

## 一類感染症の検査診断

研究分担者 下島 昌幸 国立感染症研究所ウイルス第一部第一室

**研究要旨** 2013年末に西アフリカで始まったエボラウイルス病の流行はこれまでにない数の感染者を生じたのみでなく、欧米を含む他の国における輸入事例や二次感染事例を生じるに至った。これにより先進国では医療施設におけるエボラウイルス病等の重篤な感染症における検査体制や関連機関との連携が注目視され、特にアメリカ・ヨーロッパにおける検査体制等の状況が2016年までに学術雑誌で報告されるようになった。

本年度は近年の学術雑誌等から情報収集を行い、アメリカ、ヨーロッパの医療施設におけるエボラウイルス病（疑い）における検査体制や研究機関との連携状況を調べ、更に医療機関でも実施可能なエボラウイルス病の検査法の検討状況や特徴をまとめ、日本の体制に反映させられるものか考察した。

### A. 研究目的

2013年の末に西アフリカに位置するギニアより始まったとされるエボラウイルス病は感染拡大を制御できずに隣国のリベリア、シエラレオネに広まり、約3万人弱の患者と1万人強の死者を生じる事態となった。エボラウイルス病の初期症状は発熱・頭痛・腹痛など特異的なものでなく、適切な患者管理や感染拡大制御を行なうためには適切な診断の根拠となる病原体検出などの専門的・正確・迅速な検査を要する。しかしこれら3国のように医療体制が十分でない状況下では優れた検査は国際的な援助があっても実施は困難が多く、2015年以降、そのような状況下でもより良い検査ができないか、検査法に関する様々な研究が世界の研究機関から学術雑誌で報告されるようになった。

西アフリカにおけるエボラウイルス病の拡大はアフリカの他の国のみならず欧米への輸入事例、更に米国およびスペインでは二次感染事例も生じることとなった。欧米では医療現場と検査部門、関連する自治体等が持つ

BSL3/4 研究機関等の連携が以前より懸念されており、エボラウイルス病の感染拡大を機に現状報告が学術雑誌でされるようになった。また西アフリカの場合と同じように、臨床現場でより良い検査が行えないか検討する研究報告も多くされるようになった。

本年度は、エボラウイルス病の流行を機に報告された欧米の医療機関における検査体制の状況を学術雑誌から調査した。その中でエボラウイルス病流行地域でも導入が検討あるいは考慮されている検査法が先進国の欧米でも考慮されているものがあり、その評価の報告が多いことから各検査方法の性能や特徴に注目しまとめることとした。最後にこのような欧米での検討事項・検討結果が日本に反映できるものか考察した。

### B. 研究方法

・欧米におけるエボラウイルス病（疑い）患者の検査体制の調査

NCBI の PubMed において ‘ ebola ’ , ‘ laboratory ’ , ‘ diagnosis ’ , ‘ point-of-care ’ ,

‘BSL3’などのキーワードを用いて検索を行い、医療機関における検査体制や BSL3 あるいは BSL4 を有する研究機関との連携状況を調査した文献に注目した。

・ Point-of-care におけるエボラウイルス病の検査機器の調査

WHO の Emergency Use Assessment and Listing Procedure (EUAL) にリストアップされたエボラウイルス病の検査法 (Interim guidance on the use of rapid Ebola antigen detection tests. <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ebola-antigen-detection/en/>) のうち、操作手順が少なく多くの練習を必要としないとされ、その性能を conventional PCR あるいは real time PCR と比較され結果が公表されている 3 つの検査法 (GeneXpert, FilmArray, ReEBOV) の特徴を文献より収集しまとめた。

### C. 研究結果

・ 欧米におけるエボラウイルス病 (疑い) 患者の検査体制の調査

米国の状況：州や地方自治体から指定されているエボラ治療センター 55 病院のうち、2015 年 4 月に調査結果が得られた 47 病院についてまとめた報告がある (Jelden et al., J Clin Microbiol, 2016)。87% の病院では隔離病室内で point-of-care での検査等が可能であった。94% が臨床用実験室を持ち、うち半数が BSL3 実験室であった。72% が BSL3 実験室を持つ地方健康局と連携していた。全体として 91% の病院が BSL3 実験室を利用可能であった。

ヨーロッパの状況：European Network of Infectious Diseases より 2009 年に出された高度隔離病棟の推奨枠組み (Bannister et al., Lancet Infect Dis, 2009) の特に診断方法やその実施場所について、ヨーロッパ 16 か国の

48 レファレンス隔離施設が枠組みを満たしているかどうかの調査結果が 2012 年に報告された (Thiberville et al., BMC Research Note, 2012)。81% が BSL3 実験室と連携があったが、微生物学的検査・一般検査を閉鎖系装置等で安全に行っているのはそれぞれ 11%・31% であった。その後この取り組みは継続して行われている様子は無く、ホームページ <http://www.eunid.eu/> から問い合わせを行なったが返答は得られなかった。

これとは別に病院レベルでの調査が EU 研究費のもと 2014 年 8 月の WHO による国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態の直後に行われ報告されている (de Jong et al., Euro Surveill, 2014)。ヨーロッパの 38 か国 (トルコとイスラエルを含む) の 254 病院の状況をまとめたものである。微生物学的な検査は 97.9% の病院で行えるが、BSL2, BSL3 が利用可能であるのはそれぞれ 57.1%, 24.2% であった。病院でエボラウイルス病の診断が行える 7.2%, その国あるいは他の国に依頼等してエボラウイルス病の診断が行なえるのは 72% であった。

・ Point-of-care におけるエボラウイルス病の検査機器の調査

以下の検査機器あるいは検査キットは近年特に西アフリカ 3 か国のように財力や人材が十分でない状況下であっても安全で高い能力を発揮しうるものと期待され WHO の EUAL にリストアップされ性能評価が行われてきたものである。いずれも病原体の検出 (病原体のゲノム RNA を検出あるいは病原体の蛋白質を検出) を行なうもので、検出感度や操作の簡便さ (操作手順の少なさ、必要な練習の少なさ)、供給量等から選出されたものである。しかし近年は輸入事例等があった先進国でも医療現場 (point-of-care) でエボラウイルス病検査に必要ではないかとされるものである

(Southern et al., J Clin Microbiol, 2015).  
・Bio Fire 社の FilmArray BioThreat-E (あるいは Bio Fire Defense 社の FilmArray NGDS BT-E test)

全血や尿(あるいは血漿, 血清)から Zaire ebolavirus のゲノム (L または NP 遺伝子が標的) を PCR により検出するセットで, 専用のパウチやバッファの消耗品, 検出機器を必要とする。消耗品は室温保存可能である。検出機器 1 台で検体 1 つを処理する。パウチを専用のステーションにセットし, バッファを添加, 検体を添加, 機器にセットし 75 分ほど要する。ゲノムコピー数(ウイルスの濃さ)は測定できない。電源を必要とする。感度や特異性は real time PCR あるいは conventional PCR と比較され, 良好な結果が得られている (Southern et al., J Clin Microbiol, 2015; Weller et al., J Clin Microbiol, 2016)。

呼吸器感染症や消化器感染症の病原体(いずれも 20 種程度)を同時に判定できるパウチもあり, 検出機器があればパウチ(消耗品)を変えるのみで適応が広がる。ただし現時点では Zaire ebolavirus と他の病原体を組み合わせたパウチはない。

・Cepheid 社の GeneXpert Ebola assay

全血(フィンガースティックでも可)あるいは口腔ぬぐい液から Zaire ebolavirus のゲノム (NP および GP 遺伝子が標的) を PCR により検出するセットで, 消耗品である専用のカートリッジと検出機器を必要とする。消耗品はメーカーは冷蔵保存としているが室温保存でも品質は落ちないとされる。検出機器には 1 台で 16 検体同時処理可能な機種もある。カートリッジに検体を添加 機器にセットし 2 時間半ほど要する。ゲノムコピー数(ウイルスの濃さ)をサイクル数(反応回数)として測定できる。電源を必要とする。感度や特異

性は real time PCR あるいは conventional PCR と比較され, 良好な結果が得られている (Jansen van Vuren et al., J Clin Microbiol, 2016; Semper et al., PLoS Medicine, 2016)。

カートリッジ(消耗品)を変えれば検出機器は他の病原体の検出にも用いることができるが, 並行して行うには検出部分が多い検出機種である必要がある。

・Corgenix 社の ReEBOV Antigen Rapid Test

全血(フィンガースティックでも可)あるいは血漿から Zaire ebolavirus, Sudan ebolavirus, Bundibugyo ebolavirus の VP40 蛋白質をイムノクロマトグラフィにより検出するキットで, 専用のスティックと展開バッファの消耗品を用いる。別にプラスチックチューブを準備する必要がある。消耗品は冷蔵保存する。スティック 1 本で検体 1 つを処理する。プラスチックチューブに展開バッファを入れておき, ここに検体を添加したスティックをセットし 25 分ほど待つ。バンドの有無を判定者が目視しウイルスの有無を判断する。バンドの濃さからおおよそのウイルス量を推測できる。電源を必要としない。感度や特異性は real time PCR と比較され, ある程度の良好な結果が得られている (Broadhurst et al., Lancet, 2015)。

目視による判定であるため, 判定者により結果が異なる可能性があり, 独立した複数の判定者による判定が推奨される。病原体のゲノムを検出する方法と比べ一般的に感度や特異性が良くなく, 低ウイルス量の場合に他の検出法と結果が一致しないと報告されている (Broadhurst et al., Lancet, 2015; [http://www.who.int/diagnostics\\_laboratory/procurement/150219\\_reebov\\_antigen\\_rapid\\_test\\_public\\_report.pdf](http://www.who.int/diagnostics_laboratory/procurement/150219_reebov_antigen_rapid_test_public_report.pdf))。

#### D. 考察

欧米の検査：調査の対象機関や実施時期が同じでないため比較は難しいが、印象としてヨーロッパより米国の医療機関の方が BSL3（あるいは BSL4）へのアクセシビリティ率が高く、患者検体を安全に取り扱う取り組みが進んでいると感じられた。日本の医療機関で類似の調査が行われたことは無い（そもそも体制がかなり異なる）が、医療機関から BSL3 へのアクセシビリティ率は高くなく、少なくとも検査時のバイオセーフティーは高める必要はあると言える。

エボラウイルス病検査法について：WHO の EUAL にリストアップされた検査法には標準となっている Altona 社の RealStar Filovirus RT-PCR kit や同 RealStar Ebolavirus RT-PCR kit がある。これは血漿やスワブから抽出した核酸フィロウイルス（あるいはエボラウイルス）のゲノムを real time PCR により定量的に検出する方法で、西アフリカの現地のラボでの検査のほとんどで用いられていたものである。検出感度や特異性はかなり良い。しかし、この検査法の実施にはこのキットに加え、核酸抽出用のキット、リアルタイム PCR の機器、遠心機、マイクロピペット、試薬保存用の冷凍庫等を必要とするのみでなく、各ステップの操作にある程度の練習が求められる。人材も伴った国際ラボや日本の特定の研究機関であれば実施に問題は生じないと考えられるが、現地の遠隔地での検査や先進国の医療機関の point-of-care としての検査には向かない。記載した 3 検査法は point-of-care に向く特徴を持つがそれぞれで欠点もあり、どれか 1 つが日本の医療機関にあればエボラウイルス病の検査として安心できるという事にはならない。例えば FilmArray と GeneXpert はこれら機器そのものを導入している機関は少ないと考えられ、新たに購入等しなくてはならない。またこれ

らで使用する消耗品はエボラウイルスの中の Zaire ebolavirus のみを検出するため、他のエボラウイルス（Sudan ebolavirus や Bundibugyo ebolavirus）による感染症の場合には検出できない。ただし改良を行えば、例えば他のエボラウイルスも検出できるよう改良する、マラリア等の類症鑑別の対象となる疾患にも対応するよう改良する、などがあれば非常に役に立ちうる。ReEBOV は感度や特異性が標準とされる PCR や FilmArray、GeneXpert に劣るため、ReEBOV 単独での判断はできないと考えたほうが良く、特に陰性の結果となった場合でも PCR 等による結果判断を待つべきである。

また、流行地とは異なり日本のようにエボラウイルス病の非流行地である場合には陽性を見落としてしまうことが事態を悪くしてしまうと懸念される。そのためどれか 1 つの検査法により判断するのではなく、複数の検査法による判断、異なる時期に採材されたサンプルによる判断、異なる検査部門・検査機関での検査による判断が望ましい。ただし一方では陽性との結果がどれか 1 つの検査法で得られた場合、確定との判断をしないまでもその慨然性は高いと見做すことができ、その後の対応準備の助けになるとの期待はできる。

## E. 結論

エボラウイルス病などに対する欧米の検査体制はかなり整備に向けた取り組みが行われていると言える。日本での検査体制も特にバイオセーフティーの向上が必要と考えられるが、一方で point-of-care の充実化が可能な優れた検査法の開発も必要である。

## F. 健康危険情報

総括報告書にまとめて記載

G. 研究発表

該当なし