

## 感染症患者検体の検査について

田中 司 永井正樹

**要旨** 2002年11月、中国広東省において outbreak した重症急性呼吸器症候群 (SARS; Severe Acute Respiratory Syndrome) は、ベトナム、香港、カナダなどを中心に世界的な感染の拡大を認めた。WHO によると2003年7月末までに8,088名の患者が報告され、そのうち774名の尊い命が奪われている。迅速かつ正確な SARS コロナウイルス特異的病原体検査の開発が、各国の研究者らによって進められておりますが、未だに標準化された方法は確立されていない。現時点では Polymerase chain reaction (PCR) や免疫血清学的な抗体検査などが中心となっているが、どの方法も発展途上にあるため感度や特異性などの点で問題を残しているのが現状である。このような感染症における診断、治療および感染対策を実施する上において、臨床検査の果たす役割は非常に重要である。とくに感染対策においては診断確定が迅速かつ効率的に行われることが必要であり、多様化した検査の選択、実施体制等を入念に検討し実践することが重要と考える。

(キーワード: SARS, コロナウイルス, 新感染症, PCR)

### CLINICAL LABORATORY EXAMINATION OF INFECTION DISEASE PATIENTS

Tsukasa TANAKA and Masaki NAGAI

**Abstract** The first cases of severe acute respiratory syndrome (SARS) were identified in November, 2002, in Guangdong Province, China. By July, 2003, the epidemic had spread worldwide, affecting 8,088 individuals resulting in 774 deaths. Severe acute respiratory syndrome (SARS) is a new emerging disease that has affected many countries, with more than 8,000 cases reported. A novel virus, the SARS associated coronavirus, has been identified as the causal agent. Researchers in several countries are working towards developing fast and accurate laboratory diagnostic tests for the SARS coronavirus (SARS-CoV). Polymerase chain reaction (PCR) can detect genetic material of the SARS-CoV in various specimens. However, existing PCR tests are very specific but lack sensitivity. This means that negative tests cannot rule out the presence of the SARS virus in patients. Current tests need to be further developed to improve sensitivity. Antibody tests detect antibodies produced in response to the SARS coronavirus infection. But they can be undetectable at the early stage of infection. ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbant Assay): a test detecting a mixture of IgM and IgG antibodies in the serum of SARS patients yields positive results reliably at around day 21 after the onset of illness. IFA (Immunofluorescence Assay): a test detecting IgM antibodies in serum of SARS patients yields positive results after about day 10 of illness.

(Key Words: SARS, coronavirus, new emerging disease, PCR)

#### コロナウイルスの検査法

まず国内における SARS の検査体制について説明する。現在、各保健所で収集した検体については各地方衛

生研究所において病原体の検査を実施する事になっている。しかし、現時点において PCR や他の検査を総合的に評価することは難しく、その結果については国立感染症研究所でダブルチェックをすることになっている。検

国立国際医療センター International Medical Center of Japan 臨床検査部

Address for reprints: Tsukasa Tanaka, Department of Clinical Laboratory, International Medical Center of Japan, 1-21-1, Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8655 JAPAN

Received November 4, 2003

Accepted December 19, 2003

体の送付方法は新型コロナウイルスの危険度がどの程度なのか確定していないため、バイオセーフティレベルのレベル3に相当する対応を取るという決まりになっている（参照：[http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003\\_04\\_25/en/](http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_04_25/en/)<sup>13)</sup>）。送付時の梱包の仕方などはWHO（参照：[http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003\\_04\\_25/en/](http://www.who.int/csr/sars/biosafety2003_04_25/en/)<sup>2)</sup>）や国立感染症研究所（参照：<http://idsc.nih.go.jp/others/urgent/update73-kensa.html><sup>3)</sup>）のホームページに掲載されている。次に検査の流れであるが、検体は鼻咽頭の拭い液、吸引液、気管支肺胞洗浄液、血清、尿、便、組織などを用いて検査を実施する。検査方法は病原体診断と抗体などを検出する免疫血清学的検査に大別される。病原体診断として確実なのはウイルスの分離であるが、操作が煩雑で容易には実施できず、分離までに7日間ほど時間がかかるため、迅速診断には不向きな方法であるということが言える。また、検体中に存在するウイルスの遺伝子RNAをDNAに転写し、それを増幅して検出するRT-PCRも実験室内の交差感染や偽陽性の問題があり、完全な方法とは言えない。PCRに関しては、WHOのホームページにおいてWHO研究ネットワークで検討した7つのプライマーが紹介されているが（参照：<http://www.who.int/csr/sars/primers/en/><sup>4)</sup>）、田代らは個々のプライマーの検出感度に差があるため、その選択を誤ると間違った解釈を招く危険性があることを指摘している（参照：<http://idsc.nih.go.jp/others/urgent/update56-b.html><sup>5)</sup>）。現時点におけるPCRの感度は約80%と言われており、PCRの結果を直接診断に結び付けることは出来ない状況である。また、検体別にみた検出率の調査では便からの検出率が高かったという結果も報告されている<sup>6)</sup>。一方、免疫学的検査は特異抗体を検出する方法であるが、この方法はseroconversionがおこって抗体が陽性化するまでに3週間ないしそれ以上の時間が必要であるため迅速診断には使用できない。抗体の検出法としては蛍光抗体法、中和抗体測定、ELISA法の3つが確立されている。しかし、血清を用いて検査する場合には、血清中にウイルスが存在する可能性があるため、ウイルスを不活化する必要がある。ウイルスの不活化は、血清を56℃に30分置くことにより抗体活性を損なうことなく、感染の危険性を落とすことができることが分かったので、この処理をしてから検査を実施することが世界的に行われている<sup>7)</sup>。蛍光抗体法では、ウイルス感染細胞と非感染細胞とを混ぜてスライドグラス上に固定し、非働化した血清を段階希釈してウイルスの抗原陽性細胞を固定化したプレートと反応させて、間接蛍光抗体法で検査する。中和抗体測

定はウイルスと希釈した血清を混和して中和反応をおこさせた後に残った感染価を定量する方法である。それぞれの結果評価は急性期とseroconversionをおこした回復期の間で4倍以上の抗体価の上昇があれば、seroconversionがおこったと判定される。ELISA法は抗原として感染細胞をそのまま可溶化して用いており、これを不活化してプレートに張り付けて間接ELISA法により測定しており、ほぼ満足のいく方法が確立されている。免疫血清学的検査の抗原はウイルス感染細胞を使用しているが、この抗原を調整するためにはP3の設備がなくては操作できない。したがって、遺伝子組み換えによるリコンビナント抗原の開発が強く望まれるところである。

### SARS患者の一般検査所見

SARS患者における一般的な検査項目所見を示す。血液検査部門では貧血は認められず、白血球数も通常は正常であるが、時として2万程度まで上昇した報告もある。もっとも特徴的な所見はリンパ球数の減少が認められることである。また、血小板は減少することが多いとされているが、正常な人も少なくない。次に生化学的検査では、Creatinineは正常、GOT、GPTはしばしば増加するという報告がある。CPKも症例によっては増加するケースがあり、これは悪寒や多臓器不全に関連していると考えられている。138症例の検査データを分析したNelson Leeらの報告<sup>8)</sup>によると、lymphopenia (69.6%)、thrombocytopenia (44.8%)、LDHの上昇 (71.0%)、CPKの上昇 (32.1%)と報告している。当院ではSARS疑い患者に対するルーチン検査として、血算、白血球分類、生化学セット、CRPなどを行うとともに、市中肺炎との鑑別目的で、寒冷凝集反応、血清マイコプラズマ抗体、グラム染色、レジオネラ培養、クラミジアニューモニエなども実施できる体制を整えている。次稿では、当院において新設された新感染症病棟内の検査室を紹介するとともに、臨床検査部門の対応について解説する。

### 新感染症病棟検査室の概要

当院は厚生労働省からの「特定感染症指定医療機関」への指定にともない、平成15年に新感染症病棟を新設した。新感染症病棟内には感染症病室がおのおの4室設置され、そのうち2室を挟む形で新感染症病棟内検査室（以下病棟検査室）が設置されている。人の五感では検知不可能な感染性エアロゾルは、人の動きや空気の流れによって拡散する。これらを物理的に一定の領域に封じ込め効率よく捕集するためには、感染性エアロゾルの分

Table 1 Relation of risk groups to biosafety levels, practices and equipment

| Risk Group | Biosafety Level                       | Laboratory type                               | Laboratory practices  | Safety equipment   |
|------------|---------------------------------------|---|---|--|
| 1          | Basic-Biosafety Level 1               | Basic teaching, research                      | GMT   | None ; open bench work   |
| 2          | Basic-Biosafety Level 2               | Primary health Services ; diagnostic research | GMT plus protective clothing, biohazard sign                              | Open bench plus BSC for potential aerosols   |
| 3          | Containment-Biosafety Level 3         | Special diagnostic research                   | As Level 2 plus special clothing, controlled access, directional air flow | BSC and/or other primary devices for all activities  |
| 4          | Maximum containment-Biosafety Level 4 | Dangerous pathogen units                      | As Level 3 plus airlock entry, shower exit, special waste disposal        | Class III BSC, or positive pressure suits in conjunction with Class II BSCs, double-ended autoclave (through the wall), filtered air |

散を限局させ流れを整流に保ち、そのエアロゾルを密閉された空間に閉じこめ、最終的に HEPA (high efficiency particulate air) フィルターを使用して捕集・除去することが必要である。WHO は実験室バイオセーフティ指針 (参照: <http://www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/Labbiosafety.pdf><sup>9)</sup>) の中に設備の程度に応じて実験室を 1-4 までの 4 段階に分類し、physical containment (物理的封じ込め) の頭文字である P と組み合わせて P1-P4 までの安全実験室の設備基準を提示している。Table 1 には病原体の危険度分類に対応した設備基準を示した。危険度 4 のウイルスを扱うには最高度封じ込め施設 (P4 レベル) が必要であるが、わが国において稼働している施設は現在のところ 1 ヶ所のみである。当院の病棟検査室は Fig. 1 に示した通り、前々室および前室を通過して検査室に入る構造になっており、3 重扉で外部と隔離されている。また、気流は外部から検査室内へと送られており、排気は HEPA フィルターで除菌された後に大気中に放出している。検査室内は消毒可能な構造でクラス II B2 型の安全キャビネットが設置されており、バイオセーフティレベル 3 (P3 レベル) に該当する設備を有している。検体の流れについては、特定感染症病室に入院した患者の検体は専用のパスボッ

クスから直接検査室に提出されることになっている。

#### 実施項目および測定機器

Table 2 には病棟検査室内にて測定可能な検査項目を示した。限られたスペースの中で制約を受けながら行う検査は必要最小限に抑えられるべきであり、当院の新感染症病棟運用マニュアル (以下運用マニュアル) にもその点が明記されている。機種を選定においては様々な条件を考慮する必要があり、特に機器の大きさは重要なポイントである。また、病棟検査室内では遠心分離操作をできる限り行わないようにするため、生化学分析装置は遠心分離操作無しで血漿を分離し測定可能な機種を選定した。どうしても遠心分離が必要な場合は、血液 1 ml

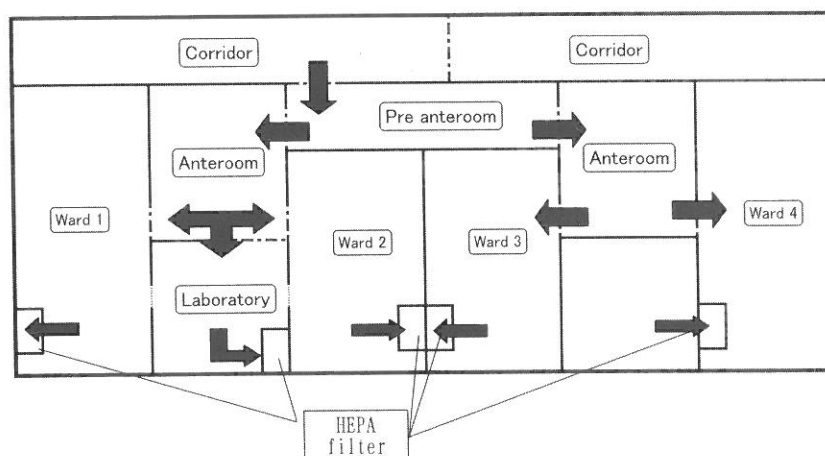


Fig. 1 Air current in infectious ward

Table 2 The analytes which can be measured in laboratory

|                    |   |
|--------------------|---|
| Clinical chemistry | TP, ALB, T-BIL, D-BIL, AST, ALT, LDH, ALP, CK, CK-MB, AMY, UN, CRE, UA, Na, K, Cl, T-CHO, GLU, NH <sub>3</sub> , CRP  |
| Hematology         | WBC, RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, PLT, PT, APTT, Fibrinogen, Thrombotest  |
| Blood gas analysis | pH, PCO <sub>2</sub> , PO <sub>2</sub> , HCO <sub>3</sub> , TCO <sub>2</sub> , BE, BEest, SBC, SaO <sub>2</sub> C, Na <sup>+</sup> , Ca <sup>++</sup> , Hct |
| Microbiology       | Blood culture   |

あたり10  $\mu$ l の Triton-X100を加え、1時間放置する方法で分離を行っている。

#### 患者発生時の業務フロー

患者発生時には院内連絡網により病院長から臨床検査部長宛に一報が入るシステムになっている。その後検査部内にて作成した連絡網に則って臨床検査技師長、病理医長、副臨床検査技師長および各主任技師や技師に伝達される。臨床検査部内の連絡網は勤務時間内と勤務時間外に分けて作成し、時間外については病院近隣に居住する者を対象に作成した。検査担当者は新感染症病棟内の看護室に出向き、状況を聴取した後に個人防護用具 personal protection equipments ; PPE (マスク、ゴーグル、手袋、ガウン、キャップなど) を着用して病棟検査室に入室する。病棟検査室と隣接する2室の特定感染症病室からの検体はパスボックスを通じて提出されることになっている。このパスボックスは検査室側と病室側の両方に扉が設置されているが、両方同時には開かないような作りになっており、各部屋の気密性が保たれるようになっている。検査結果は現在までのところ病棟内検査室内に設置されている PHS 電話から主治医もしくは看護師宛に報告しているが、今後は院内 LAN を利用したシステムの構築が強く望まれるところである。一方、残った検体や検体付着物および使用した器具等はすべてオートクレーブをかけた後に感染性廃棄物として処理し、バイオハザードベンチや机、椅子、床、壁なども0.5%次亜塩素酸溶液を浸したガーゼ等で清拭する。また、個人防護用具の脱ぐ手順は感染の拡大を防止する上において非常に重要であり、運用マニュアルによって詳細に規定されている。

#### 平常時の管理

平常時の管理は1週間に一度病棟検査室に出向いて各測定機器のメンテナンス、試薬や消耗品のチェック、内

部精度管理および部屋の清掃などを行っている。各測定器のメンテナンスは測定器毎に作成したチェックリストに則って実施し、試薬の使用期限や交換時期なども併せてチェックしている。検査試薬は血液凝固検査以外すべて専用試薬であるため、通常の検査室との供用が不可能であり、使い終わらないうちに使用期限を迎えるものもあって、採算性の維持には大変苦慮するところである。また、検査担当者による定期的なトレーニングも実施しており、非常時における万全な体制作りに向けて鋭意努力しているところである。

#### ま と め

新感染症への対応は、今後一層複雑化するとともに、きわめて迅速な対応が強く求められてくるものと予想される。臨床検査は感染対策において、感染症の定義、検査計画から結果解釈、対策の意志決定に至る全過程において非常に大きな役割を持っている。したがって、臨床検査部門は、病院感染制御の活動に中心的メンバーとして積極的に参加し、安全な医療の遂行に貢献できるよう努力しなければならない。また、臨床をはじめとした他職種とのコミュニケーションをより円滑に行い、互いの知識を集積し合いながらコンセンサスを得ていくことが重要であると思われる。

#### 文 献

- 1) WHO : WHO biosafety guidelines for handling SARS clinical specimens and materials derived from laboratory investigations of SARS. WHO biosafety guidelines for handling of SARS specimens. 25 April 2003
- 2) WHO:Transport of human specimens. WHO biosafety guidelines for handling of SARS specimens. 25 April 2003
- 3) 国立感染症研究所感染情報センター ; SARS コロナウイルスに関する検査対応について (3訂). June 2003
- 4) WHO : PCR primers for SARS developed by WHO Network Laboratories. 17 April 2003
- 5) 国立感染症研究所感染情報センター : RT-PCR 法による SARS コロナウイルス遺伝子の検出. May 2003
- 6) Peiris JSM, Chu CM, Cheng VCC et al : Clinical Progression and Viral Load in a Community Outbreak of Coronavirus-associated SARS Pneumonia A Prospective Study. Lancet 361 : 1767-1772, 2003

- 7) 田代真人：ウイルス学的診断. 感染症誌 77 : 582-586, 2003
- 8) Nelson L, David H, Alan W et al : A Major Outbreak of Severe Acute Respiratory Syndrome in Hong Kong. N Engl J Med 348 : 1986-1994, 2003
- 9) WHO : General principles. Laboratory Biosafety Manual second edition. April 2003  
(平成15年11月4日受付)  
(平成15年12月19日受理)