない。感染曝露前後やワクチン接種前後の抗体レベルの変動から、血清抗体レベルには、高い方から、①感染を受けないレベル(感染予防レベル)、②感染を受けて抗体価は上昇するが発症しないレベル(発症予防レベル)、③感染を受けて発症するが軽症の経過をとり(修飾感染)、抗体価も上昇するレベル、④感染を受けて発症し通常の臨床経過を示し、抗体価が上昇する

表 3 ▶ 目的に応じて選択するウイルス抗体検査法

感染症	免疫の有無	感染の診断	
		シングル血清	ペア血清*
麻疹	NT, EIA-IgG, PA	EIA-gM	HI, NT, EIA-IgG
VZV	IAHA, EIA-IgG	EIA-IgM	IAHA, EIA-IgG
ムンプス	EIA-IgG	EIA-IgM	HI, NT, EIA-IgG
風疹	HI, EIA-IgG	EIA-IgM	HI, EIA-IgG
EB ウイルス	EBNA, VCA-IgG	EADR, VCA-IgM	VCA-IgG
CMV	EIA-IgG, FA-IgG	EIA-IgM, FA-IgM	EIA-IgG, FA-IgG
インフルエンザ	HI		HI
日本脳炎	HI, NT		HI

VZV : 水痘帯状疱疹ウイルス, CMV : サイトメガロウイルス

NT : 中和試験, EIA : 酵素免疫測定法, PA : 粒子凝集法, HI : 赤血球凝集抑制法, IAHA : 免疫付着赤血球凝集法, FA : 蛍光抗体法, EBNA : EB ウイルス核抗原, VCA : ウイルスカプシド抗原, EA : 早期抗原

\* : 急性期血清抗体価と回復期(発症 2~4 週後)血清抗体価の有意上昇



表4▶ 代表的なワクチン予防可能疾患の発症予防抗体価

感染症	抗体測定方法	必要な抗体価
シフテリア	中和	0.01~0.1 IU/mL
百日咳	EIA (PT)	5 単位
破傷風	中和	0.1 IU/mL
Hib	EIA	0.15 µg/mL
肺炎球菌	EIA opsonophagocytosis	0.20~0.35 µg/mL(小児) 8 倍
麻疹	マイクロ中和	120 mIU/mL
風疹	免疫沈降	10~15 IU/mL
ムンプス		未確定
水痘	FAMA	64 倍
	gp ELISA	5IU/mL
ポリオ	中和	4~8 倍
日本脳炎	中和	10 倍
インフルエンザ	HI	40 倍
A型肝炎	EIA	10 mIU/mL
B型肝炎	EIA	10 mIU/mL
狂犬病	中和	0.5 IU/mL
ロタウイルス		未確定
黄熱	中和	5 倍

(文献5より一部改編して引用)

EIA：酵素免疫法，HI：赤血球凝集抑制法，PT：百日咳毒素，FAMA：膜抗原蛍光抗体法，gp：糖蛋白，ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay (酵素免疫測定法)

\*発症予防に直接かかわる抗体は中和抗体と opsonophagocytosis 抗体である。

レベルの4段階がある。通常の臨床症状が出現する抗体レベルは陰性である。麻疹と風疹では感染予防レベルと発症予防レベルが同定されている<sup>4)</sup>。代表的なワクチン予防可能疾患の多くの人の発症予防レベルを表4に示した<sup>5)</sup>。なお、暴露量が多い時は発症予防により高い抗体価が必要であり、一方、発症予防には液性免疫だけではなく、細胞性免疫、粘膜免疫が働くため、この値より低くても発症予防が可能な場合がある。

インフルエンザにおいてHI抗体40倍では、発症予防率は50%であり、抗体価が上昇するにつれ発症予防率は上昇し、発症したとしても軽症化する。また、パリピズマブの臨床効果から、同じ局所性ウイルス感染症であるRSウイルスにおいても、高い血中抗体価を有していると軽症化する。

## 文献

- 1) 満田年宏：細菌培養検査；起因菌の同定と汚染菌との鑑別。小児内科 2005; 37: s472-s477.
- 2) 庵原俊昭：ウイルス感染症の診断。小児科診療 2005; 68: 1992-1999.
- 3) 斎藤義弘：ウイルス分離，PCR，ウイルス抗体価の利用法。小児内科 2005; 37: 42-47.
- 4) 庵原俊昭：麻疹・風疹・ムンプス(流行性耳下腺炎)・水痘感染対策：抗体測定とその評価。CAMPUS HEALTH 2008; 45: 9-14.
- 5) Plotkin SA: Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17: 1055-1065.

国立病院機構三重病院小児科 庵原俊昭

# 新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による 単純ヘルペスウイルスの検出

Detection of *herpes simplex virus* DNA by the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method combined with a novel nucleic acid extraction method : “Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE)”

東出誠司 <sup>1)</sup>	保坂憲光 <sup>1)</sup>	太田嘉則 <sup>1)</sup>
Satoshi HIGASHIDE	Norimitsu HOSAKA	Yoshinori OTA
川名 尚 <sup>2)</sup>	西澤美香 <sup>2)</sup>	神田秀俊 <sup>1)</sup>
Takashi KAWANA	Mika NISHIZAWA	Hidetoshi KANDA

性器の単純ヘルペスウイルス (HSV-1、HSV-2) 感染の検出と型判別のために、新規核酸抽出法 Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE 法) と LAMP 法を組み合わせた新しい核酸検出系 PURE-LAMP 法を構築したので報告する。

PURE 法によりピペット操作や遠心操作を行う必要なく、検体ぬぐい液から核酸を抽出し、その抽出液で乾燥状態の LAMP 試薬を溶解し増幅を行うことで目的遺伝子の検出と型判別が 1 時間以内で完了した。ウイルス培養法と比較した結果、新鮮分離株を用いた検出感度では PURE-LAMP 法の方が高感度であった。また、臨床検体 15 検体を用いて特異性についても比較したところ結果は一致した。

PURE-LAMP 法はウイルス分離培養法よりも感度が高く型判別が可能であり、検出までの時間を大幅に短縮できる優れた検査方法であると考えられる。

We report a novel nucleic acid detection/typing system for herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2), using a combination of a nucleic acid isolation method, namely Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE), and the loop-mediated amplification (LAMP) method (PURE-LAMP). Virus nucleic acid was extracted from a swab specimen by the PURE method, and the extract was directly applied to a dry-up LAMP reagent. The whole process from sample preparation to gene amplification and detection/typing was completed within one hour. In a sensitivity study using freshly isolated herpes simplex virus, the sensitivity of the PURE-LAMP method was slightly higher than that of the viral culture. When this system was applied to 15 clinical specimens, which consisted of 5 HSV-1 positive, 5 HSV-2 positive and 5 negative specimens, the results completely agreed with those of the viral culture. From a clinical point of view, the PURE-LAMP method is thought to be very useful, because it is a simple procedure, and results can be obtained in a short time.

*Key words* : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE), Genital Herpes, Herpes simplex virus type 1 and type 2

1) 栄研化学株式会社生物化学研究所 : Biochemical Research Laboratory, Eiken Chemical CO., LTD.

2) 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科 : Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University Faculty of Medicine Mizonokuchi Hospital

平成22年3月10日受付、平成22年4月7日掲載決定

(〒329-0114) 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社生物化学研究所 東出誠司

緒言

性器ヘルペスウイルス感染症患者数は STD の定点把握の一つとして 2006 年まで増加傾向にあり、有効な抗ヘルペスウイルス薬があるため臨床的に正確な診断が必要とされている<sup>1)</sup>。治療には、原因ウイルスである単純ヘルペスウイルス (HSV) の検出だけでなく型判別が再発の予後を推定する上で重要である<sup>2)</sup>。診断には蛍光抗体法やウイルス分離培養法などが用いられているが、蛍光抗体法は感度が低くウイルス分離培養法は時間を要するため実際に適用できる症例は限られている。そのため、短時間での検出が可能で検出感度と特異性が高い遺伝子検査が有効と考えられ、PCR 法や LAMP 法<sup>3)</sup>による検出系とその有用性が報告されてきた<sup>4-7)</sup>。しかし、遺伝子検査は煩雑な核酸の抽出・精製工程が必要であり、そのことが検査の簡易・迅速化の障害となり臨床現場での実用化が困難であった。

そこでわれわれは、簡易な核酸抽出法である Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE 法：栄研化学

森ら 論文投稿中)と、迅速で特異性の高い LAMP 法とを組み合わせ、ピペット操作が不要で簡易且つ迅速な HSV-1 と HSV-2 の遺伝子検出および型判別系を構築したので報告する。

対象と方法

1. 検体からの核酸抽出—PURE 法—

PURE 法は、専用容器を用いることにより、従来の遺伝子抽出・精製に必要とされた煩雑なピペット操作や高速遠心分離操作を行わずに、簡易且つ迅速に核酸を抽出できるように開発された核酸抽出法である。

抽出操作は、アルカリ変性剤を含む前処理容器に検体を添加してウイルスを溶解させた後、ウイルス溶解液を吸着剤入りチューブに添加して攪拌し、LAMP 反応阻害物を吸着剤に吸着させた。その吸着剤入りチューブの側面を押すことにより、乾燥した剤型の LAMP 法試薬(以下、LAMP 乾燥試薬)を含む反応チューブに直接、核酸抽出液を滴下した (Fig. 1)。

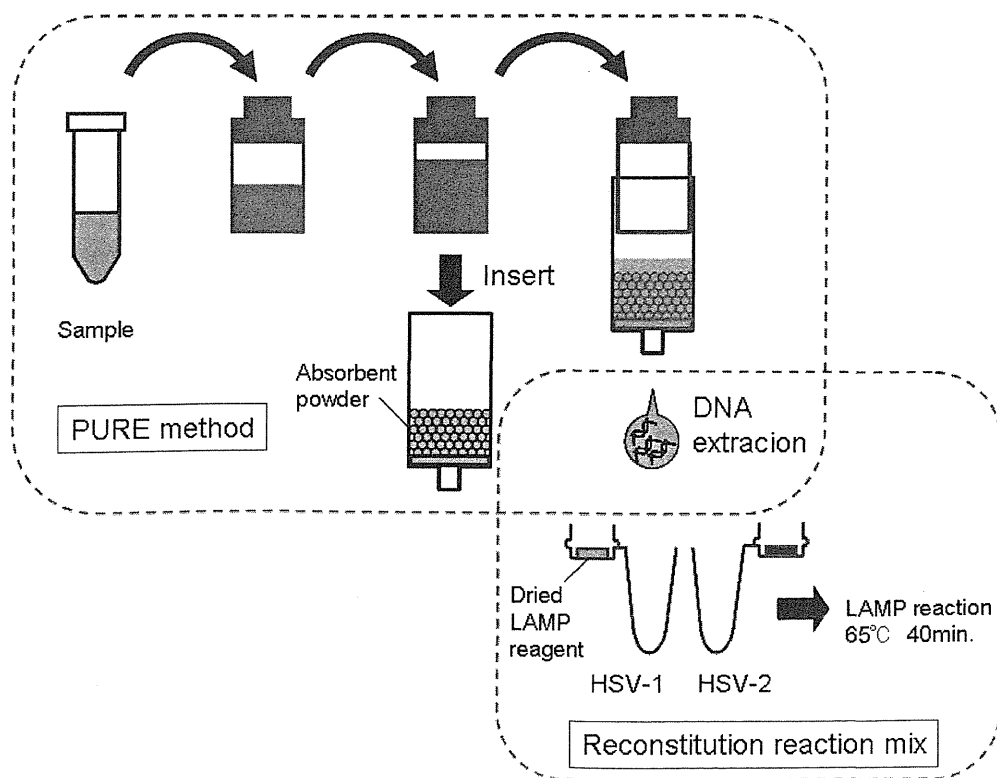


Fig. 1 Schematic diagram illustrating the PURE & LAMP procedure

また、PURE 法の阻害物除去効果を確認するため、核酸抽出を行わずに検体を精製水で 6 倍希釈し直接 LAMP 試薬に添加する方法と比較した (Direct-LAMP 法)。

## 2. LAMP プライマー

HSV-1 検出用プライマーは、US4 遺伝子領域を標的遺伝子として設計を行った。また、HSV-2 検出用プライマーは、UL10 遺伝子領域を標的遺伝子として設計を行った。プライマーはすべて Primer Explorer Ver. 4.0<sup>®</sup> を用いて設計した。

## 3. LAMP 乾燥試薬

LAMP 乾燥試薬は、HSV-1 又は HSV-2 検出用プライマー、基質および酵素を含む LAMP 試薬を、反応チューブの蓋部分で乾燥を行い付着させた。LAMP 乾燥試薬の溶解は、PURE 法によって調製された核酸抽出液を、吸着剤入りチューブから直接 30 $\mu$ l 滴下して行った。滴下量については、乾燥試薬の付着したチューブについているラインを目安にすることで定量的に行うことが可能である。

## 4. LAMP 反応条件と陽性判定基準

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス社) を用い、65 $^{\circ}$ C で 40 分間反応した。判定は、遺伝子増幅による 0.1 以上の濁度上昇が認められた場合を陽性とし、検出された時間を Tt (Threshold time) 値とした<sup>9)</sup>。

## 5. 感度試験

LAMP 法の感度試験には、HSV-1/2 検出系ともに標的遺伝子領域を挿入したプラスミド DNA を用い、その希釈液で乾燥試薬を溶解して 6 重測定し検出限界を測定した。

また、新鮮分離 29 株 (HSV-1 15 株、HSV-2 14 株) の 10 倍希釈系列を作製し、ウイルス培養法との感度比較についても併せて行った。ウイルス培養法は、新鮮分離株の希釈系列を R-66 細胞に 4 ウェルずつ接種して 37 $^{\circ}$ C 5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行い、細胞に変性が認められた場合 (CPE: cytopathic effect)、陽性と判定した。ウイルス培養法では 4 ウェルすべてに CPE が認められたものを (+)、1~3 ウェルの場合 (±)、未検出を (-)

とした。LAMP 法は、培養法と同一ウイルス量となるように調製したウイルス希釈液を用い、PURE 法にて抽出後、乾燥試薬にて測定を行った。100%の検出率を (+)、100%に満たない検出を (±)、未検出を (-) とした。

## 6. 臨床検体測定

子宮頸管と外陰部の病変部から採取したぬぐい液 15 例を、精製水に懸濁し検体として用いた。検体はウイルス分離培養後、FITC 標識抗 HSV モノクローナル抗体を用いて蛍光染色し、同定と型の決定を行い、[HSV-1 陽性、HSV-2 陰性] 5 例、[HSV-1 陰性、HSV-2 陽性] 5 例、[HSV-1 陰性、HSV-2 陰性] 5 例と判定された。使用した検体量は、ウイルス分離培養法と PURE-LAMP 法にはいずれも 500 $\mu$ l の検体を用いた。

PURE 法で抽出した HSV-1 および HSV-2 核酸抽出液を用いてそれぞれの試薬に対する特異性試験も併せて行った。

## 成績

### 1. 感度試験

プラスミド DNA を用いた LAMP 法感度試験では、HSV-1 は 4 コピー/テスト、HSV-2 は 6 コピー/テストまで 100%の検出率であった (Table 1、Fig. 2)。コピー数が減少すると共に検出時間が遅くなったが、40 分以内に増幅が確認された。

Table 1 LAMP sensitivity test

Conc. copies/test	HSV-1		HSV-2	
	Tt	%Positive	Tt	%Positive
0	N.D.	0.0%	N.D.	0%
2	35.0	33.3%	37.4	50%
4	21.3	100%	30.2	66.6%
6	22.8	100%	30.3	100%
8	22.2	100%	28.2	100%
10	19.8	100%	30.2	100%
10 <sup>2</sup>	16.6	100%	23.0	100%
10 <sup>3</sup>	15.2	100%	20.5	100%
10 <sup>4</sup>	14.2	100%	19.0	100%
10 <sup>5</sup>	13.1	100%	16.9	100%
10 <sup>6</sup>	12.4	100%	16.0	100%

Tt: threshold time; N.D.: Not detected