

chapter 4 検査・診断

Keyword

- ▶ インフルエンザ様疾患
- ▶ 迅速診断キット
- ▶ イムノクロマトグラフィー法
- ▶ PCR
- ▶ パンデミック

1 インフルエンザの臨床診断

インフルエンザの診断^{point}には、①インフルエンザウイルス感染症か否か、②重症度はどうか(合併症の有無、患者の年齢や基礎疾患の有無など)、という2つのポイントがある。感染症における病原診断の重要性は言うまでもないが、インフルエンザの迅速かつ確実な診断は、抗インフルエンザ薬の使用や感染拡大防止策を適切に行うために、非常に重要である^{info}。

インフルエンザ様疾患(influenza-like illness: ILI)とは、「インフルエンザウイルス感染症の主要な症状である発熱や上気道炎症状を呈するが、インフルエンザウイルスの感染が確認できていない病態」を総称し、疾患群として扱っている。

ILIであってもインフルエンザウイルス感染症でない場合もあるし、逆に、インフルエンザウイルス感染症であってもILIを呈さない場合もある。インフルエンザは毎年冬に流行するポピュラーな疾患であり、必ずしも全例に検査診断を行う必要はない。インフルエンザの検査をするか、あるいはILIとして対応するかは、患者の病状や流行の発生状況によって異なる。

わが国の感染症法における届出基準の中で、ILIの定義は、以下のすべてを満たす場合とされている。

- 突然の発症
- 高熱(38.0℃以上)
- 上気道炎症状
- 全身倦怠感などの全身症状

成人や年長児で、流行期にこのような典型的なインフルエンザ様症状を呈した場合には、臨床症状のみによる判断も比較的容易である。わが国の

point

インフルエンザの診断

1. 臨床症状
2. 流行状況:接触歴(家庭・施設など)、医療施設における検出状況、公的機関の疫学情報
3. 検査:血清抗体検査、ウイルス分離、遺伝子検出検査、抗原検出検査

info

疫学情報ウェブサイト

国立感染症研究所感染症疫学センター

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-idsc.html>

地方衛生研究所ネットワーク・地方感染症情報センター

<http://www.chieiken.gr.jp/kansenjoho/klink.html>

厚生労働省

http://www.mhlw.go.jp/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/kenkou/kekaku-kansenshou/infulenza/index.html

CDC

<http://www.cdc.gov/flu/>
WHO:FluNet

http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/flu-net/en/

HCPC(英国)

<http://www.hpc-uk.org/mediaandevents/positionstatements/>

その他関連企業ウェブサイト

ような温帯地方では、季節性インフルエンザの流行時期は冬季に集中しており、流行期のILI患者の中でインフルエンザの占める割合が高いためである。地域や集団における流行が大きければ、臨床症状による診断の的中率はより高くなる **info**。

しかし、ILIを呈する他の感染症が多い小児、典型的な症状を呈さないことがある高齢者、症状が修飾されがちな基礎疾患のある患者などでは、往々にして他の疾患との鑑別は難しい。インフルエンザ患者との接触歴が明らかでない場合や流行最盛期以外、あるいは新型インフルエンザ発生時のように、毎年の流行パターンと異なった状況では、さらに判断しにくい。

また、インフルエンザの型や亜型については、症状から鑑別することは困難である。たとえば、2009年に新型インフルエンザとして世界的な流行となったインフルエンザA(H1N1)pdm09患者の多くは、季節性インフルエンザと同様のILIの臨床像のみで、数日～1週間で治癒しており、季節性インフルエンザとの鑑別はできなかった。このような場合、周囲の流行状況や接触歴が重要な情報となる。

info

米国の小児の季節性インフルエンザにおける調査では、ウイルス分離とPCRで確認した症例で、臨床的にインフルエンザと診断されていたのは、入院患者の28%、外来患者の17%にすぎなかったと報告されている¹⁾。

2 インフルエンザの検査診断

インフルエンザの検査 **info** は、血清抗体検査とインフルエンザウイルスを直接検出する方法とにわけられる。確定診断検査としては、従来スタンダードであったペア血清による抗体価上昇確認とウイルス分離に加えて、最近PCRやLAMPなどの遺伝子検出法も定着した。たとえば、2009年のパンデミック発生時、米国疾病管理予防センター(CDC)のA(H1N1)pdm09の症例定義による確定例とは、「インフルエンザ様症状(発熱37.8℃以上と咳または咽頭痛があること)を呈し、リアルタイムRT-PCRあるいはウイルス分離でインフルエンザウイルス感染を確認したもの」となっている。

しかし臨床の現場では、時間や手間がかかる確認検査を日常的に行い、実際にその結果を診療に反映させることは不可能である。迅速な対応が求められる臨床における検査として、主にインフルエンザウイルス抗原検出検査(いわゆる迅速診断キット)が多用されている。迅速診断キットは、海外では評価が低い傾向があるが²⁾³⁾、わが国においては、迅速診断キットを実施し抗インフルエンザ薬を投与するという診療の流れがスタンダードとなっている。

info

インフルエンザ検査の保険収載(2018年4月改訂)

インフルエンザウイルス抗体検査:1項目79点、インフルエンザウイルス抗原検査:143点、検査判断料:144点(月1回)、鼻腔・咽頭拭い液採取料:5点。インフルエンザの異なる検査や多種病原体の抗原検査など、同時に複数の検査をした場合は制約あり。

PCR:polymerase chain reaction

LAMP:loop-mediated isothermal amplification

3 確認検査法

1 血清抗体検査

血清抗体検査は、血球凝集阻止試験 (HI: 型・亜型特異的) と補体結合試験 (CF: 型特異的) が一般的であるが、場合によっては中和試験 (NT) が行われる。感染の確認には急性期と回復期のペア血清 (2週間以上の間隔をあけることが望ましい) による評価が必要で、4倍以上の変動をもって有意とする。

HI: hemagglutination inhibition
CF: complement fixation
NT: neutralization test

2 ウイルス分離 **point**

インフルエンザウイルスの分離は、MDCK細胞 (イヌ腎組織由来株化細胞) などの培養細胞や孵化鶏卵を用いてウイルスを増殖させ、細胞変性効果 (CPE) を確認後、同定試験で型・亜型を特定する。判定までに数日 (3~10日) を要するが、感染性のあるウイルスであれば微量でも検出できる感度の高い検査である。ウイルスの分析や薬剤感受性の確認などには分離培養されたウイルスが必要不可欠である。培養に用いる細胞によって感受性が異なることもあるが、変異株にも対応できるなど可能性は幅広い。

MDCK細胞: Madin-Darby
canine kidney cells
CPE: cytopathic effect

point
ウイルス分離は、目的とするウイルスにより使用する培養細胞などの方法が異なるので、対象ウイルスを絞って、使用する培養細胞や培養条件を決定する。多種のウイルスを対象とする場合は、数種の培養細胞を用いることもある。細胞に接種するまでウイルスの感染性を保つ必要があるため、採取検体は輸送培地に入れ、採取後すぐに冷蔵し、数日以上保存する場合は冷凍保存する (できれば-70℃以下)。凍結融解を繰り返すと失活しやすい。

3 遺伝子検出法

遺伝子検出法は、ウイルス遺伝子の一定の長さの核酸配列を検出する **info**。利点としては、「プライマーの設定をHAやNAにおくことによって型・亜型の鑑別が可能」、「病原性の高いウイルスを増殖させる危険がない」、「感染性が失活していても検出可能」「検査時間が比較的短い」という点が挙げられる。ウイルス遺伝子の様々な変異の検索に必須の検査である。複数のプライマーを同時に使用して多種の病原を検索することも可能である。

info
インフルエンザ核酸検出検査の
保険収載

2012年4月1日から保険収載され、検査料410点、微生物学的判断料150点。インフルエンザ感染が疑われる重症患者のみに算定し、その場合には当該検査が必要な理由について診療報酬明細書の摘要欄に記載のことでされている。

ウイルスの変異によっては既存のプライマーの設定では対応できない場合も想定しておかなければならない。また、回復期に遺伝子検査陽性が長く続く場合があり、「遺伝子検査陽性すなわち病原」と判断するには慎重さを要することもある。わずかなコンタミネーションも増幅されてしまうため、細心の注意が必要である。

(1) RT-PCR, nested RT-PCR

RT-PCRは、インフルエンザウイルスがRNAウイルスであるため、逆転写(RT)酵素によってcDNA(相補鎖DNA)を作成した後増幅し、増幅産物を電気泳動によって確認する。2段階のPCR(nested RT-PCR)によって感度を上げることができる。遺伝子検査では最も基本的な検査である。

(2) リアルタイムRT-PCR **info**

リアルタイム(real-time)RT-PCRは、蛍光色素を用いてその蛍光強度をモニターしていくことにより、リアルタイムに増幅反応を確認するので、ウイルスコピー数定量も可能である。

(3) RT-LAMP法

LAMP法はわが国で開発された遺伝子増幅法である⁴⁾。RNA抽出物をプライマー、鎖置換型DNA合成酵素、基質と混合し、65°C付近の一定温度下の反応によって増幅する。検査時間が1時間以内と短く、特異性も高い。RNA抽出と試薬調整を簡略化したH5およびA(H1N1)pdm09検出用キット(Loopamp® H1pdm 2009インフルエンザウイルス検出試薬キットなど:栄研化学)が市販されている**info**。

RT-PCR:reverse transcription-polymerase chain reaction

info

米国では、自動化された小型迅速核酸増幅システムが相次いで発売されている。インフルエンザ迅速検査の中では最も感度が高いと評価されている。

例:cobas®Liat® PCR system (Roche), GeneXpert®system (Cepheid), Alerc™ i (Abbot)

info

ウイルス検出検査のための検体—下気道検体の重要性

ウイルス検出のための材料としては、上・下気道の分泌物が使用される。十分な検討はされていないが、肺炎の症例では、喀痰や気管内吸引液、肺胞洗浄液など、下気道からの検体の有用性が指摘されている。2009年パンデミック時のA(H1N1)pdm09の肺炎例でも、上気道からのウイルス検出は陰性で、下気道からのみウイルスが検出された報告がみられる。

4 インフルエンザウイルス抗原検出迅速検査(迅速診断キット)

迅速診断キットは、インフルエンザのポイントオブケア検査(POCT)として広く行われている。迅速診断キットの実施は、抗ウイルス薬の適切な使用、他の検査の減少、抗菌薬適正使用、リスクの予測、感染対策のスムーズな実施、疫学調査などに貢献している。わが国では20以上の試薬が市販されており、感度・特異度の精度や操作性などの改良が図られている。

1 A型およびB型インフルエンザ迅速診断キット **info**

A型およびB型インフルエンザ抗原検出迅速診断キット⁵⁾は、抗原抗体反応を利用した免疫法による試薬で、一定のウイルス量との反応を目視あるいは判定機器で判定する。A型とB型それぞれのウイルス核蛋白に対するモノクローナル抗体を使用し、A型・B型を鑑別検出する(研究用試薬としてA型亜型を区別する迅速診断キットもある)。

info

インフルエンザ以外の呼吸器感染症迅速診断キット

ウイルス:RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルスウイルス検査では、2種ウイルス同時検出試薬や、共通の抽出液を使用する迅速診断キットも市販されている。

細菌:A群溶連菌、肺炎球菌、マイコプラズマ、レジオネラ

測定原理は、多くはイムノクロマトグラフィー法による試薬で、デバイス(カートリッジ)型あるいはディップスティック型の形をとり、発色粒子としては金コロイドや着色ラテックス、白金-金コロイドなどが使用されている。反応時間は15分以内である。

検査材料としては、わが国では鼻腔(鼻咽頭)拭い液、鼻腔(鼻咽頭)吸引液、鼻かみ液、咽頭拭い液が認められている⁶⁾ **info**。

迅速診断キットは核蛋白に対する抗体を使用しているため、異なった亜型や系統、変異株や動物由来A型亜型など広い範囲のウイルス株に反応すると考えられる(添付文書参照)。迅速診断キットの検出限界(最小検出感度)は $10^2 \sim 10^6$ pfuに分布し、製品やウイルス株によって感度が異なることが報告されている⁷⁾⁸⁾。臨床検体のウイルス量はウイルス輸送培地に希釈した場合、 $< 10 \sim 10^8$ pfu/mL程度までの広い範囲に分布しており、検出限界以下のウイルス量の検体は迅速診断キットで偽陰性となることが理解できる(図1)⁹⁾。

特異性については、いずれの製品も非特異反応は少なく高い特異度を示している(>95%)。現時点では迅速診断キットは確認検査としては認められていないが、流行期の陽性反応の場合はほとんどインフルエンザウイルス陽性と判断される。臨床試験におけるウイルス分離やRT-PCRを対照検査とした感度は、鼻腔拭い液や鼻腔吸引液でおおむね80~100%の範囲になる¹⁰⁾。鼻かみ液や咽頭拭い液は、やや感度が劣る傾向にある。そ

info

検体採取法

鼻腔拭い液: 鼻腔用の細い綿棒を用いる。最初は綿棒の先を少し上向きに挿入し、その後、鼻腔下壁に沿うようにして鼻腔の奥から上咽頭に当たるまで挿入する。しばらく時間をおき、回転させるように鼻甲介(外側)をこすりながら引き抜く。患者の頭部が動かないように固定して行う。

鼻腔吸引液: トラップ付き吸引カテーテルを用いて採取する。鼻咽頭への挿入方法は鼻腔拭い液に準じる。添付文書に記載されているように生理食塩水などで希釈せず検査する。

鼻かみ液: 撥水性のある採取用の鼻紙を用いる。鼻症状のある患者から十分な量の鼻かみ液を採取する。

咽頭拭い液: 咽頭拭い液採取用の太い綿棒を用いる。頬粘膜や舌に触れないように咽頭の奥まで挿入し、口蓋垂を跳ね除けるようにして、上咽頭を拭う。

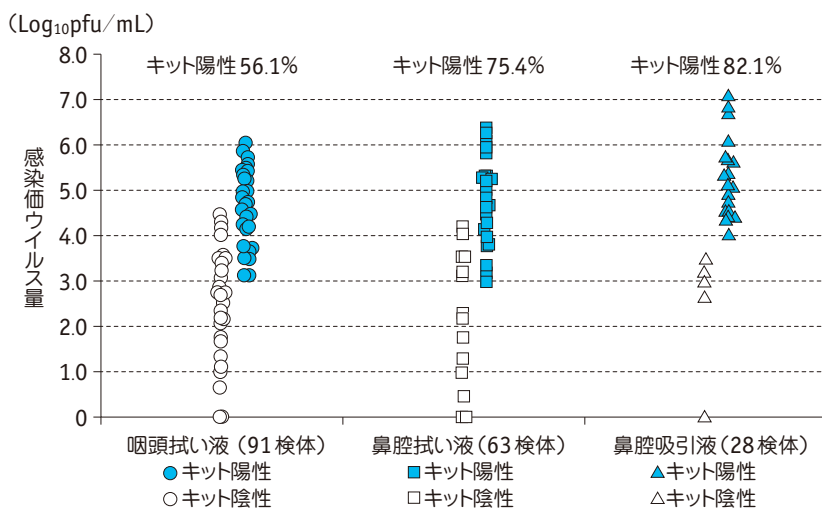


図1 迅速診断キット(エスプライン[®] インフルエンザA&B-N) 陽性検体と陰性検体の感染価ウイルス量の分布(A型)

迅速診断キットが陽性になるためには少なくとも 10^3 pfu/mL以上のウイルス量が必要(文献9より引用)

それぞれの製品の成績を確認して使用する。

感度は検体中のウイルス量に影響する様々な条件により左右され、一般的に検出率が低くなりがちなのは、A型よりB型、小児より成人、鼻咽頭検体より咽頭検体、発症6時間以内あるいは12時間以内の病初期^{ref.}、発症5日以降、発熱の程度が低い場合、鼻汁が少ない場合、ワクチン接種者、検体採取状況が不適切な場合などが挙げられる¹¹⁾^{info.}。

2 判定機器による新しい迅速検出システム

インフルエンザ抗原検出試薬は、POCTキットとして機器が不要で目視判定ができることがメリットであったが、最近、判定機器を使用する試薬が相次いで登場している(表1, 図2)。目視による判定のばらつき防止、自動判定による省力化が利点として挙げられる。銀増幅法(図3)は、写真技術を応用した増幅反応により感度の向上をはかり、一定の評価を得ている¹²⁾¹³⁾。2017年には、国内で初めて蛍光抗体を用いた試薬が発売されている¹⁴⁾。

ref.
発症後、12時間以内の検査
Q15 → p 224 ~

info 米国におけるインフルエンザ検査の管理

米国は2017年、インフルエンザウイルス抗原検出迅速検査の精度管理区分をランクアップし、遺伝子検査やウイルス分離と比較した感度・特異度などに一定の基準を設けた。また、毎年反応性の確認や、変異株が出現したときの対応も規定している。



ラピッドテスタ®リーダー
(積水メディカル)



BD ベリター™プラス アナライザー
(日本ベクトン・ディッキンソン)



富士ドライケム IMMUNO AG2
(富士フィルム)



スポットケム FLORA SF-5520
(アークレイ)



Sofia アナライザー2
(DSファーマバイオメディカル)

図2 インフルエンザウイルス抗原検査で用いられる主な判定機器

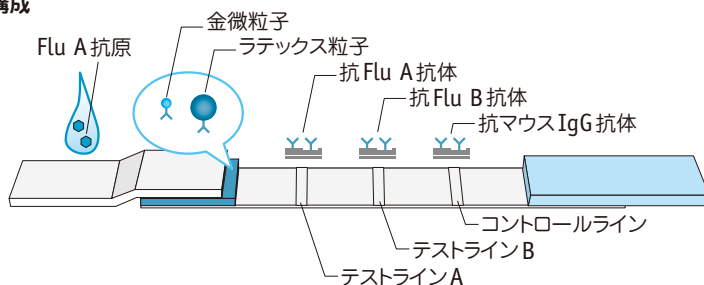
表1 インフルエンザウイルス抗原迅速検出検査の判定機器

| 判定機器 | 測定原理 | 測定時間 | 検体 ○適応あり, ×適応なし | | | |
|---|------------------------------|-------|-----------------|-------|---------|-------|
| | | | 鼻腔拭い液 | 鼻腔吸引液 | 鼻汁/鼻かみ液 | 咽頭拭い液 |
| 1 デンシトメトリー分析装置クイックチェイサーImmuno Reader II | 銀増幅イムノクロマト法 | 15分 | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 2 デンシトメトリー分析装置富士ドライケム IMMUNO AG2 | | | | | | |
| 3 移動式免疫蛍光分析装置Sofia アナライザー2 | ユウロピウム (Eu) ピーズ標識蛍光イムノクロマト法 | 15分 | ○ | × | × | × |
| 4 移動式免疫蛍光分析装置スポットケムFLORA SF-5520 | 時間分解蛍光測定法:TRF (Eu 使用) | 10分 | ○ | ○ | × | × |
| 5 蛋白質分析装置Rapiim™ Eye10 | 光導波路膜上の抗原抗体反応微粒子結合による光の減衰を測定 | 8分 | ○ | ○ | ○ | × |
| 6 小型化学発光免疫自動分析装置POCCube® | 化学発光免疫法 | 6分 | ○ | ○ | × | × |
| 7 デンシトメトリー分析装置BD ベリター™ プラス アナライザー | 金コロイドを用いたイムノクロマト法 | 5~10分 | ○ | ○ | × | ○ |
| 8 デンシトメトリー分析装置ラピッドテスタ®リーダー | 金コロイドを用いたイムノクロマト法 | 15分 | ○ | ○ | × | ○ |

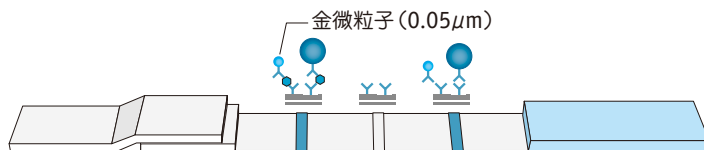
| 判定機器 | 他の測定項目 | 目視判定 | 備考 | 販売元 |
|---|-----------------------|------|--|----------------|
| 1 デンシトメトリー分析装置クイックチェイサーImmuno Reader II | マイコプラズマRSウイルス/アデノウイルス | 不可 | <ul style="list-style-type: none"> ●早期判定は最短3.5分 ●判定のみの使用はできない ●両社製品は同じ装置であるが、仕様が異なり、試薬は共有できない ●銀増幅反応はないが、アデノウイルス(単独)とA群溶連菌試薬あり | ミスホメディー |
| 2 デンシトメトリー分析装置富士ドライケム IMMUNO AG2 | | | | 富士フィルムメディカル |
| 3 移動式免疫蛍光分析装置Sofia アナライザー2 | RSウイルスA群溶連菌 | 不可 | <ul style="list-style-type: none"> ●重量1.0kgで移動式としている ●自動測定モードと連続判定モードの切替可能 ●3分, 6分, 8分, 10分で早期判定 | DSファーマバイオメディカル |
| 4 移動式免疫蛍光分析装置スポットケムFLORA SF-5520 | A群溶連菌 | 不可 | <ul style="list-style-type: none"> ●1.5分, 2.5分, 4分, 6分で早期判定 ●重量2.2kg, 多検体(3チャンネル)の同時測定が可能 ●1検体測定機種(SF-5510)もあり、試薬は共通 | アークレイ |
| 5 蛋白質分析装置Rapiim™ Eye10 | なし | 不可 | ●装置はレンタル契約、試薬はメーカーのウェブサイト販売 | キャノンメディカルシステムズ |
| 6 小型化学発光免疫自動分析装置POCCube® | RSウイルスA群溶連菌 | 不可 | ●血液検査項目あり | 東洋紡 |
| 7 デンシトメトリー分析装置BD ベリター™ プラス アナライザー | RSウイルスアデノウイルスA群溶連菌 | 不可 | <ul style="list-style-type: none"> ●アダプティブリードテクノロジー搭載 ●読み取りモード切替可能(手動モードで6秒判定) ●PCへのデータ出力, プリントアウト可能 | 日本ベクトン・ディッキンソン |
| 8 デンシトメトリー分析装置ラピッドテスタ®リーダー | なし | 可 | <ul style="list-style-type: none"> ●目視判定と機器判定が可能 ●装置判定では、タイマーモードと連続判定モードの切替可能 ●2分以降, 1分ごとで早期判定 | 積水メディカル |

いずれも専用試薬を用いる

A: 試薬の構成



B: 銀増幅前のラテックス粒子によるインフルエンザA型の検出



C: 銀増幅後の銀粒子によるインフルエンザA型の検出

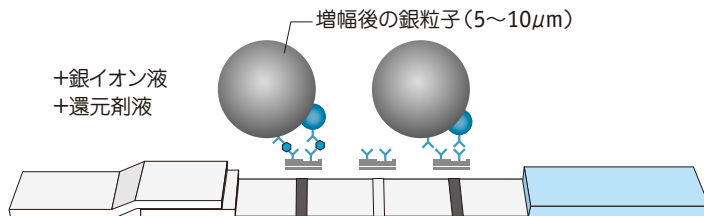


図3 銀増幅イムノクロマトグラフィー法の原理

- A: メンブレンのテストラインには、抗インフルエンザウイルス抗体が固相されており、一方、金コロイド粒子とラテックス粒子には、別の抗インフルエンザウイルス抗体が標識されている
- B: ウイルス抗原が検体中に存在すると、抗体標識金コロイド粒子やラテックス粒子と複合体を形成し、テストラインに捕捉される（通常のイムノクロマトグラフィー法）。主にラテックス粒子で検出する
- C: 分析測定機器内で還元剤液と銀イオン液がメンブレンに供給されると、金コロイド粒子を核に銀粒子が形成される銀増幅反応によって約100倍の大きさの粒子となり、高感度に検出できる
(文献12より改変)

3 パンデミックにおける迅速診断キット

パンデミックウイルスや、鳥インフルエンザウイルスについては、迅速診断キットの反応性が異なるだけでなく、患者の上・下気道におけるウイルス動態が季節性インフルエンザとは異なる可能性もあり、発生時には改めて検出率を確認する必要がある。また、検体採取の状況も季節性インフルエンザとは異なり、適切に採取できない可能性もある。

2009年のパンデミックにおける既存の迅速診断キットの精度は、海外では感度が10～70%の低値であると評価され、「迅速診断キットによる結果が偽陰性の可能性が少なくないので、確認検査の結果を待たずに臨床診断により抗ウイルス薬の投与を開始すべきである」とされた。