


 原著

ムンプス小児例の迅速診断における LAMP 法の有用性

後藤 研 誠¹⁾ 西村 直 子¹⁾ 高尾 洋 輝¹⁾ 福田 悠 人¹⁾
 吉 兼 綾 美¹⁾ 鬼 頭 周 大¹⁾ 春 田 一 憲¹⁾ 山 口 慎¹⁾
 野 口 智 靖¹⁾ 竹 本 康 二¹⁾ 中 山 哲 夫²⁾ 尾 崎 隆 男¹⁾

要旨 ムンプスの臨床診断はしばしば困難であるが既存の病原診断法は迅速性に乏しい。今回 RT-LAMP 法を用いて迅速診断を行い、病原診断例の特徴を示すとともに既存の病原診断法と比較した。

2013 年 9 月から 2014 年 8 月の 1 年間に、耳下腺腫脹を主訴に当院を受診した小児 51 例から、初診時(平均 2.4±1.4 病日)の唾液を用いて RT-LAMP 法および RT-PCR 法によるムンプスウイルス RNA 検出とウイルス分離を、血清を用いて IgG/IgM 抗体価測定(EIA)法を行った。ウイルス分離・RNA・IgM 抗体のいずれかが陽性であった症例をムンプスと病原診断した。

病原診断されたのは 23 例(45%)のみであり、臨床診断の限界と病原診断の必要性が示唆された。各診断法の陽性率は、RT-PCR 法 96%(22/23)、RT-LAMP 法 87%(20/23)、EIA 法 78%(18/23)、ウイルス分離 61%(14/23)の順であり、RT-LAMP 法は EIA 法より感度が高かった。ウイルス分離、RT-PCR 法、EIA 法に対する RT-LAMP 法の一致率はそれぞれ 74%(17/23)、83%(19/23)、83%(19/23)であった。3 例(13%)はワクチン接種後罹患であり、3 例とも IgM 抗体は陰性であった。RT-LAMP 法は、侵襲性が少なく、迅速かつ高感度であり、ムンプスの病原診断法として有用である。

はじめに

ムンプス(流行性耳下腺炎)は、ムンプスウイルスによる全身感染症で、突然の唾液腺腫脹・疼痛をきたす疾患である。一般には軽症とされているが、髄膜炎・難聴・精巣炎などの多彩な合併症により入院が必要となることも多く臨床的に重要な疾患である¹⁾。一般診療では身体所見・血液検査・尿検査により臨床診断されていることがほとんどであるが、コクサッキーウイルスなど他のウイルス感染症や化膿性耳下腺炎、反復性耳下腺炎などの鑑別は容易

でなく^{2,3)}、耳下腺腫脹反復例やワクチン既接種例などでは診断に苦慮することも多い。したがって、正確な診断のためには病原診断が必要である。病原診断法として、ウイルス分離、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法、血清抗体価測定(EIA)法が一般的に用いられている^{2,4,5)}。ウイルス分離は最も直接的な診断法であり特異性が高いが、発症早期以外では感度が低下する^{4,5)}。RT-PCR 法は感度・特異度ともに高いが、高い感度ゆえに交叉汚染により偽陽性を示す可能性がある⁴⁾。EIA 法は陰性・陽性の境界を決める

Key words : ムンプス, 唾液腺腫脹, 迅速診断, 病原診断, LAMP 法

1) 江南厚生病院こども医療センター 2) 北里生命科学研究所ウイルス感染制御

連絡先: 後藤研誠 〒483-8704 江南市高屋町大松原 137 江南厚生病院こども医療センター

カットオフ値の設定に曖昧な点はあるものの感度は高く汎用されているが、非特異的反応による偽陽性を示す可能性が指摘されている^{2,4)}。

ムンプスは伝染力が強く、学校保健安全法により出席停止期間が規定されていることから、診断には迅速性も求められる。しかし、ウイルス分離、RT-PCR法、EIA法などの既存の病原診断法は時間がかかり、急性期の迅速診断には適していない。Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法は、PCR法と同等の感度と迅速性を有し、かつPCR法と比べ機器も安価で手技も容易であるため一般診療における迅速診断法として有用であり、肺炎マイコプラズマや百日咳などの疾患で臨床応用されている^{6,7)}。Okafujiらはreverse transcription-LAMP (RT-LAMP)法を用いたムンプスウイルスの迅速検出法を開発し、RT-PCR法と同等の検出感度を示している⁸⁾。しかし現時点では、ムンプスの診断におけるRT-LAMP法の臨床応用に関する報告は乏しく、一般診療で広く使われるには更なる報告の蓄積が必要と思われる。

今回われわれは、臨床的にムンプスが疑われた小児例を対象に、既存の病原診断法（ウイルス分離、nested RT-PCR法、EIA法）に加えてRT-LAMP法による病原診断を行い、臨床診断されたムンプスに対する病原診断の有用性を検証するとともに、RT-LAMP法と既存の病原診断法との比較を行った。

I. 対象と方法

1. 対象

2013年9月1日から2014年8月31日の1年間に、耳下腺腫脹・疼痛を主訴に当センターを受診し、臨床的にムンプスが疑われた小児52例のうち保護者の文書同意が得られた51例（1.4～13.8歳；中央値5.8歳）を対象とした。初診時（平均2.4±1.4病日）に小児科医により口腔底にスワブ（BD BBL™カルチャースワブEZ™）を2本同時に静置して唾液を採取し、1本でRT-LAMP法によるDNA検出を、もう1本は-80℃で凍結保存した。ムンプスワクチン接種歴、周囲でのムンプス流行の有無などを調査し、その後は唾液腺の腫脹が消失するまで経過観察を行った。

2. 方法

1) RT-LAMP法

唾液を材料にQIAamp® Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて、RNAの抽出・精製を行った。RT-LAMP法には、ムンプスウイルスHN蛋白遺伝子領域を標的としたLAMP法用プライマーセットMumps Virus (ニッポン・ジーン)を用い、Loopampリアルタイム濁度測定装置RT-160C (栄研化学)を用いてムンプスウイルスRNAの増幅（63℃、60分）および検出を行った⁸⁾。検体採取から結果が得られるまでの時間は約1時間30分である。

2) ウイルス分離およびnested RT-PCR法

-80℃に凍結保存した唾液検体を北里生命科学研究所に送付し、Vero細胞によるウイルス分離を行うとともにnested RT-PCR法によるムンプスウイルスRNA検出を行った⁸⁾。

3) 血清学的診断法

初診時に採取した血清を用いてムンプスIgG/IgM抗体価（EIA法）を測定した（SRL）。IgM1.21抗体指数以上、IgG4.0EIA価以上を陽性と判定した。

3. 病原診断基準

1) ウイルス分離陽性、2) RNA陽性（RT-LAMP法またはnested RT-PCR法）、3) IgM抗体陽性のいずれかを満たした症例をムンプスと病原診断し、全てが陰性であった症例を非ムンプスと定義した^{2,4)}。

4. 統計学的検討

2群間の差の検定は、連続変数にはMann-Whitney法を、カテゴリ変数にはカイ二乗検定またはFisher直接確率検定を用いた。ムンプス臨床診断例における病原診断の有無を目的変数として、発熱・ワクチン歴・周囲のムンプス流行の有無を説明変数として用いて、ロジスティック回帰分析による多変量解析を行った。統計解析にはエクセル統計2012 (SSRI)を用いて行い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

なお、本研究は当院の臨床研究審査委員会の承認（臨床研究25-008）を得ている。

表1 耳下腺腫脹例の臨床像 (n=51)

	ムンプス (n=23)	非ムンプス (n=28)	P 値
年齢 (歳)* ¹	6.2 ± 2.8	6.3 ± 3.0	0.91
男 (%)	12 (53%)	16 (57%)	0.78
検体採取病日 [日]* ^{1,2}	2.7 ± 1.6	2.1 ± 1.1	0.17
ワクチン歴 なし (%)	20 (87%)	13 (46%)	<0.01
唾液腺の腫脹歴 あり (%)	3 (13%)	8 (29%)	0.31
周囲の流行 あり (%)	15 (65%)	3 (11%)	<0.01
発熱 (≧37.5°C) あり (%)* ³	15 (65%)	9 (32%)	0.03
両側の耳下腺腫脹 あり (%)* ³	11 (48%)	7 (25%)	0.14
血清アミラーゼ [IU/L]* ^{1,3}	599 ± 429	527 ± 689	0.11
有熱期間 [日]* ¹	2.4 ± 2.6	0.6 ± 1.0	<0.01
耳下腺腫脹期間 [日]* ¹	6.1 ± 3.1	3.5 ± 1.9	<0.01

*¹ 平均値 ± 標準偏差*² 発症日を第1病日とする*³ 初診時

表2 耳下腺腫脹例 (n=51) におけるムンプスと非ムンプスの患者背景の差 (多変量解析)

	調整オッズ比 (95%CI)	P 値
初診時に発熱あり	4.68 (1.01 ~ 21.63)	0.048
ワクチン歴なし	6.01 (1.02 ~ 35.19)	0.047
周囲の流行あり	9.79 (2.01 ~ 47.48)	<0.01

CI: confidence interval

II. 結 果

1. ムンプス病原診断例の臨床像

耳下腺腫脹例 51 例のうち 23 例 (45%) がムンプスと病原診断された。23 例の全てにムンプスの既往はなく、3 例はワクチン接種後罹患 (全例 1 回接種) であった。ムンプス (n=23) と非ムンプス (n=28) とともに明らかな季節性を示さなかった。それぞれの臨床像を表 1 に示す。ムンプスでは、ワクチン歴なし (87%)、周囲でのムンプス流行あり (65%)、初診時に発熱 (≧37.5°C) あり (65%) の割合が有意に高く、有熱期間 (2.4±2.6 日)、耳下腺腫脹期間 (6.1±3.1 日) は非ムンプスよりも有意に延長していた。初診時におけるムンプスの確定診断に有用な因子を検討するために、ワクチン歴・周囲の流行歴・発熱の有無について多変量解析を行ったところ、全ての因子で有意差を認めた (表 2)。

表3 ムンプスの病原診断法の内訳 (n=23)

検査法	判定	陽性率
nested RT-PCR	+ + - + + + +	22/23 (96%)
RT-LAMP	+ + + + + - -	20/23 (87%)
IgM (EIA)	+ + + - - + -	18/23 (78%)
ウイルス分離	+ - + + - - -	14/23 (61%)
症例数	12 4 1 1 2 1 2	

2. ムンプスの病原診断法についての検討

ムンプスにおける各診断法の内訳を表 3 に示す。陽性率は、nested RT-PCR 法 96% (22/23)、RT-LAMP 法 87% (20/23)、EIA 法 78% (18/23)、ウイルス分離 61% (14/23) の順であった。全ての病原診断法が陽性であったのは 12 例 (52%) であった。nested RT-PCR 法のみ陽性であった 2 例以外は複数の病原診断法が陽性を示した。ウイルス分離、nested RT-PCR 法、EIA 法に対する RT-LAMP 法の一致率はそれぞれ 74% (17/23)、83% (19/23)、83% (19/23) であった。ウイルス分離、nested RT-PCR 法、EIA 法のいずれかが陽性であった症例をムンプスとしたときに、RT-LAMP 法の感度は 87% (20/23)、特異度は 100% (28/28) であった。

ムンプスの抗体価分布を図に示す。23 例のうち 5 例は IgM 陰性であった。うち 2 例は nested RT-PCR 法のみが陽性を示し、残りの 3 例は nested RT-PCR 法と RT-LAMP 法のどちらも陽性であった。ワクチン接種後罹患の 3 例は全例が IgM 抗体

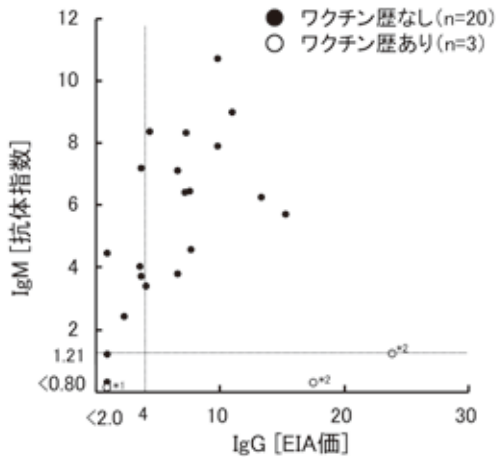


図 ムンプス病原診断例におけるムンプス血清抗体価 (EIA 法) 分布 (n=23)

*1 一次性ワクチン不全, *2 二次性ワクチン不全

陰性であった。IgG 抗体価から 1 例が一次性ワクチン不全 (primary vaccine failure: PVF), 2 例が二次性ワクチン不全 (secondary vaccine failure: SVF) と考えられた⁵⁾。

III. 考 察

ムンプスは感染症法での五類感染症定点把握疾患に定められており、小児科定点医療機関からの届け出が必要とされている。感染症法による届出基準は、ア) 片側ないし両側の耳下腺の突然の腫脹と、2 日以上持続、イ) ほかに耳下腺腫脹の原因がないことの両方を満たすこと、となっているが⁹⁾、イ) についてはどのように鑑別するか記載がない。本検討では、ムンプス臨床診断例 51 例のうち、病原診断で確定診断されたのは 23 例 (45%) のみであり、臨床診断の限界と病原診断の必要性が示唆された。病原診断例の占める割合が低かった原因として、地域のムンプス流行が少なかったことがあげられる。庵原らは耳下腺腫脹小児に対しウイルス分離を行い、ムンプス流行期には 68% からムンプスウイルスが分離されたのに対し、非流行期には 1 例もムンプスウイルスを分離できなかったことから、非流行期にはムンプスウイルス以外の原因による耳下腺腫脹が多いと報告している¹⁰⁾。本検討期間は全国の感染症発生動向調査では非流行期にあたり¹¹⁾、当地域においても唾液腺

腫脹患者が少ない期間であった。流行期では病原診断例の占める割合は高くなることが推測され、流行期においても同様の検討が必要である。

非ムンプスと比較して、ムンプスでは、初診時の発熱あり、ワクチン歴なし、周囲のムンプス流行あり、の 3 項目については有意に高率であり、臨床診断するうえで有用な情報と思われた。逆にこれらの項目を満たさず、臨床診断が困難な症例では病原診断の必要性が高いと考えられた。また、ムンプスでは有熱期間や耳下腺腫脹期間が有意に延長していた。

今回用いた 4 種類の病原診断法のうち、検出感度は nested RT-PCR 法、RT-LAMP 法、EIA 法、ウイルス分離の順に高かった。ウイルス分離は感度が低かったが、その原因として凍結融解の影響が考えられた。また同等の感度を示すと報告⁸⁾されていた nested RT-PCR 法と RT-LAMP 法の結果が一部乖離していたが、検体のウイルス量に差があった、またはウイルス量が最小検出感度以下のレベルであった可能性が考えられた。最も感度の高かった nested RT-PCR 法は迅速性・簡便性に乏しく、実際に臨床で用いるのは現実的ではない。RT-LAMP 法は現在も保険診療内で実施されている EIA 法と同等以上の感度を示した。さらに同日中または翌日には RT-LAMP 法の結果を説明することができ、迅速診断としても有用であった。本研究のように自施設内で RT-LAMP 法を実施できなくても、すでに LAMP 法が保険収載されている百日咳菌や肺炎マイコプラズマのように院外検査機関で RT-LAMP 法が実施できれば、2~4 日で結果が得られ、迅速診断とはいえないまでも急性期の確定診断法としては十分に実用的と考えられる。また、今回 91% (21/23) が複数の病原診断法で陽性を示したが、2 例では nested RT-PCR 法のみ陽性を示した。その原因は不明であるが、nested RT-PCR 法は RT-LAMP 法に比べて手技が複雑であり、コンタミネーションによる偽陽性を示した可能性が考えられた⁴⁾。RT-PCR 法や RT-LAMP 法は感度に優れた検査法であるが、発症日から時間が経つと検出感度が低下する点があげられている。Rota らは RT-PCR 法を用いてムンプスの確定診断を行い、発症 4 日目以降は

RNA 検出率が3日目以内に比べて低下すると報告している¹²⁾。本研究では51例中42例(82%)が発症3日目以内の受診であり、RNA検出法の経時的な感度低下の影響は少ないと思われる。

ムンプスワクチンによる抗体獲得率および発症予防率は十分に高くなく、接種後罹患例は少なからず存在する。実際に麻疹おたふくかぜ風疹混合(MMR)ワクチン2回接種法による定期接種が普及している諸外国でも接種後罹患が多数発生しており、大きな問題となっている。1989年からMMRワクチン2回接種法が実施されている米国では2005年にアイオワ州を中心に6,000人規模の集団発生がみられ、罹患者の51%が2回接種者、12%が1回接種者であったと報告されている²⁾。本検討では13%(3/23)がワクチン接種者(1回)であり、1例がPVF、2例がSVFと考えられた⁵⁾。わが国のこれまでの報告では接種後罹患例の70%がSVFとするものが多い^{13,14)}。また、落合らはSVF症例のIgM陽性率は30%であり多くは弱陽性であったと報告している¹⁴⁾。本検討でもSVFの2例はIgM陰性であり、急性期の抗体測定のみではムンプスと診断できなかった。わが国のムンプスワクチン接種率は緩やかに上昇しているものの、流行抑制にはほど遠く¹⁵⁾、今後は接種後罹患例の増加とともに血清診断困難な症例が増加するものと予想される。アイオワ州の集団発生では流行抑制のためにMMRワクチンの3回目接種およびキャッチアップ接種が行われたが、集団発生時の速やかな対応には迅速かつ正確な診断が必要である。諸外国からもMMRワクチン接種後ムンプスの確定診断に血清抗体価測定よりもRT-PCR法が有用との報告がある^{12,16)}。今後わが国においても増加するであろう接種後罹患例の診断にRT-LAMP法が有用と思われる。

結 語

RT-LAMP法は、侵襲性が少なく、迅速かつ高感度であり、ムンプスの病原診断法として有用である。

謝辞：本検討に協力して頂いた当院臨床検査技術科の及川加奈先生、岩田泰先生、河内誠先生、野

田由美子先生、中根一匡先生、舟橋恵二先生に感謝いたします。

本文の要旨は第19回日本ワクチン学会(2015年11月、犬山)において報告した。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項に則り開示します。中山哲夫は第一三共株式会社から700万円、北里第一三共ワクチンから700万円の受託研究費を受領している。その他の著者は日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) 川口将宏, 他: 2008～2014年入院治療例の臨床的検討に基づく小児ムンプスの疾病負荷. 小児感染免疫 29: 227-233, 2017
- 2) 国立感染症研究所: “おたふくかぜワクチンに関するファクトシート(平成22年7月7日版)”. <http://www.mhlw.go.jp/stf2/shingi2/2r9852000000bx23-att/2r9852000000bybc.pdf>. (参照2018/5/6).
- 3) Elbadawi LI, et al: Non-mumps Viral Parotitis During the 2014-2015 Influenza Season in the United States. Clin Infect Dis 67: 493-501, 2018
- 4) 国立感染症研究所: “ムンプスウイルス病原体検査マニュアル”. <http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Mumps2015.pdf>. (参照2018/8/10).
- 5) 庵原俊昭: 【終生免疫の神話】おたふくかぜの再感染とVaccine Failureの臨床. 臨床とウイルス 36: 50-54, 2008
- 6) Gotoh K, et al: Detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay and serology in pediatric community-acquired pneumonia. J Infect Chemother 18: 662-667, 2012
- 7) 河内 誠, 他: 小児百日咳における実験室診断法の検討 PT-IgG(EIA)法とLAMP法の比較について. 医学検査 64: 569-575, 2015
- 8) Okafuji T, et al: Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 43: 1625-1631, 2005
- 9) 厚生労働省: “34. 流行性耳下腺炎”. 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について. <http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kan>

- senshou11/01-05-27.html, (参照 2018/8/17).
- 10) 庵原俊昭, 他: ムンプスウイルスを含むワクチンの接種歴を有する児の耳下腺腫脹時におけるムンプスウイルス分離の検討. 小児感染免疫 12: 79-83, 2000
 - 11) 国立感染症研究所: <特集>流行性耳下腺炎(おたふくかぜ) 2016年9月現在. 病原微生物検出情報 37: 185-186, 2016
 - 12) Rota JS, et al: Comparison of the sensitivity of laboratory diagnostic methods from a well-characterized outbreak of mumps in New York city in 2009. Clin Vaccine Immunol 20: 391-396, 2013
 - 13) 西村直子, 他: 当院における過去9年間のムンプスワクチン接種成績. 臨床とウイルス 35: 179-185, 2007
 - 14) 落合 仁, 他: ワクチン歴によるムンプス発症時のIgM抗体・IgG抗体の比較検討. 小児科臨床 60: 501-506, 2007
 - 15) 国立感染症研究所: 近年における「おたふくかぜワクチン」の接種歴調査の結果について—2015年度感染症流行予測調査より. 病原微生物検出情報 37: 198-199, 2016
 - 16) Maillet M, et al: Mumps outbreak and laboratory diagnosis. J Clin Virol 62: 14-19, 2015

Evaluation of the loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of mumps in pediatric patients

Kensei GOTOH¹⁾, Naoko NISHIMURA¹⁾, Hiroki TAKAO¹⁾, Yuto FUKUDA¹⁾, Ayami YOSHIKANE¹⁾,
 Syuta KITO¹⁾, Kazunori HARUTA¹⁾, Makoto YAMAGUCHI¹⁾, Tomoyasu NOGUCHI¹⁾,
 Koji TAKEMOTO¹⁾, Tetsuo NAKAYAMA²⁾, Takao OZAKI¹⁾

1) *Department of Pediatrics, Konan Kosei Hospital*

2) *Laboratory of Viral Infection, Kitasato Institute for Life Sciences*

This study prospectively evaluated the efficacy of the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay to diagnose mumps rapidly in a clinical setting.

Fifty-one children, who enrolled in this study, presented with salivary gland swelling at this hospital between September 2013 and August 2014. Salivary swabs were obtained during the acute phase (mean \pm SD, 2.4 ± 1.4 days) to test for mumps using the RT-LAMP assay, nested RT-PCR assay, and virus isolation. In addition, serum samples were collected for detecting IgG and IgM mumps antibodies by the enzyme immunoassay. Laboratory confirmation of mumps was defined as at least one of the following: 1) mumps virus isolation, 2) detection of mumps virus RNA using RT-LAMP or RT-PCR assays, or 3) detection of IgM mumps antibodies.

Of the patients with clinically diagnosed mumps, 23 (45%) had laboratory-confirmed mumps. Among these, 22 (96%) were RT-PCR positive, 20 (87%) RT-LAMP positive, 18 (78%) IgM positive, and 14 (61%) isolation positive. The concordance rate between the RT-LAMP assay and isolation, RT-PCR assay, and IgM level was 74% (17/23), 83% (19/23), and 83% (19/23), respectively. Three patients (13%), who were IgM negative, developed mumps after vaccination, which correlated with a previous study that proved IgM detection as an unreliable marker in vaccinated persons. Thus, the RT-LAMP assay will be more beneficial when the future vaccination rate increases. Therefore, we concluded that the clinical diagnosis of mumps is unreliable, and the RT-LAMP assay is noninvasive, and useful for a rapid and accurate diagnosis of mumps.

Key words: mumps, salivary gland swelling, rapid diagnosis, laboratory diagnosis, loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

(受付: 2018年6月4日, 受理: 2018年12月4日)