

3. ウイルス感染症の診断と検査方法

加瀬 哲男

はじめに

病気の診断はもちろん臨床診断から始まる。感染症の診断も例外はなく、医師は患者の症状と問診からその患者の疾患（名）を予想し、確定診断するための準備に入る。感染症の確定診断は大きく分けて2つある。すなわち病原体診断と血清診断である。新型コロナウイルス感染症もこの2つの診断方法が確立されつつある。

一般的に、感染症の病原体診断で最も重要なことは3つある。まず第1に原因となる微生物が存在する臓器（部位）に由来する検体を採取することである。ただ疾病によっては、表現される症状と直結する臓器に微生物の直接侵襲がみられない場合（脳症や発疹）もあるので、その場合は経験則にあわせて病原体の増殖部位に由来の検体を採取する。この時陽性となった場合は、感染と症状の因果関係は慎重に検討されなければならない。第2に原因となる微生物が存在する時期に検体採取することである。一般的には最も強い症状を呈している時に病原体も最も多く増殖していると考えられるが、疾病によっては症状の強弱と病原体の増殖が直線関係にないこともあるので、検体採取時期は個々の疾病で規定される。最後に診断の目的に最も適した検査方法を選択することである。後述するが、微生物検査はその方法によって得られる結果に質的情報の差異がある。そのため、どのような微生物情報が入手できるかということを常に考えて検査方法を選択すべきである。ただし、新型コロナウイルス感染症は、とりあえず人類が初めて遭遇したウイルスであるので、どのような方法であれウイルス検査陽性は、症状の有無や感染源である可能性に関係なく、新型コロナウイルスに感染していることを意味している。

現状で最もよく汎用されている遺伝子検査は、過去の経験則を含めたその検査状況をよく見極めたうえで、結果を解釈する必要があることは強調しておきたい。

血清診断でも、最も重要なことは、対象微生物に対する抗体が出現している時期に採血することである。また、患者の状態を正確に把握するためには、検出抗体の特性がわかる必要があるので、抗体の検出方法も重要な選択肢の1つとなる。

以下においては新型コロナウイルス感染症について考察していきたい。

検体の種類

新型コロナウイルス感染症は発熱と呼吸器症状を主症状とする疾患であるので、呼吸器に由来する検体が第一選択肢になると思われる。ただし、呼吸器由来検体でも、鼻汁または鼻腔洗浄液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、唾液、喀痰、気管肺胞支洗浄液がある。また、全身感染する疾患でもあるので、その他検体、便や血液や尿も検査対象になる^{1,2)}。では、それぞれの検体の検査はどのような意味をもっているのか。まず上気道由来検体（鼻腔拭い液か、咽頭拭い液、鼻腔洗浄液、唾液）が陽性になるということは、おそらくウイルスが上気道部位で増殖していると思われる。そのためこれらの検体でウイルスが陽性になるということとその患者が呼吸器系の感染をおこす感染源になりうることを示していると思われる。ただし、下気道や消化器系の臓器でウイルスが増殖した結果としてウイルスが検体に紛れ込むことも考えられる。どちらかといえばこの時はウイルス量としては少なく検出されられると思われる。喀痰や肺胞洗浄液などの検体が陽性になればウイルスの下気道での増殖が考えられる³⁾。この場合、大きく咳き込むなどしなければ感染源にはなりにくい。肺での直接的な増殖は重症度に結びつくものと思われる。便から検出された場合は通常は腸管を初めとして消化器系臓器での増殖を意味するが、気道で増殖したウイルスが食道を通過して便に混入したことも考えら

れる。

新型コロナウイルス感染を疑ったときに通常行われる検査は上気道由来検体で検査されることが多い。それでは検体の種類は何を選択すればいいのだろうか？検体に含まれるウイルス量を考えると鼻腔洗浄液が最も多くのウイルスを含んでいると思われるが、検体採取の面からみれば、鼻腔洗浄液よりは、鼻腔拭い液か咽頭拭い液が選択されていると思われる。ただし、これら拭い液にしても検体採取の際に、患者にくしゃみなどを誘発させ、医療従事者に感染させる可能性があるため、慎重な取り扱いが求められる。鼻腔拭い液か咽頭拭い液のどちらの検体の方が感度がいいかという問題も提議され、鼻腔拭い液が優れているという報告もあるが、最終的な結論はでていないと思われる。唾液は一般的には感度が低いと考えられるが、検体採取の手順を考えると最も簡易だと思われるので、充分感度が保証されるのであれば、唾液を用いた検査の有用性は高いと思われる⁴⁾。

下気道由来検体は患者の病勢を測るのに適している。肺にウイルスが見つからなければ、サイトカインストームなどがなければ軽症と分類されると思われる。逆に肺中のウイルスは、なかなか排除されず、比較的長期に渡って検出されることがわかっている。Wölfelらの報告では抗体が産生されるようになっても喀痰からウイルスの遺伝子は検出されている³⁾。世界および日本で一度陰性が確認されてから再度陽性になる例が少なからず存在しているが⁵⁾、これらの例では、肺など体内からウイルスは排除しきれずに残存していたウイルスが再度増殖したとする考え方が受け入れやすい。

新型コロナウイルスは便からしばしば検出されることが報告されている⁶⁾。SARS コロナウイルスや動物のコロナウイルスは腸管での増殖が普遍的であり、新型コロナウイルスもおそらくは腸管内で増殖するものと考えられる。また、便中のウイルスは排泄期間も長く発症後30日超えるという報告もあり、便の取り扱いに警告を発している。ただし、糞口感染によって感染拡大したと思われるSARSのような集団発生は報告されていないので、今のところ糞便が集団感染の感染源にはなっていないと思われる。

検体採取の時期

いわゆるウイルス性の急性感染症では、症状の出現とウイルスの検出は同時期に始まり、ウイルス排出のピークが症状の最盛期となり、症状の改善とともにウイルス排泄量は減少していく。すなわち、感染から発症までの潜伏期、および急性感染症でも症状が遷延した場合にはウイルスは検出されないことが多い。したがって急性ウイルス感染症では、症状が出始めてから数日間（1週間

以内）が検体採取に最も適切な時となる。

ただし、今回の新型コロナウイルスでは、相当長期に渡ってウイルスの検出が可能であると報告されている⁷⁾。特に発症する以前の数日からウイルス検出が可能であり（これは発症以前から感染源となりうるということを示唆している）、また、上述したように、肺や腸管などに由来する検体では発症後20～30日でもウイルスRNAが検出されている。

新型コロナウイルスは、21世紀に入って人類が初めて遭遇したウイルスなので、現時点では不顕性感染者も含めてウイルスが検出された人は全て感染者となる。そういう意味で感染を確認する（確定診断する）ということならば、検体採取時期が多少ずれたとしても検体の選択に間違いがなければ、既知の感染症のように見逃すということは、少ないと思われる。ただし、感染源としての役割を考えるなら、発症前の潜伏期から発症後1週間くらいまでに採取された検体で判断されるべきであろう^{8,9)}。

検査方法の選択

昨今の感染症の病原体診断では、遺伝子診断が最も取り入れられているようであるが、まず、主要な病原体の診断方法について、その結果の判断に当たっての必要な基本的事項について述べていきたい。ウイルス感染症では、病原体診断は主に3つの方法がある。すなわちウイルス分離、抗原検出、核酸検出である。

ウイルス分離は、ウイルス感染症を診断するうえでも、疫学的事項を理解するうえでも最も基本となる情報を与えてくれる重要な方法である。ウイルス分離陽性は生きたウイルスが検出されることであり、ウイルスがその検体由来臓器で活性のある形で存在していたこと、つまり増殖しており、かつ検体中でも生存しており、その患者が感染源としての役割を果たし、感染拡大していく可能性を示している。ウイルス分離陽性はその患者がウイルスに感染していることを示す最も信頼性の高い方法である。新型コロナウイルスは、ノロウイルスのような培養困難なウイルスとは異なり、どちらかという培養細胞で増殖しやすいウイルスと思われる¹⁰⁾。また、分離ウイルスは、ウイルスの全ての情報を持ち、ウイルス遺伝子情報、構成蛋白、免疫原性等を明らかにし、さらにはワクチンの候補の親株になり、ウイルスゲノム進化を経時的に解析するにも最も適切な材料となるものである。ただし、ウイルス分離には熟練した技術と嚴重な設備が必要なことと、ウイルス分離の陽性判定までに7～14日を要することから、多数の検体を検査するには不適である。そのため、ウイルス分離は検査目的というよりは研究目的で実施されることが多い。しかしながら、今回の世界的な流行では少なからずウイルス分離試験が実施

され、患者の感染源の役割は発症する前と発症後の数日であることが示されており、発症後10日過ぎると感染源としての役割は非常に減じること（ウイルス分離ができなくなること）が報告されている³⁾。

ウイルス抗原検査は、抗原抗体反応を利用して、ウイルス蛋白を検出する方法で、抗原検査陽性は検体中にウイルス蛋白が存在すること、すなわちウイルスが増殖サイクルにあることを示している。ウイルスは生きた細胞の中でのみ増殖可能であり、通常の抗原検査は増殖過程にない微量のウイルス蛋白を検出することはないので、抗原検査陽性は、その検体が由来するその臓器内でウイルスが増殖していた証拠と考えられる。一般的には抗原抗体反応は特異性が高いと考えられるが、インフルエンザなどで多用されている一般臨床で用いられる迅速診断キットは、一定の割合で非特異反応がでることがわかっている。また、発色を観察するように視覚で判定することが多いため、陽性と判定されるにはある程度の抗原量を必要にする。そのため検査結果の判定には、一定の技術水準も必要と思われる。

最近、鼻咽頭拭い液を対象とした酵素抗体法を基礎にしたイムノクロマト法を採用した迅速診断キットが新型コロナウイルス感染症診断に導入された¹⁾。これまでにインフルエンザ診断などのウイルス感染症の診断に用いられており、方法論としては確立している。また唾液を対象にした抗原検査試薬も承認された。いずれも抗原検出を目的にしているため症状早期（発症後9日まで）の診断に適応されるとなっている。これは、症状早期は上気道検体中にウイルス抗原が多く含まれるという病理に一致しているものと思われる。

ウイルス核酸の検出は、ウイルス遺伝子を検出するもので、検体中に全ウイルスゲノムを直接観察できる方法なら、この検査の信頼性は非常に高いものになる。しかし、実際行われている遺伝子検査はReverse Transcription-Polymerase Chain Reaction（本稿では以下PCRと略す）を代表とする遺伝子検査で、これは人工的に生化学的に試験管内で検体中に存在する少量の遺伝子を何千万倍、何億倍にまで増幅させた遺伝子産物を観察する（機械的に検知する）ものである。現在では遺伝子の増幅方法にいろいろな工夫があり、PCR法以外にも実用化されているようだが、ここでは、まだ多くの検査所で採用されていると思われるPCR法^{1,2)}に限って考えてみたい。PCR法の大きな特徴の1つは、非常に短いウイルス遺伝子の断片を検出することでもある。コロナウイルス遺伝子はおよそ30,000塩基長であるが、PCRではせいぜい~300塩基を検出しているに過ぎない。念のために異なった部位の複数の遺伝子を検出する方法を採用しているが、全長無傷のウイルスゲノムが存在しなくても検出されること、非常に少量の数コピーのウイルス遺伝子

でも検出されることは、感染性のウイルスの存在を全く意味しない。上述したように今回の新型コロナウイルスは人類が21世紀に入って初めて遭遇したウイルスなので、断片といえどもウイルスの遺伝子が人体に由来する検体から検出されれば、その検体の提出者はウイルス感染していると判断できることは確かである。ただし、検体が上気道に由来するものだけの場合などは、その感染者が病気の自然史の中でどのような状態にあるかの判断は非常に難しい。よりよく病態を理解するには、下気道あるいは便など検体の種類を増やす、あるいは経日的に検査する、さらにPCRの結果からウイルス（コピー）量を推測するなどが必要となる。

病原体検査結果の判断

ウイルス分離が陽性ならウイルスが活性状態にありその患者は感染源となり、ウイルス抗原が陽性ならウイルスは少なくとも検体由来臓器で増殖過程にあり、PCR陽性はその患者が少なくともそのウイルスの感染者である事実が判明する。それらの結果と症状などの患者情報と疫学情報を組み合わせて、病態の理解を進めることになる。例えばPCR陽性、ウイルス分離陰性という結果の解釈はどのようなものになるだろうか。これは発症後期によく認められそうだが、ウイルスの存在は確認できるが感染性粒子は検出されないということでウイルス学的にはウイルスの成熟粒子が充分産生されていないことを示していると思われる。また、単純に人工的に生化学的に増幅した核酸を検出するPCR法は検出感度が生物活性より高いことを示し、他のウイルス感染症でもよく観察される現象である。遺伝子の存在と生物活性の欠如との関係は、多数の症例を検討することにより明らかにされると思われるが、PCR検査陽性と病態との関係の難しさを表わしている。

検査結果が陰性の場合の解釈は複雑である。検査結果が陰性の場合に共通して考えられることは、第一にその検査した検体中にウイルスが含まれていなかったということである。いずれにしてもこの場合の検査は陰性であるが、検体提供者の感染が否定できるわけではない。検査した検体以外の部位から採材していれば、感染者なら陽性になったかもしれないし、検査日が変わっていれば陽性になる可能性もでてくる。

次に考えられるのは、検査の感度が充分でなかった場合である。非常に少量のウイルスが含まれていたが、検出される濃度に達していないため、ウイルス検査が結局陰性と判定された。あるいは、試薬等に不備があり、検体に含まれるウイルスに反応しなかった。または、検体を輸送・保存している間にウイルスが不活性化された（ウイルス分離試験のみ）、あるいはウイルス蛋白や核酸が

表 1. 新型コロナウイルスの病原体診断のための検体の種類と検査方法

検体の特性	検体の種類						参考文献および入手可能な参考資料
	鼻汁・鼻腔洗浄液 鼻腔拭い液 咽頭拭い液	唾液	喀痰 肺胞洗浄液	便	血液	尿	
検体採取者	厳重な PPE	被験者	厳重な PPE	被験者	通常の PPE	被験者	17, 18
採取時期	症状早期～中期	症状早期	症状中期～後期	症状中期～後期	病原体診断のためには不適	病原体診断のためには不適	2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 18
検査方法							検査手技の注意点
イムノクロマト法 (抗原検出)	適	適					11, 19
PCR 法 (遺伝子検出)	適	適	適	適			専門的手技と知識および専用機器が必要 12, 16
ウイルス分離	適		適				専門的手技と知識および専用施設が必要 3, 9, 10

PPE (Personal Protective Equipment)

分解されたなどがある。この場合の解釈は、検体提供者はウイルス感染していたが、手技等の不備で検査が陰性と判定されたことになる。日程を含めた他の検査機会があったなら、陽性と判断できたかもしれない。いずれにしても検査結果陰性が直接感染を否定できるものではないので、症状、周囲の感染状況、本人の行動歴などから感染を強く疑った場合は、再検査あるいは後述する抗体検査の結果をもって最終判断とすべきであろう。状況によっては、たとえ病原体診断が陰性であったとしても新型コロナウイルス感染症と診断される事例があるかもしれない。

ここまで紹介した内容について表 1 にまとめた。病原体の検出は感染症の診断を確定するためには最も有意なことである。ただその解釈は新しい感染症のこともあり未だ確定していない。今後の事実の蓄積が重要となってくる。最後に新型コロナウイルス感染症では、無症状の人からの感染が明らかにされている¹³⁾。通常、無症状者の検査は行われませんが、濃厚接触者などの積極的調査によってその事実が明らかにされたと思われる。また、病院によっては手術前検査の一環として実施されたようである。今後このような症状を有しない人が集まる特定集団で検査が行われるようであるが、検査結果をどのように解釈するかを予め十分に議論しておくことが望ましい。

血清診断

いくつかの報告によって、新型コロナウイルスに感染すると発症後 10～14 日後にウイルス特異的 IgG の上昇が観察されている^{3, 14)}。同時期にウイルス特異的 IgM はあまり検出できないようなので、IgM はウイルス感染の診断マーカーには使用できないようである。そのため、新型コロナウイルス感染症の血清診断にはペア血清

を用いた抗体測定を行うことになる。抗体測定には蛍光抗体法、酵素抗体法、中和抗体法など^{3, 14, 15)}の報告があるが、回復した感染者の 1/3 は、抗体反応が悪いという報告もある¹⁴⁾。逆に言えば抗体出現と体内からのウイルス排除は直接的な関係がなく、このことは抗体が出現しても肺内のウイルス RNA は急激な減少を示さないという報告とも矛盾しない。おそらくウイルス排除には細胞性免疫が重要な役割を果たすものと思われる。

現在、単一血清による抗体価測定が試行されている。著者はこれらに使用された測定キットを承知しているわけではないので、詳述できないが、公表された感染率は 1% 以下であった。今回の新型コロナウイルス感染症は 21 世紀に入って初めて遭遇したウイルスであるので、血清中にウイルス特異抗体が検出されれば、この冬から春にかけての流行で感染したことが証明されることになるが、人に感染するコロナウイルスは他にも存在するため交差反応で検出される抗体が存在するのかもしれない。抗体検査による prevalence の算出にはもう少し詳細なデータが必要となってくるとと思われる。

雑感 特に PCR 検査にむけて

検査手法には必ず感度と特異度が取り上げられる。感度とは真の陽性者の中でその検査法によって検出される尺度であって、特異度とは真の陰性者を陰性者として検出する尺度である。この春 PCR 検査の感度・特異度が明らかにされないまま PCR 検査の議論がすすめられたような気がしてしかたがなかった。それは、なぜか？科学が進み特に感染症の検査では遺伝子検査は欠くべからざるものになり、原因となる病原体の遺伝子構造が明らかにされるやいなや、ウイルス検出用のプライマーやプローブが次々に発表された¹⁶⁾。ところが、新しい検査の感度は真にその病原体に感染している人の何パーセン

トを検出できるかである。しかしその真に感染しているかどうかはPCRで決めている。この時からPCR陽性者とPCR陰性者の意味をよく理解しないで議論がすすめられた。今となっては、真の新型コロナウイルス感染者は、検体の種類にかかわらず、検体採取日にかかわらず、ウイルスが検出された、あるいは特異抗体が検出された人と定義できる。これをゴールドスタンダードと呼ぶこともできる。その人たちを母数として例えば発症7日以内の咽頭拭い液を用いたPCR検査陽性の人の割合が、その検査の感度となる。他にはゴールドスタンダードに対して、糞便検体を用いた時のPCR検査の感度とか、唾液を用いたイムノクロマト法の感度とかである。今年の新型コロナウイルス感染症に関しては、このゴールドスタンダードが定義されていない状況でPCR検査だけが独り歩きしたために、多くの識者まで混乱の渦に巻き込まれたと思われる。

そのため、マスコミの連日のPCRキャンペーンを別にしても、新型コロナウイルス感染症の検査に関しては、百家争鳴状態となった。ただし、検査は単独で議論されるものでなく、あくまでも診断のための検査であり、診断の結果は治療方針に繋がり、それらは全て医療体制の維持に結びついていくものでなければならない。そして新型コロナウイルス感染症に限らず、あらゆる健康被害を最小限に留めることが重要であって、新型コロナウイルスの検査が最優先であるかのような議論は為にならず、健康に関して包括的な議論が進められるべきであった。安易な検査は、安易な結果を生み出すだけで、結果責任を伴わなくなることが多い。新型コロナウイルス感染症にかかわった全ての関係各位には、結果責任の伴った発言に留意し続けていただきたいものである。

利益相反：開示すべき利益相反はない

文 献

- 1) Wang W., Xu Y., Gao R., et al. (2020) Detection of SARS-CoV-2 in Different Types of Clinical Specimens. *JAMA*. ; 323(18) : 1843-4.
- 2) Cheng, P. K. C., Wong, D. A., Tong, L. K. L., et al. (2020) Viral shedding patterns of coronavirus in patients with probable severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2004 ; 363(9422) : 1699-700.
- 3) Wölfel R., Corman V. M., Guggemos W., et al. (2020) Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019. *Nature*. ; 581(7809) : 465-469.
- 4) To K. K., Tsang O. T., Chik-Yan Yip C., et al. (2020) Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis*. 2020 Feb 12 : cial149. doi : 10.1093/cid/cial149.
- 5) Peng J., Wang M., Zhang G., Lu E., (2020) Seven discharged patients turning positive again for SARS-CoV-2 on quantitative RT-PCR. *Am J Infect Control*. ; 48(6) : 725-726.
- 6) Wu Y., Guo C., Tang L., et al. (2020) Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. *Lancet Gastroenterol Hepatol* ; 5(5) : 434-435.
- 7) Zhou F., Yu T., Du R., et al. (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China : a retrospective cohort study. *Lancet* ; 395(10229) : 1054-1062.
- 8) He X., Lau E. H. Y., Wu P., et al. (2020) Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat Med*. ; 26(5) : 672-675.
- 9) Arons M. M., Hatfield K. M., Reddy S. C., et al. (2020) Presymptomatic SARS-CoV-2 Infections and Transmission in a Skilled Nursing Facility. *N Engl J Med* ; 382(22) : 2081-2090.
- 10) Chu, H., Chan, J. F-W., Yuen, T. T-T., et al. (2020) Comparative tropism, replication kinetics, and cell damage profiling of SARS-CoV-2 and SARS-CoV with implications for clinical manifestations, transmissibility, and laboratory studies of COVID-19 : an observational study. *Lancet Microbe* Published Online April 21, 2020 [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30004-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30004-5)
- 11) 新型コロナウイルス感染症診断薬の承認について 厚生労働省 <https://www.mhlw.go.jp/content/12404000/000629734.pdf>
- 12) 病原体検出マニュアル 2019-nCoV Ver.2.9.1 国立感染症研究所 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/2019-nCoV20200319.pdf>
- 13) Pan X., Chen D., Xia Y., et al. (2020) Asymptomatic cases in a family cluster with SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis* ; 20(4) : 410-411.
- 14) Wu, F., Wang, A., Liu, M., et al. (2020) Neutralizing antibody responses to SARS-CoV-2 in a COVID-19 recovered patient cohort and their implications. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.03.30.20047365>
- 15) COVID-19 血清学的検査マニュアル 国立感染症研究所 https://www.niid.go.jp/niid/images/pathol/pdf/COVID-19Serology_Ver1.pdf
- 16) Summary table of available protocols in this document. WHOfile : <:///C:/Users/C131/Desktop/Downloads/whoinhouseassays.pdf>
- 17) Marty F. M., Chen K., Verrill K. A., (2020) How to Obtain a Nasopharyngeal Swab Specimen. *N Engl J Med* ; 382(22) : e76.
- 18) Williams E, Bond K, Zhang B, P. et al. (2020) Saliva as a non-invasive specimen for detection of SARS-CoV-2. *J Clin Microbiol* : JCM.00776-20. doi : 10.1128/JCM.00776-20.
- 19) 新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 抗原検査キット製造販売承認の取得について みらかホールディングス株式会社 <https://ssl4.eir-parts.net/doc/4544/tdnet/1827081/00.pdf>