

新しい検査法 迅速ヒトメタニューモウイルス診断キット — 保険適用されたイムクロマト法による hMPV 抗原定性 —

A rapid human metapneumovirus (hMPV) antigen detection kit

— Immunochromatography assay for the detection of hMPV covered by health insurance —

きく た ひで あき
菊 田 英 明
Hideaki KIKUTA

はじめに

ヒトメタニューモウイルス (human metapneumovirus : hMPV) は、2001 年に RS ウイルス (respiratory syncytial virus : RSV) と同様の臨床症状を持つ小児の鼻咽頭から猿の継代 3 代目腎臓細胞を使用し発見されたウイルスである。200 年位前から世界中に存在してきたウイルスであったが、ウイルスの分離、培養が難しかったために、2001 年まで発見されなかったウイルスである¹⁾。そのため、hMPV の証明は Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法でウイルス遺伝子を検出することが最も鋭敏な最良の方法であった。2014 年からイムクロマト法による hMPV 抗原定性が保険適用となった。今回、hMPV と迅速 hMPV 診断キットについて概説する。

I. hMPV について

感染様式は飛沫感染のほか、喀痰や鼻汁中にも存在し手指や器物を介して接触感染によっても伝播する。呼吸器感染症におけるウイルスの検出率は 65 ~ 85% であり、低年齢ほど検出率が高い。呼吸器感染症で検出されるウイルスの検出率は年齢、サンプリング時期、呼吸器感染症の種類により異なるが、小児の呼吸器感染症の 5 ~ 10%、成人の 2 ~ 4% は hMPV が原因とされる。hMPV は上気道炎 (鼻炎、咽頭炎、副鼻腔炎)、下気道炎 (喘鳴を伴う気管支炎、細気管支炎、肺炎) を引き起こす。大部分は上気道炎、いわゆる「かぜ」と推測されるが、乳幼児、高齢者などの免疫力の弱いヒト、白血病や移植患者な

どの免疫不全状態のヒトでは、重症の下気道感染症が多くなる。臨床症状の発現頻度は重症度により異なっているが、臨床で問題となる喘鳴を伴う気管支炎、細気管支炎、肺炎では発熱、咳嗽、鼻汁はいずれも 90% 以上の患児で見られ、その他、呼吸困難、嘔吐、下痢、頭痛がみられる。稀ではあるが脳炎・脳症の報告がある。hMPV の流行時期はわが国では 3 ~ 6 月である。生後 6 カ月頃から感染が始まり、2 歳までに 50%、5 歳までに 75%、遅くとも 10 歳までに 1 度は感染する。ただし、乳幼児期においても再感染を繰り返している²⁾。hMPV の感染力は非常に強く、高齢者施設での高齢者の二次発病率は 20 ~ 30% と推定され、施設内の集団感染 (保育園、幼稚園、高齢者施設)、院内感染、両親を含めた家族内感染を引き起こす。鑑別すべき感染症は RSV、ライノウイルス、ヒト・ポカウイルス、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルスなど喘鳴を伴いやすい呼吸器症状を引き起こすウイルス感染症である。

II. 従来の hMPV 感染の証明

1. ウイルス分離・検出

一般的にウイルス分離がウイルス証明のゴールドスタンダードである。一般的に hMPV の分離は LLC-MK2 細胞を使用しトリプシン存在下で数週間かけて行うが、RT-PCR 法で陽性であった検体の約 1/3 しか継代可能なウイルス分離には成功できず非常に難しい²⁾。

2. RT-PCR 法

hMPV を分離することは難しいため、hMPV は RT-PCR 法でウイルス遺伝子を検出することが最も鋭敏な最良の方法である。PCR 産物の塩基配列を決定し系統樹解析を行い、グループ、サブグループを決定する。Real-time RT-PCR 法で測定したウイルス量は発熱後 1～4 日に高く、多くはピーク時に 10^8 copies/ml レベルの高値を示す³⁾。hMPV は RT-PCR 法で発症後 1～2 週間検出される¹⁾。他のウイルスとの重感染もあるため、ウイルス量が多い時は hMPV 感染症と考えてよいが、少ない時は他のウイルスとの重感染も考える必要がある。

3. 感染細胞の蛍光抗体法での抗原検査

単クローン抗体を使用し、蛍光抗体法で鼻咽頭スワブの hMPV 感染細胞の hMPV 抗原を検出する方法であるが、技術が必要であり感度は RT-PCR 法より劣る⁴⁾。

4. 血清学的検査 (抗体検査)

hMPV の血清学的診断は感染細胞を使用した蛍光抗体法 (FA 法)、リコンビナント蛋白を使用した FA 法と酵素抗体法、ウイルスの中和能を測定する中和抗体法などが報告されている。初感染後、hMPV 抗体は持続する。血清中の hMPV に対する主要な抗体は抗 F 蛋白抗体であるが、F 蛋白に対する抗体はグループ特異性がない。G 蛋白に対する抗体はサブグループに特異的な抗体であるが、中和活性はほとんどなく感染数週後から一過性に上昇するのみである^{5,6)}。初感染、再感染の鑑別には血清学的診断が必要である。

Ⅲ. イムノクロマト法の原理

測定の原理は、セルロース膜上を検体が試薬を溶解しながら毛細管現象により流れる間に抗原抗体が起こる免疫測定法である。一般的に、ウイルス抗原をイムノクロマト法で検出するためには、あるウイルス蛋白 (抗原) に対するエピトープの異なる 2 種類の単クローン抗体を使用する。その蛋白の条件はウイルス構成蛋白であり、感染細胞の細胞質内に大量に作られる蛋白であり、ウイルス間で変異が少な

い蛋白であることが望ましい。インフルエンザでは N 蛋白 (Nucleoprotein : 核蛋白) に対する 2 種類の単クローン抗体、RSV では F 蛋白 (Fusion protein : 融合蛋白) に対する 2 種類の単クローン抗体を使用していることが多い。hMPV では、N 蛋白または F 蛋白に対する 2 種類の単クローン抗体を使用することになる。hMPV 抗原定性はウイルス RNA を検出しているのではなく、検体中に存在する遊離しているウイルスの蛋白と hMPV 感染細胞の細胞質内に多く作られる蛋白を合わせて検出しているものであるが、一般的にウイルス RNA 量の多い検体ほど hMPV 抗原定性は陽性になる。hMPV 抗原定性のイムノクロマト法では、コンジュゲートパッドに金属コロイドで標識された 1 個の単クローン抗体 (金コロイド標識-抗 hMPV 抗体) が含まれている。もう 1 個の単クローン抗体はテストライン (判定ライン) にキャプチャー抗体として塗布されている。コントロールラインには、金コロイド標識-抗 hMPV 抗体を捕捉する抗体 (コントロール用抗体 : 使用する単クローン抗体に対する抗体) が塗布されている。サンプルパッドに抗原を含む陽性検体を滴下すると、hMPV 抗原はコンジュゲートパッド内の金コロイド標識-抗 hMPV 抗体と免疫複合体を形成しながらセルロース膜状を移動しテストラインに塗布されている抗 hMPV 抗体がエピトープの異なる hMPV 抗原と結合捕捉し集積することで可視化される。次いで、コントロールラインで、残った金コロイド標識-抗 hMPV 抗体を捕捉し、可視化される。抗原を含まない陰性検体では、コントロールラインのみで可視化される⁷⁾ (図)。

イムノクロマト法による抗原定性で重要視されるのは、キットの感度と特異度である。感度とは陽性と判定されるべき検体を正しく陽性と判定する確率で、特異度とは陰性と判定されるべき検体を正しく陰性と判定する確率である (表)。インフルエンザの迅速診断キットにおいては RT-PCR と比べ感度は少なくとも 70%～80% 以上、特異度は少なくとも 90% 以上が必要とされる⁸⁾。感度、特異度が両方高いのが良いキットであるのは当然であるが、PCR と比較した場合には感度には限界があり、パーセントから見ると感度より特異度が重要であることが分かる。インフルエンザウイルス、マイコプラズマ、溶血性連鎖球菌のように治療薬がある疾患は見落と

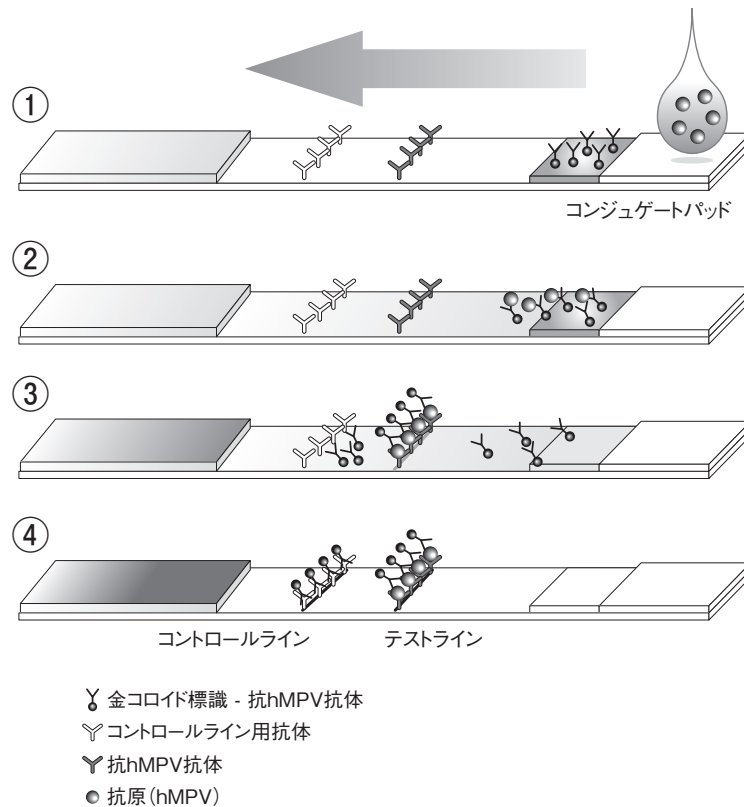


図 イムノクロマト法の原理

表 hMPV抗原定性反応の感度と特異度

	RT-PCR陽性	RT-PCR陰性
hMPV抗原定性陽性	A (真陽性)	C (偽陽性)
hMPV抗原定性陰性	B (偽陰性)	D (真陰性)
	感度 = $A/A + B$	特異度 = $D/C + D$

し (偽陰性) がないように感度がより優先されると思われる。また、hMPV、RSV、ノロウイルス、ロタウイルスのように特別な治療法がなく軽症の患者が周囲に存在する疾患は、見落とし (偽陰性) より過剰な心配、過剰な対応を防ぐために過剰診断 (偽陽性) がないように特異度がより優先されると思われる。hMPVのウイルス分離は難しいため、イムノクロマト法による抗原定性はウイルス分離より陽性率が高くなり、ウイルス分離を指標に感度を出すことはできない。迅速hMPV診断キットの感度、特異度は、感度の高いRT-PCR法を指標に出すことになる。そのため、迅速hMPV診断キットの感度、特異度は、その指標となるRT-PCR法自体の感度に大きく影響されることになる。RT-PCR法の感度が低ければキットの感度が上昇することになり、RT-PCR法の感度が高ければキットの感度が低下することに

なる。また、感度は検体の選び方で大きく変わる。同一のキットを使用しても、ウイルス量の多い検体が多いとキットの感度は上がり、ウイルス量の多い検体が少ないと感度は下がる。また、血液の混入により反応が阻害され感度が低下する可能性があるため、血液が混入した検体は使用すべきではない。粘度が高い検体は、イムノクロマトの展開に障害となり感度が低下する。

検体のウイルス量に影響を与える因子として、まず鼻咽頭拭い液を採取する手技の巧拙がある。鼻腔の鼻水だけでなく、鼻咽頭粘膜を擦過して拭い液を採取することが重要である。また、検体を採取する際に使用するブラシは、フロックスワブ (植毛綿棒) を使用したほうが採取量の多いことが報告されている。ウイルス量の多い検体を採取するためには、hMPV感染症では発症から1~4日のウイルス量の多い時期に迅速hMPV診断キットを使用すべきである。検体の採取方法は、鼻腔吸引液>鼻咽頭拭い液>咽頭拭い液の順に感度が高いため、複数のウイルスを検査する場合は患者の負担を少なくするため、検体は感度が高い鼻腔吸引液を使用するのが良いと思われる。

Ⅳ. 保険収載された hMPV 抗原定性

イムノクロマト法による hMPV 抗原定性が 2014 年 1 月 1 日から、「画像診断により肺炎が強く疑われる hMPV 感染症の 6 歳未満の患者」に体外診断用医薬品として保険適用となり、日常診療において迅速、簡単に診断が可能となった。ただし、RSV、インフルエンザウイルス、hMPV の 3 個の迅速抗原定性を行った場合は、保険点数は 2 個だけ算定することになっている。現在、2012 年 4 月より販売されていた「チェック hMPV」(製造元: SA Scientific, Inc.; 製造販売元: 大蔵製薬株式会社; 販売元: Meiji Seika ファルマ株式会社)に加え、2014 年 2 月から新たに「プロラスト hMPV」(製造販売元: アドテック株式会社; 販売元: 株式会社 LSI メディエンス; 旧三菱化学メディエンス株式会社)が販売された。さらに他社からも販売予定である。

hMPV 抗原定性は RT-PCR 法より感度が低いため、迅速 hMPV 診断キットで陰性に出ても hMPV 感染を完全に否定するものではない。逆に、hMPV と他のウイルスとの重感染率は 5 ~ 20% あり、低年齢ほど重感染が多いため、迅速 hMPV 診断キットでバンドが濃い時は hMPV 感染症と考えるとよいが、バンドが非常に薄い時は他のウイルスとの重感染も考える必要がある。

Ⅴ. イムノクロマト法による hMPV 抗原定性の臨床的意義

ウイルスが原因で起きる風邪の大部分は 3 日以内に解熱することが多いが、hMPV の重症例は細菌の 2 次感染がなくとも平均 5 日程度の発熱がみられ、発熱が長いだけで抗菌薬は必要ない。聴診で呼気時の笛様音や吸気時の断続性ラ音があり、呼吸困難を示し、RSV 抗原が陰性で血液検査で細菌感染を示す所見がないとしても、原因が明らかでなければ患児家族は不安になり、医師も心配になり、抗菌薬の処方へとつながる。このような時に、迅速 hMPV 診断キットにより hMPV 感染症の診断ができることは、細菌による 2 次感染がないかぎり、不適切な抗菌薬の使用を避けることができる。治療は重症度に応じた対症療法が基本となるが、hMPV 感染症で呼吸困

難がある場合は、酸素投与、ロイコトリエン拮抗薬、気管支拡張剤、ステロイド(経口、静脈内投与、吸入)などの治療が行われることが多い。RSV による細気管支炎に対するステロイドの効果はほぼ否定されているが、hMPV 感染症においてステロイドの効果はまだ不明である。早期からブデソニド吸入を試みて入院を少なくできたという印象を著者はもっている。さらに重症患者にリバビリンや免疫グロブリンを使用し有効との報告もある。今後、hMPV 感染症に対する治療法の確立の検討にも迅速 hMPV 診断キットは有用である。

hMPV 感染症の大部分は不顕性感染、上気道炎と推測される。保育園、幼稚園で重症の hMPV 感染症の子どもが発症した時には、すでに周囲に hMPV 感染している子どもが存在し、その感染した子どもの大部分は軽症の風邪の状態ウイルスを排泄している。集団生活をしている保育園、幼稚園のように完全に隔離できない環境では感染を防御することは RSV と同様に困難であると思われる。そのため、hMPV 感染症の子どもが発症したからといって、周囲の軽症の風邪の子どもに hMPV の検査を行うべきではなく、保険適用のある「画像診断により肺炎が強く疑われる患者」にのみ使用すべきである。ただし、ハイリスクの子どもが多い病院では隔離が可能であるので院内感染を防ぐために hMPV の検査は重要である。迅速 hMPV 診断キットにより hMPV 感染症の診断が迅速にできることは、患児の重症化の予測や治療方針の決定、適切な抗菌薬の使用、患児家族の安心、また医師の安心にもつながると期待される。以上のように、RSV やインフルエンザウイルスと同様に、日常臨床の現場で簡便かつ短時間で診断を行うことが可能となった意義は大きいと思われる。

おわりに

今回、hMPV 抗原定性が「画像診断により肺炎が強く疑われる hMPV 感染症の 6 歳未満の患者」に保険適用されたことにより、日常臨床の現場で hMPV 感染症の診断が可能となった。高齢者施設での集団感染による死亡例も報告されており、早期に hMPV 抗原定性が高齢者へも保険適用されることを強く望む。

文 献

- 1) van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001 ; **7** : 719-724.
- 2) Ebihara T, Endo R, Kikuta H, et al. Human metapneumovirus infection in Japanese children. *J Clin Microbiol.* 2004 ; **42** : 126-132.
- 3) Kikuta H, Sakata C, Gamo R, et al. Comparison of a lateral-flow immunochromatography assay with real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol.* 2008 ; **46** : 928-932.
- 4) Ebihara T, Endo R, Ma X, et al. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent antibody test. *J Clin Micro.* 2005 ; **43** : 1138-1141.
- 5) Ishiguro N, Ebihara T, Endo R, et al. Immunofluorescence assay for detection of human metapneumovirus-specific antibodies by means of baculovirus-expressed fusion protein. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 ; **12** : 202-205.
- 6) Endo R, Ebihara T, Ishiguro N, et al. Detection of four genetic subgroup-specific antibodies to human metapneumovirus attachment(G)protein in human serum. *J Gen Virol.* 2008 ; **89** : 1970-1977.
- 7) Kikuta H, Ebihara T, Endo R, et al. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus(hMPV) using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma.* 2007 ; **26** : 17-21.
- 8) Executive summary. Proposed reclassification of the rapid influenza detection tests. CDRH Microbiology Devices Advisory Committee Meeting. June 13, 2013. Gaithersburg, Maryland.
<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/MicrobiologyDevicesPanel/UCM356185.pdf>