

## 重症急性呼吸器症候群 (SARS) 診断のための遺伝子検査法の確立

新開 敬行<sup>\*</sup>, 貞升 健志<sup>\*</sup>, 長谷川 道弥<sup>\*</sup>, 田部井 由紀子<sup>\*</sup>, 長島 真美<sup>\*</sup>,  
吉田 靖子<sup>\*\*\*</sup>, 甲斐 明美<sup>\*</sup>, 諸角 聖<sup>\*\*</sup>

### Establishment of Genetic Diagnosis for Severe Acute Respiratory Syndrome ( SARS )

Takayuki SHINKAI<sup>\*</sup>, Kenji SADAMASU<sup>\*</sup>, Michiya HASEGAWA<sup>\*</sup>, Yukiko Tabei<sup>\*</sup>,  
Mami NAGASHIMA<sup>\*</sup>, Yasuko YOSHIDA<sup>\*\*\*</sup>, Akemi Kai<sup>\*</sup> and Satoshi MOROZUMI<sup>\*\*</sup>

**Keywords :** 重症急性呼吸器症候群 Severe Acute Respiratory Syndrome ( SARS ), 二段階 PCR nested-PCR ,  
リアルタイム PCR Real-timePCR

#### はじめに

重症急性呼吸器症候群 ( Severe Acute Respiratory Syndrome : SARS ) は、2002 年 11 月の中国・広東省における原因不明の肺炎患者の集団発生から始まったとされている<sup>1)</sup>。2003 年 2 月には、香港やベトナムで多数の患者が発生し、その後の世界各地における流行の先駆けとなった。幸いにして、日本における患者発生はなかったが SARS 流行地から帰国し、発熱症状等を有した帰国者が数多く存在したことから、日本でもっとも注目を集めた疾患の一つとして記憶に新しい。当初、SARS を引き起こした病原体の特定はされておらず、あらゆる呼吸器疾患を起こす病原体が疑われていた。このため SARS および同疑似患者に対する検査は、既知の呼吸器疾患を起こす病原体の検査により除外診断を行い、病因を特定していく手法がとられていた。SARS の原因病原体候補としてパラミクソウイルスやクラミジアが浮上した時期もあったが、米国疾病管理センター ( CDC ) は、コロナウイルスが原因病原体であることを発表し、次いでドイツの Bernard-Nocht 研究所が新型コロナウイルスが SARS の原因病原体である可能性が高いことと同ウイルスの遺伝子検査法について報告した<sup>2)</sup>。世界保健機構 ( WHO ) は、2003 年 4 月に世界の各研究機関からの報告を検討した結果として、SARS の原因病原体が新型コロナウイルスであると発表した。その後、新型コロナウイルスから SARS コロナウイルスへの名称変更が 2003 年 4 月 16 日の WHO からの発表により行われた ( 表 1 )。

東京都における SARS 検査は、原因病原体が SARS コロナウイルスであることが明らかとなる以前から開始しており、既に SARS 疑い例及び可能性例に相当する患者の原因究明を行っていた。SARS 関連検査では、迅速に患者から病原

#### 表 1. SARS問題の主な経緯

2002.11	中国・広東省で肺炎患者多数発生患者305名中5名死亡 (2.11報告)
2003. 2	香港、ベトナム、シンガポール、カナダで重症肺炎患者発生この患者の周囲から同様の症状多発
2003. 3	世界各地で重症肺炎患者発生
2003. 4.16	世界保健機関(WHO)は、SARSの原因は、新型コロナウイルス(SARSコロナウイルス)であると発表
2003. 4.28	ベトナムが感染地域指定(2. 23より)解除
2003. 5.16	国内においてSARSに感染した台湾人医師の問題発生
2003. 5.22	青森県八戸沖で乗組員のSARS感染疑い問題発生
2003. 5.31	シンガポールが感染地域指定(2. 25より)解除
2003. 6.23	香港が感染地域指定(2. 15より)解除
2003. 6.24	北京が感染地域指定(3. 2より)解除
2003. 6.24	カナダ・トロントが感染地域指定(2. 23より)解除
2003. 7. 5	台湾が感染地域指定解除。WHOは、SARSにおけるヒト-ヒト感染の経路は世界的に断たれたと発表(終息宣言)
2003. 9.10	シンガポールでSARSの実験室内感染
2003. 12.17	台北でSARSの実験室内感染
2003. 12.26	中国・広東省で3名のSARS感染例が報告されたが、感染源は特定されなかった
2004. 4.22	中国・北京で国立ウイルス学研究所内での実験室感染を原因とした一人の死者を含む9人のSARS患者が報告された

体を検出する必要があるため、感度、特異性に優れ、所要時間の少ない遺伝子検査法を採用した。

SARS 関連検査は、既知の呼吸器疾患 11 種におよぶ病原体の除外診断法の整備から始まり、ヒトメタニューモウイ

\* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

\*\* 東京都健康安全研究センター微生物部

\*\*\* 東京都健康安全研究センター多摩支所微生物研究科

ルス、ヒトコロナウイルス検査法の導入、SARS コロナウイルス検査法の導入を行い、さらに Real-timePCR 法による検査の迅速化を行うなど短期間のうちに検査法を改良してきた。SARS 関連検査のために開発した遺伝子検査法と最終的に確立した検査体制について、その概要を報告する。

材料と方法

1. 供試材料

2003 年 3 月 17 日に採取された患者検体を始めとして 2004 年 6 月 1 日までに SARS 疑いの患者検体として都内 21 保健所から 40 人分の検体 127 件が供試された(表 2)。内訳は咽頭ぬぐい液 38 件、ふん便 6 件、血液 45 件、喀痰 21 件、尿 17 件であり、血液を除く全ての検体を遺伝子検査に供した。この内、ふん便に関しては、あらかじめ 10% 乳剤を作製しフロン処理を施した後に遺伝子抽出を行った。

表 2. SARS 検査に供された患者の主な渡航先と検出病原体

主な渡航先	患者数	検体種別	検体数	ウイルス検出数						その他検出数
				SARS コロナウイルス	ヒトメタニューモウイルス	インフルエンザウイルス	パラインフルエンザウイルス	RS ウイルス	アデノウイルス	
香港	10	咽頭拭い液	8			2		1	3	1
		喀痰	5			1		1		
		尿	4							
		血液	9							
		ふん便	0							
台湾	8	咽頭拭い液	9			1				
		喀痰	8			1			1	
		尿	6							
		血液	9							
		ふん便	2							
北京	7	咽頭拭い液	9						1	
		喀痰	2		1					
		尿	4						1	
		血液	7							
		ふん便	3							
上海	1	咽頭拭い液	1						1	
		喀痰	0							
		尿	1							
		血液	1							
		ふん便	0							
シンガポール	5	咽頭拭い液	3							
		喀痰	1							
		尿	1							
		血液	7							
		ふん便	0							
広東	4	咽頭拭い液	4		1				2	
		喀痰	2							
		尿	1						1	
		血液	7							
		ふん便	0							
ロンドン	1	咽頭拭い液	1							
		喀痰	0							
		尿	0							
		血液	1							
		ふん便	0							
蘇州	1	咽頭拭い液	1							
		喀痰	1							
		尿	1							
		血液	1							
		ふん便	1							
その他	3	咽頭拭い液	3							
		喀痰	1						1	
		尿	0							
		血液	3							
		ふん便	0							
計	40	計	127	0	2	5	1	2	11	1

2. 検査対象病原体の変遷

第 1 期：検査開始時(2003 年 3 月 17 日)には、SARS の原因病原体は不明であったが、SARS 患者は既知の呼吸器疾患病原体に対して全て陰性であることが報告されていたため、呼吸器病原体(インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルス、アデノウイルス、マイコプラズマ、クラミジア等)の検査による消去法によって原因病原体の検索を行った。

第 2 期：2003 年 4 月 1 日には、パラミクソウイルスの 1 種であるヒトメタニューモウイルスを SARS の原因病原体とする情報がもたらされた。また、同時期に CDC 等からコロナウイルスの可能性が指摘されたことから両ウイルスの遺伝子配列を入手して<sup>2-3)</sup>、遺伝子検査法を独自に開発し、

両ウイルスを検査対象へ加えた。

第 3 期：2003 年 4 月 8 日にドイツの Bernard-Nocht 研究所から新型のコロナウイルスが SARS の病原体である疑いが強いことと、この新型コロナウイルス(SARS コロナウイルス)に対する遺伝子検査法が報告された<sup>2)</sup>。これにより同ウイルスの遺伝子検査法を取り入れ<sup>2,4-6)</sup>、SARS 検査対象に加えた。

3. 遺伝子抽出法

- 1) SARS コロナウイルス検査：核酸抽出試薬キット(QIAmp Viral-RNA Mini-kit: QIAGEN)を用いて各臨床材料から添付書の手順に従い RNA の抽出を行った。
- 2) SARS コロナウイルス以外の検査：核酸抽出試薬(セバジーン RV-R: 三光純薬)を用いて各臨床材料から添付書の手順に従い RNA ならびに DNA の抽出を行った。

4. 遺伝子検査法

1) nested-PCR 法：検査対象病原体であるインフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS ウイルス、アデノウイルス、マイコプラズマ、クラミジア、ヒトメタニューモウイルス、コロナウイルス、SARS コロナウイルスの病原体遺伝子に特異的なプライマー(表 3)を作製し、標的遺伝子の増幅を行った。得られた遺伝子増幅産物は、Big Dye terminator 法による cycle Sequencing により塩基配列を決定し、遺伝子バンク(NCBI)への照会により型の同定を行った。

2) Real-time PCR 法：インフルエンザウイルス、アデノウイルス、SARS コロナウイルスについては臨床症状が酷似していることもあり早期に類症鑑別の必要性があるため迅速性のある Real-timePCR 法を導入した。インフルエンザウイルスおよびアデノウイルス検査に用いるプライマー及びプローブは、各遺伝子配列を元に ABI 社の Primer Express 2.0 を用いて設計し、合成したものをを用いた。SARS コロナウイルス検査に用いるプライマー及びプローブは、CDC のホームページにて公表されているものを参考に Bernard-Nocht 研究所から報告されたものをを用いた<sup>2)</sup>(表 4)。また、SARS コロナウイルスの陽性コントロールが入手困難なため、同ウイルスの塩基配列の一部を合成し Real-timePCR 用コントロールとして用いた。Real-time PCR 検査は、ABI PRISM 7900HT(Applied Biosystems)を用いて行った。

3) Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法：SARS コロナウイルス専用開発されたキット(栄研化学)を添付書の指示に従って用い、本キット専用の Loopamp リアルタイム濁度測定装置(栄研化学)で測定を行った。

5. 検査体制

SARS 検査に設定された検査項目を担当する部署を中心に遺伝子検査ならびに血清検査による多項目検査を同時並行で行えるように担当者を決定した。

表3 . nested-PCR法に用いたプライマー

対象病原体	プライマー名	塩基配列	配列位置	
インフルエンザ A/H1 ウイルス	PA53	5'-TGAGGGAGCAATTGAGCTCA-3'	385-404	
	PB53	5'-TGCCTCAAATATTATTGTGCC-3'	815-796	
	IU-153	5'-TTACAGAAATTTGCTATGGCTG-3'	516-535	
	IU-253	5'-ACACTACAGAGACATAAGCATT-3'	688-669	
	AH3	HN-153	5'-TTTGTGAACGCAGCAAAGCT-3'	337-356
		HN-253	5'-CTCCCGGTTTTACTATTGTCC-3'	792-773
		IFA-A153	5'-GATTATGCCTCCCTTAGGTC-3'	387-406
		IFA-A453	5'-CCCCTTACCAGGGTCTAG-3'	752-731
	B	IB-153	5'-GCAAAAGCTTCAACTACTCCAC-3'	313-333
		IB-253	5'-TTTGTGGTAGCCCTCCGTC-3'	808-788
		IB-353	5'-GGAACCTCAGGATCTTGCC-3'	488-508
		IB-453	5'-GGTAGCCCTCCGCTCTCTG-3'	802-782
RSウイルス	RO3	5'-TATAGCTGTATCCAAAGTTT-3'	6066-6085	
	RO4	5'-ATAGAGGTGATGTGTGAAT-3'	6577-6558	
	RO1	5'-CTTGAAGGAGAAGTGAAC-3'	6091-6108	
	RO2	5'-TGATGTGTGTAATTTCCA-3'	6570-6553	
アデノウイルス B群 以外	HexAA1885	5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3'	94-111	
	HexAA1913	5'-CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT-3'	388-367	
	NeHexAA1893	5'-GCCACGAGACGTACTTCAGCCTG-3'	203-227	
	NeHexAA1905	5'-TTGTACGAGTACGCGGTATCCTCGCGGTC-3'	329-301	
	SAD4037	5'-TTCGGAGTACCTCAGTCCG-3'	128-145	
	MAS317	5'-TGTGCTGGCCATGTCAAGC-3'	365-347	
	マイコプラズマ ニューモニエ	MP1-1st	5'-GCAAGTCGATCGAAAGTAGT-3'	8087-8106
MP2-1st&2nd		5'-ATTTGCTCACTTTACATGCTGGCG-3'	9285-9261	
MP3-2nd		5'-GAATGACTTTAGCAGGTAATGGCTA-3'	8476-8499	
クラミジア ニューモニエ	C1F	5'-ACGGAATAATGACTTCGG-3'	7416-7433	
	C1R	5'-TACCTGGTACGCTCAATT-3'	7852-7835	
	CPF	5'-ATAATGACTTCGGTTGTTATT-3'	7421-7441	
	CPR	5'-CGTCATCGCCTTGGTGGGCTT-3'	7642-7622	
ハインフルエンザ ウイルス	1型	PIP1+	5'-CCTTAAATTCAGATATGTAT-3'	748-768
		PIP1-	5'-GATAAATAATTATTGATACG-3'	1225-1206
		PIS1+	5'-CCGGTAATTTCTCATACCTATG-3'	780-801
		PIS1-	5'-CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG-3'	1096-1076
	2型	PIP2+	5'-ACAATCTGCTGCAGCATT-3'	803-822
		PIP2-	5'-ATGTCAGACAATGGGCAAAT-3'	1310-1291
		PIS2+	5'-CCATTACCTAAGTGATGGAAT-3'	845-866
		PIS2-	5'-GCCCTGTTGATTTGGAAGAGA-3'	1048-1027
	3型	PIP3+	5'-CTGTAACACTCAGACTTGGTA-3'	762-781
		PIP3-	5'-TTTAAGCCCTTGCAACAAC-3'	1239-1220
		PIS3+	5'-ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT-3'	884-905
		PIS3-	5'-TAAATCTTGTGTTGAGATTG-3'	986-966
ヒトメタニューモ ウイルス	MPVN3f	5'-GAGAAGAGCTGGGTAGAAG-3'	397-415	
	MPV02.2	5'-CATTGTTTGACCGGCCCAATAA-3'	792-813	
	MPV01.2	5'-AACCGTGTAATAAGTGATGCACTC-3'	601-624	
	MPVN3r	5'-CAAACAACCTTCTGCT-3'	756-772	
コロナウイルス	coU2	5'-CAGAAATGGATGCTTGTGCTGC-3'	74-93	
	coU1	5'-GTGATTCTTCCAATTGGCCAT-3'	293-273	
	coU3	5'-ATAGAGAAGGTTATAGCAGACT-3'	102-123	
	coU4	5'-TCATTCACTTACTAATTACTGGG-3'	265-242	
SARSコロナ ウイルス	BNloutS2	5'-ATGAATTACCAAGTCAATGTTAC-3'	18138-18161	
	BNloutAs	5'-CATAACCAGTCGGTACAGCTA-3'	18327-18307	
	BNlinS	5'-GAAGCTATTCGTCACGTTTCG-3'	18186-18205	
	BNlinAs	5'-CTGTAGAAAATCCTAGCTGGAG-3'	18294-18273	
	**	SAR1s	5'-CCTCTCTTGTCTTGCTCGCA-3'	15256-15276
	SAR1as	5'-TATAGTGAGCCGCCACACATG-3'	15376-15356	

\*: Semi-nested-PCR法、\*\*: RT-PCR法

表4 . real-timePCR法に用いたプライマーとプローブ

対象ウイルス	プライマー、プローブ名	塩基配列	
SARSコロナ ウイルス	BNITMSARS1	5'-TTATCACCCGCGAAGAAGCT-3'	
	BNITMSARAs2	5'-CTCTAGTTGCATGACAGCCCTC-3'	
	BNITMSARP	5'-FAM-TCGTGCGTGGATTGGCTTTGATGT-TAMRA-3'	
インフルエンザ A/H1 ウイルス	HI-VAF	5'-CTCTGTAGTGTCTTCACATTATAGCAGAAG-3'	
	HI-VAR	5'-TGATCTCTTACTTTGGGCTTTTGG-3'	
	HI-MGBVA	5'-VIC-TTGGAGCCATTGCC-MGB-3'	
	AH3	RT-H3-588	5'-TCAAGCATCAGGGAGARTCACA-3'
		RT-H3-653	5'-CCGATATTCGGGATTACAGTTTG-3'
		Flu-H3-611	5'-FAM-TCTCTACCAAAAGAAGCCA-MGB-3'
	B	RT-B-265F	5'-CCTGTTACATCYGGRTGCTTTCC-3'
RT-B-334R		5'-GAGAAGATTGGGYAGYGTCTRAT-3'	
Flu-B-293		5'-VIC-TGCACGACAGAACAA-MGB-3'	
アデノウイルス	ADHXFm	5'-CCTBGGMCCARAACMTKCTCTA-3'	
	ADHXRm	5'-CATGGGRTCSACYTCRAAAKTCAT-3'	
	ADHX	5'-FAM-AACTCCGCCACGCGCTAGA-TAMRA-3'	
	ADHX7	5'-FAM-AACTCGGCCCATGCGCTGGA-TAMRA-3'	

## 結 果

### 1. nested-PCR 法による検査結果

SARS コロナウイルス遺伝子は、全ての検体で検出されなかった。インフルエンザウイルス遺伝子は、咽頭拭い液から AH3 型が 2 例、喀痰から B 型が 1 例、咽頭拭い液・喀痰の両方から AH3 型が検出された例が 1 例あった。パラインフルエンザウイルス遺伝子は、喀痰から 1 例検出された。アデノウイルス遺伝子は、咽頭拭い液から 4 例、喀痰から 2 例、咽頭拭い液と尿の両方から検出された例が 2 例あった。RS ウイルスは 1 例の咽頭拭い液と喀痰の両方から検出された。また、ヒトメタニューモウイルスの遺伝子が 2 例の患者でそれぞれ咽頭拭い液と喀痰から検出された。本ウイルスの検出は、東京都で初となり、これら 2 例の患者からはアデノウイルスも同時に検出された。さらにマイコプラズマ・ニューモニエの遺伝子が咽頭拭い液で 1 例検出された。これらの結果から、遺伝子検査によって病原体抗原が検出された例は 16 例となった。

### 2. Real-time PCR 法による検査結果

Real-time PCR 法による遺伝子検査の導入は、2003 年 6 月 6 日以降であったため、本法による検査を実際に行った例は 6 例である。この内、SARS コロナウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルスが検出された例はなかった。しかし、検体搬入から結果報告に至る時間は、大幅に短縮され、わずか 6 時間以内で結果を報告することが出来るようになった。

### 3. LAMP 法による検査結果

LAMP 法による SARS 検査は、開発メーカー(栄研化学)による測定器械の整備ならびに専用キットの開発の都合で 2004 年 4 月 26 日検査の例からの導入となった。専用機器を用いた本法の検出時間はウイルス抽出等の行程を含めて 3 時間と高速であるのが特徴である。本法を使用した呼吸器疾患に関する病原体検出のキットは、現在のところ SARS コロナウイルス用のキットしか無く、2 例の検出結果は、いずれも陰性であった。

### 4. 検査のコストダウンと省力化

SARS の遺伝子検査においては、多項目の同時検査を行う場合についても、迅速に検査結果を返す必要がある (RT-nested-PCR 法は検体搬入から 23 時間以内)。しかし、使用機器の混雑や試薬の浪費が考えられるため、多重 PCR 法 (マルチプレックス PCR 法) を導入し、コストダウンと省力化を図ることを検討した。SARS の類症鑑別のために行っていた nested-PCR 法において、1 検体あたり最大 14 回行う PCR 反応を 5 回の PCR 反応 (多重 PCR 反応 4 回+PCR 反応 1 回) で行った結果、多重 PCR 反応のアニリング温度条件をインフルエンザ AH1 型+AH3 型+B 型+RS ウイルス: 53℃, アデノ B 群+アデノ B 群以外+マイコプラズマ+クラミジア: 53℃, パラインフルエンザ 1 型

+2 型+3 型: 50℃ (RT-PCR)・53℃ (nested-PCR), コロナウイルス+SARS コロナウイルス: 50℃ に設定することで各病原体に対する個別 PCR 法での検出感度を維持したまま、PCR 反応の多重化をすることが出来た。

### 5. 検査体制の整備

検体搬入の急激な増加や緊急検査に対応するために第一次から第三次までの検査体制を整備した。第一次体制は、SARS 検査担当者を中心とした平日検査体制であり、第二次体制は、ウイルス研究科内の人的支援による休日検査体制である。第三次体制は、微生物部内の人的支援を得ることによる 24 時間の検査体制を構築した。2003 年 3 月末から 7 月末までに諸外国で SARS が発生していた期間中は、第二次体制である休日検査体制を実施し、SARS 指定地域が解除となった 8 月以降の休日は、自宅待機によるオンコール体制を取って対応した。SARS の流行が終息するまでの期間に第三次体制に移行する事態は起こらなかった。

## 考 察

SARS 検査においては、感染の拡大を防ぐために迅速に検査結果を出す必要がある。病原体ならびに検査法が確立されていなかった SARS 検査において、既知の呼吸器疾患に対する病原体検索を目的とした遺伝子検査は、SARS 感染初期の除外診断として行った。すなわち、目的とする SARS コロナウイルスの検査結果ばかりでなく既知の呼吸器疾患病原体の検査結果により、早期に SARS または、それ以外の感染症かの判別がつくことは、患者の治療や蔓延防止対策を講じる上で非常に有効である。

バイオセーフティ室における検体の取り扱いが必須とされている SARS コロナウイルスは、WHO の検査指針<sup>8)</sup>にある SARS 陽性率の変動 (図 1) や国立感染症研究所からの検査指針にもあるように、他の呼吸器疾患を起こす病原体に比べ、感染後約 5 日程度の期間を経過しないと咽頭拭い液やふん便等の材料からウイルス分離をするのは困難であり、発症 10 日後のふん便等を採取し SARS コロナウイルスを再確認する必要がある。一方、遺伝子検査はその高い感度から検査材料中のウイルス濃度が低い場合にも有効な検査法であり、ウイルス分離試験等の従来法と比べ大幅な検査時間の短縮を可能とし、検査結果の早期還元等の迅速化を十分に満たすことができる。

遺伝子検査の効率を高めるために SARS 関連検査では、多くの試みを行った。最初に除外診断のための多重 PCR 法の応用によるコストダウンを図った。この方法はコストダウンが計れるばかりでなく、1 台の機械で多種類の PCR 反応をさせることにより時間的ロスを少なくすること、検査体制の過密化を防げること等、迅速性の向上に大きく寄与できた。また、多重 PCR 法に用いた nested-PCR 法は、検査終了までに 23 時間を要するが、増幅産物の塩基配列を特定し疫学解析を行える利点がある。次に、海外からの情報を取得し、Real-time PCR 法による遺伝子検査法の確

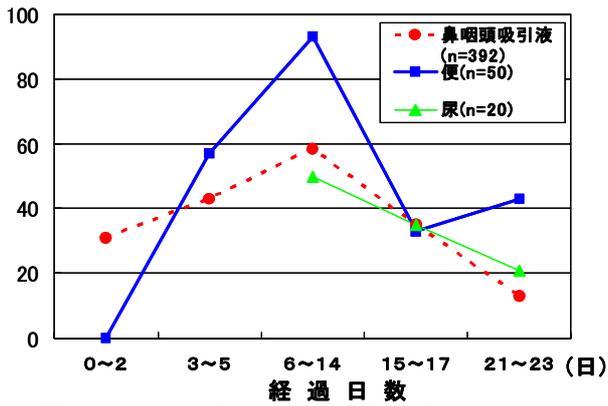


図1 .SARSコロナウイルスに感染発症した患者の各臨床材料中におけるRT-PCR陽性率の変動(WHO: SARS 報告書)

立を行った。本法は、感度・迅速性の両面から今後、病原体の緊急検査で中心的役割を担う検査法になることが推察される。また、LAMP 法による検査は、さらなる迅速性を追求することが出来、さらに、異なった検査法の併用により検査の質を向上させることが出来る。

検体搬入の急激な増加や緊急検査への対応として整備した検査体制のうち第一次および第二次検査体制は、諸外国で SARS が発生していた 2003 年 3 月末から 7 月初旬までの期間に適用され、SARS 疑い例の検査を随時行うことで、迅速な対応を行うことが出来た。一方、第三次検査体制は、国内および海外帰国者から SARS 患者の発生が無かったことと、24 時間検査が必要な程 SARS 疑い例の発生が多くなかったこと等から、SARS の流行が終息するまでに適用されることはなかったものの、十分な備えとして今後も必要な体制であると思われる。

これらの検査法および検査体制から東京都における現在の SARS 検査は、以下のように構築されている。

SARS の臨床的症例定義を満たす患者、すなわち、38 以上の発熱と咳嗽、呼吸困難、息切れ等の下気道炎症状を 1 つ以上有し、肺炎所見があり、他にこの病態を完全に説明できる診断がつかない急性期の患者から、5 種類の検体（咽頭拭い液、ふん便、喀痰、尿、血液は急性期と回復期）を採取する。

検体採取時期と発生動向に応じた検査体制により、検査の対象となる病原体が異なる（表 5、表 6）。検査法としては、Real-time PCR 法および LAMP 法による迅速検査があり、RT-nested-PCR 法および遺伝子配列の解析による確認検査結果により最初の判定を行う。その後、ウイルス分離試験および急性期・回復期血清による抗 SARS 抗体の測定により SARS 確定診断を行うこととしている。また、抗原および抗体の検出時には国立感染症研究所へ材料を送付し、SARS 検査のダブルチェックを行って確認を行う。

これまでに国内で SARS 患者の発生はなかったが、今後、

表5 .SARS関連検体採取時期と検査対象病原体

時期	検体の種類 (法定)	検査対象の病原体	
		第一・二次体制	第三次体制
診断時	咽頭拭い液、 喀痰、尿、便、 血液	SARSコロナウイルス インフルエンザウイルス アデノウイルス	SARSコロナウイルス
発症 10日後	咽頭拭い液、 喀痰、尿、便	SARSコロナウイルス	SARSコロナウイルス
3週間後	血液	抗体検査 (抗SARSコロナウイルス)	抗体検査 (抗SARSコロナウイルス)

表6 .SARS関連検体の検査項目

検査項目	第一次体制		第二次 体制	第三次 体制
	疑い例	疑似症		
①SARSコロナウイルス	○	○	○	○
②インフルエンザウイルス	○	○	○	×
③アデノウイルス	○	○	○	×
④RSウイルス	×	△	×	×
⑤パラインフルエンザウイルス	×	△	×	×
⑥マイコプラズマ・ニューモニエ	×	△	×	×
⑦クラミジア・ニューモニエ	×	△	×	×
⑧レジオネラ菌(尿中)	×	△	×	×

検査実施 ○:する, ×:しない, △:必要に応じて行う

海外からの侵入や国内での発生の可能性もあり、SARS に即応できる検査体制の整備および継続は今後も必要であり、検査法の改良・見直しも視野に入れた検討を重ねていく予定である。

文 献

- 1) 東京都病原微生物検出情報：東京都 24(4), 2003
- 2) Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al.: *N Engl J Med.* 348(20):1967-1976.2003.
- 3) Teresa C.T. Peret, Guy Boivin, Yan Li, et al.: *J. of Infect. Disease*, 185, 1660-1663, 2002
- 4) Marra MA, Jones SJ, Astell CR, et al.:*Science.* 300 : 1399-1404, 2003
- 5) Wang Y, Ma WL, Song YB; *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 23(5), 421-423. 2003
- 6) Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, et al.: *N Engl J Med.*, 348(20):1953-1966. 2003
- 7) Susan M. Poutanen, Donald E. Low, Bonnie Henry, et al.: *N. Engl. J. Med.*, 348(20), 1995-2005, 2003
- 8) WHO : *WHO Scientific Research Advisory Committee on SARS.* Switzerland, October 2003