

総説

アデノウイルス感染症の診断 - 免疫クロマトキットを中心に -

藤本 嗣人

国立感染症研究所 感染症情報センター：東京都新宿区戸山1-23-1（〒162-8640）

Key Words アデノウイルス，免疫クロマトキット，ウイルス診断法，迅速診断

はじめに

近年，インフルエンザウイルス，RSウイルスなどの呼吸器系ウイルス，ロタウイルス，ノロウイルスなどの腸管系ウイルスとともにアデノウイルスの迅速診断が臨床現場で実施されている。アデノウイルスの特筆すべき点は，呼吸器感染症，腸管系感染症および眼感染症，さらに泌尿生殖器系感染症と多彩な感染症を引き起こすことである。アデノウイルス感染症を臨床症状だけで診断することは通常困難であり，その診断に免疫クロマトキット（以下 ICキット）が多用されている。本総説では，ICキットを中心にアデノウイルスの診断法について解説する。

バーであり，残りの240粒子がヘキソン蛋白である。ヘキソンおよびペントンベースから成る蛋白の殻の中に長さ約35,000塩基対の2本鎖DNAを持つ。

アデノウイルスの構造

アデノウイルスは，直径70～100nmの正20面体構造を持ち（図1），ウイルスの表面蛋白としてヘキソン，ペントンベース，ファイバーの3種類を持つ。アデノウイルス検出用のICキットおよびELISAキットは，ヘキソン蛋白に対するモノクローナル抗体を利用している。3種類の表面蛋白のうち，ヘキソンは1つのウイルス粒子に240個あり，ペントンベースおよびファイバーがいずれも12個であるのと比較して数が多い。ウイルス表面の20面体が252個の細かい粒子によって構成され，12個の頂点がペントンベースと，そこからアンテナのように突き出したファイ

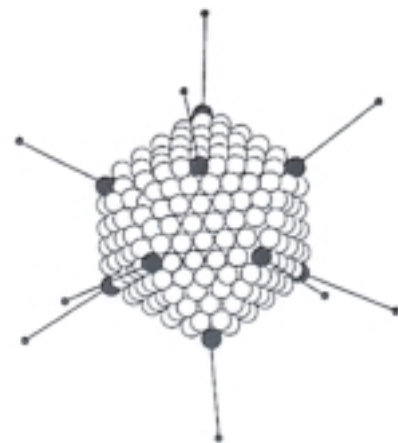


図1．アデノウイルスの構造

ウイルス粒子は正二十面体で直径70～100nm。240個のヘキソン（図の○）と12個のペントンベース（図の△の頂点の○）からなる。内部に二本鎖DNA（約35,000bp）を持つ。ペントンはペントンベース からファイバー（図の突起）が突き出した形状である。

■ アデノウイルスの複製

アデノウイルスは、細胞表面のレセプターにファイバーで結合して、細胞内取込みにより細胞内に入る。細胞内に入ると、蛋白の殻は除かれ、アデノウイルスDNAは細胞の核に入る。核内でDNAの複製、構造蛋白(ヘキソン、ペントンベース、ファイバー)の過剰な複製、ウイルス粒子の組み立てが行われ、ウイルス粒子は細胞の核内で結晶化する¹⁾。アデノウイルス粒子の組み立ての際、新たに合成されたウイルスDNAおよびウイルス蛋白の約10%が成熟したウイルス粒子になるとされ、ヘキソン蛋白が大過剰に合成される²⁾ことは、ICキットおよびELISAキットによる検出の際、有利に働く。また、ウイルスDNAが過剰に形成されることは、PCR法などのウイルスゲノムを検出する手法が、ウイルス分離よりも高感度である理由の一つと考えられる。

■ アデノウイルスの感染経路

アデノウイルスの感染経路はアデノウイルスの種類および血清型によって異なる。アデノウイルスは51種類の血清型が正式に認められ、それらはA～Fの6つの種のいずれかに分類される。

アデノウイルスは、呼吸器からの飛沫や接触で伝播することも多いが、主に腸管(糞口)感染により感染すると考えられている。呼吸器による感染は、BおよびE種が多い。C種は後述のとおり小児の糞便中に長期間排泄され、糞口感染により感染する。F種は糞口感染でのみ流行すると考えられている。眼にウイルスが入る様々な経路が考えられているが、D種では汚染されたタオル、指あるいはプール水などにより感染すると考えられている。D種の19および37型は性行為によって性器にも感染することが知られている。なお、アデノウイルス感染症の潜伏期は、呼吸器系で2～14日であり、腸管系では3～10日である。

■ アデノウイルスの消毒と治療

アデノウイルスの消毒には、塩素消毒が有効である。アデノウイルスはプール水を介して流行することが

ある。そのため、アデノウイルスの代表的な疾患である咽頭結膜熱はプール熱と呼称されることがある。アデノウイルスは眼、鼻・咽頭粘膜にウイルスを含んだ水が接触することで感染するため、プール水を消毒する必要がある。そのため、プール水は遊離残留塩素濃度が0.4mg/L以上、1.0mg/L以下となるように消毒を行うことと規定されている。我々は、有効残留塩素が規定以下のプールを介したアデノウイルス4型の流行を経験し、塩素濃度の適正化によって流行が終息したことを報告した³⁾。プール水においては、塩素濃度が適正に維持されることが重要である。

アデノウイルスはエンベロープを持たないDNAウイルスであり、消毒剤への抵抗性が強い。器具等の消毒には、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、フェノールなどの変性剤が有効である。しかし、これらは毒性があり、器具等をいためる可能性がある。アルコールはアデノウイルスに無効とする記載が見られることがあるが、アルコール系消毒剤であるウエルパス(丸石製薬)には、薬理効果としてアデノウイルス8型を30秒で99%不活化すると記載されている。ウエルパスは手指消毒用の薬剤として市販されている。次亜塩素酸ナトリウムによる消毒は、有効であり推奨できる。ただし、使用目的による濃度と有効期限に注意する必要がある。

アデノウイルス感染症に対する抗ウイルス剤はない。そのため、アデノウイルス感染症の治療は対症療法による。例えば8型による流行性角結膜炎は適切な症状の治療がなされなければ眼に後遺症を残すことがあるので、眼科医の指示に従って適切な治療を受ける必要がある。そのため、抗アデノウイルス薬の早期の開発が望まれる。

アデノウイルス感染患者は、血清中和抗体価が上昇する発症10日目頃まで周囲に感染させる恐れがある。ただし、アデノウイルス(特にC種)は無症候で数週間から数ヶ月にわたって糞便中に排泄されることがあるので、糞便を介した感染を防止するため手洗いの励行、タオルを共有しないなどの対策が考えられる。糞口感染を防止するための対策は、アデノウイルスだけでなく、ノロウイルス、エンテロウイルスなど他のウイルス性疾患の予防にも有効である。

■ アデノウイルスによる疾患とその検査検体

アデノウイルスの種による疾患は大まかに、A種（胃腸炎）、B種（呼吸器感染症、咽頭結膜熱、出血性膀胱炎）、C種（上気道感染症、咽頭結膜熱）、D種（流行性角結膜炎）、E種（呼吸器感染症、咽頭結膜熱）およびF種（胃腸炎）である。これらのうちA種（血清型12, 18および31型など）は検出頻度が低い。以下に他の種について概説する。

B種の3型および7型による肺炎は重症になることが多く、時に致死的とされる¹⁾。Kim Y.-J.ら⁴⁾の韓国における調査で、7型肺炎の致死率は18.0%（9/50例）で、3型の致死率は3.6%（1/28例）である。西村⁵⁾の日本における7型感染症に関する医療機関へのアンケート調査では、12.4%（11/89例）が呼吸不全（9例）、多臓器不全（1例）により死亡（1例は未記載）し、27.0%（24/89例）に後遺症が残っている。11型は出血性膀胱炎の病原体として重要である。14型は多くのウイルス学の教科書に咽頭結膜熱の起因病原体として記載されているが、日本での検出は非常にまれである。B種は、咽頭ぬぐい液の検査により検出可能である。ただし、出血性膀胱炎では尿検体の検査が必要であるが、ICキットで尿検体適用となっているものがない。尿にICキットを適用した場合は正確な検査はできないので、尿検体ではウイルス分離あるいはPCR検査等により検出する。ウイルス分離をする際、尿検体を凍結すると分離率が下がるので、注意が必要である。尿検体では、凍らない程度の低温で保存して、すみやかにウイルス分離検査を実施するのが良い。

C種アデノウイルス（1, 2, 5, 6型）は、小児に感染して数ヶ月～数年に渡って糞便中に排出される（機序は明らかでない¹⁾。したがって、C種アデノウイルスを糞便から検出した場合、その病原体としての意義は慎重に判断する必要がある。C種は扁桃炎等の上気道炎を引き起こし、咽頭ぬぐい液からICキットにより検出可能である。

D種アデノウイルスは、流行性角結膜炎の病原体として重要で、8, 19, 37型がその病原体として報告されている。8型による場合は特に重症であると

される。眼用のICキットによる迅速診断が可能である。また、院内感染を起こしやすい。

E種アデノウイルスは、4型のみであり、呼吸器感染症と眼感染症を引き起こす。

F種アデノウイルスは、40および41型の2つの型を含み、下痢症等の胃腸炎を引き起こす。糞便検体用のICキットで検出可能であり、F種に対するモノクローナル抗体を用いたELISAキット（アデノクローンE：テイエフピー社）を用いて糞便を検査すれば、検出と同時にF種アデノウイルスの同定が可能である。

なお、D, E, F種の主な検体採取場所は、おおまかにD種が眼、E種は咽頭および眼、F種は糞便である。

■ 検査検体の採取時期

堤ら⁶⁾によると、発病から1～4日目のICキットの検出感度は咽頭検体（アデノウイルス性呼吸器感染症が疑われた患者）で、培養細胞によるウイルス分離に対して80.4%（45/56件）で、5～11日目では61.5%（24/39件）であった。これらは、²試験において $P < 0.05$ で有意差があり、正確な咽頭検体の試験のためには、発病4日目以内にICキットで試験することが必要であることを示す。園府寺ら⁷⁾によると、アデノウイルス咽頭炎患者の咽頭中アデノウイルス量は $10^5 \sim 10^{10}$ コピー（アデノウイルスDNA）/mLであり、発熱後3～4日後をピークに徐々に減少し、10日を過ぎると 10^6 コピー程度（アデノウイルスDNA）/mLにまで減少した。我々の検討⁸⁾で免疫クロマトキットの検出限界は約 10^6 コピー（アデノウイルスDNA）/mLであることから、咽頭検体では発症後10日目が免疫クロマトキット陽性となる限界の目安であると推定された。

理論上は、10日目でも検出できる可能性があるが、確実な結果を得るために、発症後4日以内の検体を用いることが重要である。検査結果の解釈をする際、しばしば指摘されている検体採取手技によって免疫クロマトキットの結果が左右される点を、考慮に入れる必要がある。眼検体においても発症後4日以内の検体を用いることが重要である。

糞便検体の場合 前述¹⁾のとおりC種アデノウイルス

(1, 2, 5, 6型)の感染で数ヶ月～数年に渡ってウイルスが糞便中に間歇的に排出される。したがって, C種アデノウイルスを糞便から検出した場合, その病原体としての意義は臨床症状等で総合的に慎重に判断する必要がある。しかし, F種アデノウイルスが糞便中から検出された場合は胃腸炎の起因病原体である可能性が高い。F種アデノウイルス抗原検出用ELISAキットでは, 発症から6日以上経過した検体では陰性となる可能性があると記載されている。

検査法による検出感度は, 我々の検討⁸⁾ではPCR, リアルタイムPCR > ウイルス分離 > ICキットの順に高かった。ELISAはICキットとほぼ同等の感度とされている。PCRおよびウイルス分離では, 系によって検出感度に大きな差があるので, 比較においては手法を明示すべきである。

■ アデノウイルスの迅速診断

アデノウイルスの迅速診断の意義として,

- ・アデノウイルスの院内感染・施設内感染の拡大防止に役立つ。
 - ・アデノウイルス感染症は高いCRP値と高熱など, 細菌感染症との鑑別が難しい場合があり, 迅速診断によりアデノウイルスと同定できれば無駄な抗生物質を使用しないで済む。
 - ・アデノウイルス感染症であることが分かれば, 臨床経過の予測がしやすい
- などが特記すべき点と考えられる。

1. 迅速診断キット

アデノウイルス迅速診断法キットとして, 免疫クロマトキットおよびELISAキットがある。

1) 免疫クロマトキット (ICキット)

ろ紙中の標識抗体 (金コロイド等, 発色で確認できるもので標識) が, 検体中のアデノウイルスと反応して, 標識された抗体 - 抗原の複合物がろ紙中を毛細管現象で進む。毛細管現象で進む先に抗アデノウイルス抗体を結合させておくと, 進んできた標識抗体 - アデノウイルス複合物が補足されて目視確認できることによる手法である (図2)。1997年から市販され, 2007年7月現在10種類のキットが

市販されている (表1)。このうちチェックAd (アズウェル社), イムノカードSTアデノウイルス (テイエフビー社) およびキャピリア[®]アデノ (日本ベクトン・ディッキンソン) は眼検体と咽頭検体に使用できる。ラピッドテストロタ・アデノ (第一化学薬品) と, ディップスティック '栄研' アデノ (栄研化学) は糞便検査用である。キットは, 適用検体が増えることがあり, この数年でも適用検体が増えたものが見られる。清水ら⁹⁾によると, ラピッドテストロタ・アデノは検出感度が $10^{4.45}$ TCID₅₀/mLで, 同じ第一化学薬品から販売されているラテックス凝集反応キットより約10倍感度が良い。2007年7月現在, さらに咽頭用キット3種類および角結膜上皮細胞用キット1種類が市販されている (表1)。

免疫クロマト法の利点は, 10～15分で結果が得られる迅速性と, 操作の簡便性である。

2) ELISA

抗ヒトアデノウイルスモノクローナル抗体を利用した固相サンドイッチ法のELISAがキットとして市販されている (表1)。固相の抗体に結合したヒトアデノウイルスに酵素標識抗体が結合して, 陽性の場合に基質と反応して発色することでヒトアデノウイルスの存在を確認できる手法である。キットの反応時間は標準法で70分, 短縮法で40

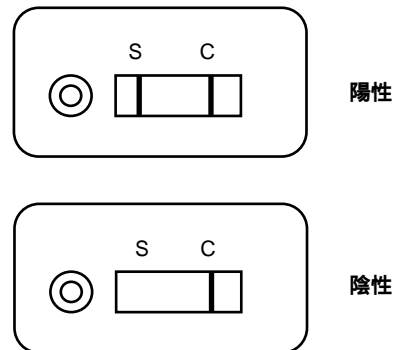


図2. 免疫クロマト陽性例と陰性例の模式図

表1. ヒトアデノウイルス検出用 免疫クロマトおよびELISAキットの種類 (2007年7月現在)

名称	測定原理	発売元	使用検体	適用する感染症			市販年
				呼吸器	眼	消化器	
アデノクロン	ELISA	テイエフビー	糞便 角結膜上皮細胞, 咽頭・扁桃上皮細胞				1992 (呼吸器検体に適用拡大は2001)
アデノクロンE	ELISA	テイエフビー	糞便				1993
アデノチェック	IC*1	明治乳業	角結膜上皮細胞				1997
ディップスティック 栄研 アデノ	IC	栄研化学	糞便				2000
チェックAd	IC	アズウェル	咽頭粘膜上皮細胞又は 角結膜上皮細胞				2001
ラビッドテスタロタ・アデノ	IC	第一化学薬品	糞便				2001
イムノカードSTアデノウイルス 「眼・咽頭用」	IC	テイエフビー	角結膜上皮細胞, 咽頭粘膜上皮細胞				2002
キャピリア アデノ	IC	日本ベクトン・ディッキンソン	角結膜上皮細胞, 咽頭粘膜上皮細胞				2003
キャピリア アデノ アイ	IC	わかもと製薬	角結膜上皮細胞				2005
クイックチェイサー Adeno 咽頭	IC	ミズホメディー	咽頭粘膜上皮細胞				2006
ラビッドテスタ ^{hs} アデノ	IC	第一化学薬品	咽頭粘膜上皮細胞				2007
ポクテムSアデノ	IC	シスメックス	咽頭粘膜上皮細胞				2007

*1: 免疫クロマト法

分である。ラテックス凝集反応や免疫クロマトキットと比較すると迅速性の点でやや劣る。しかし、表1に示した通り、1つのキット(アデノクロン:テイエフビー社)で呼吸器、眼および糞便のすべての測定が可能で、多検体を同時に測定できる利点がある。F種に属する40および41型はentericアデノウイルスと呼ばれ、感染症胃腸炎および乳幼児嘔吐下痢症の主要な病原体の一つである。ELISAキットのアデノクロンEは、F種を特異的に検出するので、下痢症患者の集団発生などでの病原体の特定に有用と考えられる。なお、F種は通常の細胞で難増殖性のウイルスである。

2. 検査における注意点

ICキットによる検査は、検出感度がHeLa細胞によるウイルス分離と比較して80%程度であるので検査陰性の結果がアデノウイルス感染症を完全に否定するものではない。できる限り検出率を上げるためには次の2点が重要である。

- ・前述したとおり、検体採取においては採取時期

が重要であるので発症4日以内の検体を用いる。

- ・検体採取で、炎症部位を強く擦過することが必要である。角結膜および咽頭・扁桃上皮細胞中にウイルスが存在するので、できる限り十分量の細胞を採取すること。

また、検査結果の評価においては、次の2点に注意する必要がある。

- ・便検体では、ICキットでは現在のところ、アデノウイルスが陽性か否かを調べているキットしかないため、C種アデノウイルスの持続感染を念頭に置くべきである。
- ・キットによって適用検体が異なるので、例えば咽頭検体用のキットで尿や糞便検体を試験した場合、偽陽性になる危険性があり、キットごとの適用検体と使用方法を守る必要がある。

3. ICキットに関わる話題

ICキットの評価において、ウイルス分離法を基準とするのが、最も信頼のおける方法と考えられている。しかし、我々はICキットでアデノウイルスが検

出された検体で、ウイルス分離を実施するとコクサッキーウイルスB群が分離される例に遭遇した。この場合、ウイルス分離をゴールドスタンダードとするとICキットの検査結果が偽陽性と判定される。我々は、この検体がアデノウイルスとコクサッキーウイルスB群の重複感染によることをリアルタイムPCRで定量的に示した¹⁰⁾。

ICキットの結果とウイルス分離の結果が異なる場合、重複感染の可能性を考慮すべきと思われる。

その他の診断法

迅速診断法以外のアデノウイルス診断法として、1 .ウイルス分離、2 .PCR検査、3 .リアルタイムPCR検査、4 .LAMP法、5 .制限酵素切断法、6 .ラテックス凝集法、7 .電顕法、8 .免疫蛍光法、が挙げられる。

1 . ウイルス分離

培養した細胞内でウイルスを増やす手法である。培養細胞としてHeLa細胞 (=HEp-2細胞)、RD細胞、A549細胞等を用いる。血清型によっては1ヶ月以上の期間を要するため迅速性がない点が大きな問題点である。特に8型などではウイルス分離に長期間を要する。しかし、生きたウイルスを得ることができ、現在でもゴールドスタンダードとされる。

2 . PCR 検査

数時間程度で結果が得られ、その後の塩基配列解析によって同一血清型内での系統解析等も可能であり、優れた検査法である。しかし、現在、アデノウイルス用PCRの系が多数存在し、その検出感度が異なるので、使用するPCR手法の選択が重要である。おおまかに、臨床検体中のアデノウイルスを直接検出できるものと、ウイルス分離後に適用するものがある。シーケンスおよび系統解析によって、血清型別が可能な場合が多い。我々は現在、アデノウイルスレファレンス活動を実施しており、多数存在するアデノウイルスに対するPCRの系を比較評価してマニュアル化する作業を実施している。

3 . リアルタイムPCR検査

ウイルス遺伝子の定量が可能であり、迅速である点で有用性が高い。通常の系では、型別ができない点が欠点である。

4 . LAMP 法

日本で開発されたゲノム増幅・検出手法であり、若林ら¹¹⁾は眼検体から1型、3型、4型、8型、19型および37型を直接的に検出する手法を報告している。

5 . 制限酵素切断法

アデノウイルス40および41型は下痢症患者の糞便中に大量に排泄される。排泄されたウイルスから直接にDNAを制限酵素で切断し、その電気泳動パターンによりウイルスを同定する手法である。

6 . ラテックス凝集法

アデノウイルスに対する抗体を結合させたラテックス粒子を用いて、アデノウイルスと結合して凝集塊が見られる場合に陽性と判定する手法である。ICキットより、やや感度が劣る。

7 . 電顕法

電子顕微鏡でアデノウイルス粒子を検出する手法である。現在でも下痢症検体で使用されている。

8 . 免疫蛍光法

気道、眼、尿、生検または剖検材料中の細胞内にアデノウイルス抗原が存在することを証明する方法として用いる。検査材料を低速遠心し、沈殿した細胞を固定してアデノウイルスに対する蛍光標識抗体でアデノウイルスを検出する。

これらの手法は、それぞれに特徴があり、ICキットおよびELISAの欠点である1 .型別ができない点、2 .定量ができない点、3 .組織での局在を観察できない点、4 .形態学的な観察ができない点、を補完する手法として使用することができる。

まとめ

近年、アデノウイルス迅速診断キットが小児科および眼科を中心とした臨床現場に普及しベッドサイドでのウイルス検査が可能となってきた。検査結果は、抗アデノウイルス薬が未だ存在しないため、特異的な治療には結びつかないが、二次感染を引き起こしやすいアデノウイルスを早期に診断する意義は感染拡大防止の点で大きい。免疫クロマトキットは簡便な操作で、高感度な実験室検査の80%程度の検出感度を持つが、検体採取時期および検体採取手技によって、検出率が下がることもあるので注意が必要である。検査陽性の場合、特に糞便検体での結果の解釈に注意が必要である。検査陰性の場合、アデノウイルス感染陰性と断定できない点に留意すべきである。

参考文献

- 1) White DO, Fenner FJ. Medical Virology. 4th ed. San Diego : Academic Press ; 1994. 306-316.
- 2) Hierholzer JC. Adenoviruses. In : Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 7th ed. Washington, D.C. : American Public Health Association ; 1995. 169-188.
- 3) 岡藤輝夫, 他. スイミングスクールを介したと推定されるアデノウイルス4型による咽頭結膜熱の流行. 臨床とウイルス. 2002 ; 30 : 270-274.
- 4) Kim YJ, et al. Genome Type Analysis of Adenovirus Type 3 and 7 Isolated during Successive Outbreaks of Lower Respiratory Tract Infections in Children. J Clin Microbiol. 2003 ; 41 (10) : 4594-4599.
- 5) 西村 章. アデノウイルス7型肺炎の全国調査結果. 病原微生物検出情報. 1998 ; 19 (7) : 6-7.
- 6) Tsutsumi H, et al. Immunochromatography Test for Rapid Diagnosis of Adenovirus Tract Infections : Comparison with Virus Isolation in Tissue Culture. J Clin Microbiol. 1999 ; 37 (6) : 2007-2009.
- 7) Kohdera U, Kino M, Ito M. Detection of Adenovirus DNA in Throat Swabs and Blood By SYBR green real-time PCR assay in patients with adenovirus-associated tonsillitis. Jpn J Infect Dis. 2006 ; 59 (6) : 394-396.
- 8) Fujimoto T, et al. Evaluation of bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, as compared to virus isolation, PCR and real-time PCR. J Clin Microbiol. 2004 ; 42 (12) : 5489-5492.
- 9) 清水英明, 他. イムノクロマトグラフィーを用いたロタウイルスとアデノウイルスの迅速診断キットの検討. 感染症学雑誌. 2001 ; 75 : 1040-1046.
- 10) Fujimoto T, et al. Detection of dual-infected cases of adenoviruses and coxsackieviruses type B by real-time PCR but not by the conventional viral culture technique. Clin Lab. In press.
- 11) Wakabayashi T, et al. Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. Curr Eye Res. 2004 ; 28 (6) : 445-450.

Diagnoses for Adenoviral Infections

Tsuguto FUJIMOTO

Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases,
1-23-1 Toyama Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640

Key Words Adenovirus, Immunochromatographic Kit, Diagnoses of Viruses, Rapid Diagnosis