

イムノクロマト法を用いた 単純ヘルペスウイルス抗原の検出

Detection of herpes simplex virus antigen
using immunochromatography

わた なべ だい すけ
渡 辺 大 輔
Daisuke WATANABE

はじめに

皮膚、粘膜の単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) 感染症である単純疱疹は口唇ヘルペスや性器ヘルペスとして皮膚科、婦人科、泌尿器科などで目にする事の多いウイルス感染症である。典型的な症例は問診、視診および臨床経過で診断可能であるが、診断困難な非典型例や、また単純疱疹と帯状疱疹の鑑別が困難な場合、ウイルス学的な検査を行う場合がある。ウイルスは目に見えるものではないため、検査ではウイルスの核酸やタンパク、感染に対する生体反応としての抗体価を用いて診断を行う。本稿では単純疱疹の検査について、主にイムノクロマト法を中心に解説する。

I. HSV感染症の特徴

HSV 感染症では、初感染の多くが皮膚や粘膜に症状が現れない不顕性感染であり、初感染後は神経節に潜伏感染する。潜伏していた HSV が紫外線、精神的ストレス、疲労、外傷、手術や性行為などの誘因によって再活性化すると再発病変を形成するか、無症候性にウイルスを排泄して新たな感染を引き起こす。HSV-1 は主として口唇ヘルペスの、HSV-2 は主として性器ヘルペスの原因となる¹⁾。

II. 単純疱疹の診断

1. 臨床診断

単純疱疹の多くは問診、視診で診断可能な典型例であるが、帯状疱疹、伝染性膿痂疹、接触皮膚炎、ざ瘡、毛囊炎、口角炎、手足口病、またベーチェット病や固定薬疹などとの鑑別が難しい非典型例では、検査による診断が必要である。

2. Tzanck 試験

Tzanck 試験はウイルス感染した表皮角化細胞を検出する検査である。外来で簡便にでき、ヘルペス性の皮膚病変の確認には非常に力を発揮する。ただし、HSV 感染症と水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella zoster virus: VZV) の鑑別はできない。具体的な方法だが、剪刀、摂子などで水疱蓋を一部切除し、内側をスライドガラスにスタンプする。びらん面の場合は綿棒でびらんをこすり、スライドガラスに接触させる。自然乾燥、もしくはライターでごく軽くあぶって乾燥させ、メタノール固定、ギムザ染色を行うが、ギムザ原液を用いれば数分で固定、染色が可能である。水洗後、顕微鏡で多核巨細胞の有無を観察する。

3. 蛍光抗体法

Tzanck 試験と同様に、検体を採取した後にアセトン固定し、ウイルス抗原 (HSV-1,2) に対する FITC 標識モノクローナル抗体を用いて染色し、蛍光顕微鏡でウイルス抗原陽性細胞を検出する。30 分程度

で診断可能であるが、検査の感度70%程度とあまり高くない事もあり、細胞量のある程度確保しないと偽陰性となる場合がある。保険適用もあり、蛍光顕微鏡が無い場合は検査受託会社への外注が可能であるが、検査結果の報告までには2～3日ほど必要である。

4. 血清学的診断

HSVを含むヘルペスウイルスは宿主に潜伏感染するウイルスであり、再発性単純疱疹はウイルスの再活性化による病変であるため、抗体価による診断は慎重に判断する必要がある。つまり、抗体価が陽性になったからといっても、それは単に過去に感染既往歴があったことを証明するだけに過ぎず、現在の感染を示すものではない。つまり、1回の抗体価測定のみで、現在の感染を証明する事は困難である。さらに再活性化の場合、血清抗体価が早期に上昇するため、ペア血清での有意上昇が把握できないこともある。以下に主な測定法の原理と特徴について簡単に述べる。

a. CF法

補体が抗原抗体複合体に結合し、溶血素と協同して溶血反応を起こす性質を利用したウイルス抗体価の測定法である。CFは長時間持続しないため、一般に過去の感染で得られた免疫状態を知る事はできない。しかし、HSV感染を疑って福岡市内のクリニックを受診した患者のHSV-CF抗体価を調べた研究では、陽性率(≥8倍)は年齢とともに高くなっており²⁾、また、初診時から陽性を示す患者が多かった。このことから、HSVは繰り返し再活性化することで常に免疫を刺激し、HSV-CF抗体が陽性に維持されている可能性が示唆された。つまり、単回のCF測定で現在のHSV感染を証明することはできない。また、不顕性を含め再活性化を繰り返している場合、ペア血清でも抗体上昇が明確に証明できない場合がある。

b. NT法

ウイルス粒子に抗体が付着すると、そのウイルス粒子の感染性が失われる(中和される)ことを利用した測定法である。抗体とウイルスによる抗原抗体複合体を培養細胞に接種し、細胞変性効果(CPE)を確認する。ウイルスの活性を50%阻止するところを中和抗体価とする。特異性が高く信頼できる方

法であるが、HSVの型判別はできない。

c. EIA/ELISA法

抗原または抗体に酵素(西洋ワサビペルオキシダーゼ・βガラクトシダーゼ・アルカリフォスファターゼ)を結合させ、その酵素活性をマーカーとして抗原抗体反応の程度を知り、これらから目的物質の抗原あるいは抗体量を求める。固相化抗体を用いた場合はELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)と呼ばれる。IgM, IgG抗体を区別して測定できるが、HSV感染症では再活性化時にもIgM抗体価が陽性を示す場合がある事に留意する。

d. gG ELISA法

gG ELISAはウイルスのエンベロープに存在するglycoprotein(糖蛋白)Gの抗体を測定する検査法である。前述した血清抗体検査はいずれも型別判定はできないが、gGはHSV-1とHSV-2で型特異性が高いため、型別判定が可能である。ただし、gG欠損株が存在する点と、gGは抗原性が低いので抗体価が上昇するまで時間がかかる点に注意が必要である。

5. 核酸増幅検査

ウイルスDNAを増幅して検出する事で感染を証明する方法であり、HSV感染症では水疱内容物、皮膚、また血液、唾液、髄液などからDNAを抽出してPCR, real-time PCR法を行う。免疫不全状態の場合、real-time PCR法によるHSV核酸定量が一連として一回のみ保険算定できる。

LAMP法は、サンプルDNA、標的遺伝子の6つの領域に対する4種類のプライマー、鎖置換型DNA合成酵素、基質等を混合した後60℃から65℃、1時間で反応させることで目的のDNAを増幅可能な方法である。通常のPCRとは異なり、短時間、一定温度で反応させる事が可能であり、またHSV感染症では水疱拭い液からのDNA抽出を行う事無く、最短1時間でウイルスDNAの検出が可能である³⁾。保険適用はない。

Ⅲ. イムノクロマト法について

感染症に対するイムノクロマト法による抗原検査は、簡便で迅速性に優れた検査法である。HSVに対しても感度、特異度とも優れ、ウイルス分離培養法と比較しても高い検出感度を示す抗原診断キット

が存在していたが、既承認のものは性器あるいは角膜由来の検体のみに保険適用があり、比較的患者の多い口唇や顔面のHSV感染症を疑う病変に対しては使用できなかった。今回、性器、口唇を問わず皮膚HSV感染症の診断に用いることができるイムノクロマト抗原検査キット「デルマクイック®HSV」が使用可能になった⁴⁾。

1. 原理

デルマクイック®HSVは、着色セルロースを用いたイムノクロマト法を測定原理とする迅速診断キットである(図1)⁴⁾。テストカートリッジ内のメンブレン上には、抗HSVモノクローナル抗体(ヒト)が固相化しており、また、着色セルロース粒子標識抗HSVモノクローナル抗体(ヒト)を含んだコンジュゲートパッドがセットされている。キット付属の滅菌綿棒で採取した検体を、専用の検体抽出液に抽出し、試料3滴をテストカートリッジの試料滴下部に滴下すると、試料中のHSV抗原は、コンジュゲートパッド中の着色セルロース粒子標識抗HSVモノクローナル抗体(ヒト)と反応して免疫複合体を形成する。この免疫複合体は、毛細管現象によりメンブレン上を移動し、5～10分後に判定部において、テストライン部に固相化された抗HSVモノクローナル抗体(ヒト)に特異的に捕捉され赤色のラインを形成することによって、試料中のHSV抗原が検出できる(図1)⁴⁾。

2. 基礎的・臨床性能試験の結果⁴⁾

培養HSVを用いた本キットの最小検出感度はHSV-1が 1.7×10^3 PFU/mL、HSV-2が 6.7×10^3 PFU/

mLであり、わずかな差はあるもののHSV-1,2ともに反応することが確認され、HSVの検出キットとして臨床使用可能な感度を有していた。

臨床的な有用性を検討するため、実際に皮膚の水疱、膿疱、びらんまたは潰瘍病変から採取された259検体(皮膚由来131検体、性器由来128検体)を用いて、臨床診断、リアルタイムPCR法と本キットとの比較を行った。

リアルタイムPCR法による型判別ではHSV-1陽性が68検体、HSV-2陽性が69検体であった。リアルタイムPCR法に対する本キットの陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ78.8%、99.2%、88.4%であった。また、性器由来の128検体に対して本キットと従来のキットとの相関性を確認したところ、陽性一致率、陰性一致率、全体一致率はそれぞれ94.4%、91.9%、93.0%であった。

臨床所見との比較では、臨床所見でHSV感染症と診断された172検体のうち、リアルタイムPCR法陽性は131検体で陽性一致率は76.2%、その他の疾患と診断された87検体のうち、リアルタイムPCR法陰性は81検体で陰性一致率は93.1%、全体一致率は81.9%であった。一方、臨床所見でHSV感染症と診断された172検体のうち、本キット陽性は106検体で陽性一致率は61.6%、その他の疾患と診断された87検体のうち、本キット陰性は84検体で陰性一致率は96.6%であり、全体一致率は73.4%であった。

皮疹出現後日数と本キット陽性一致率の関連性では、リアルタイムPCR法陽性のうち、本キットの陽性率は、1日目92.3%、2日目87.1%、3日目82.4%、4日目76.0%、5～6日目63.6%、7～15日目60.0%

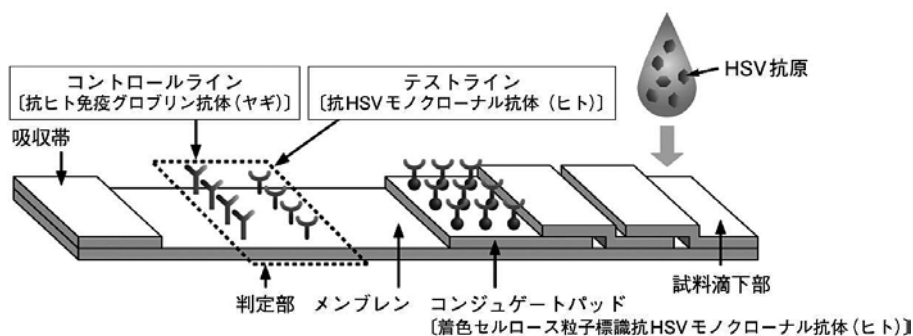


図1 デルマクイック®HSVの原理

試料滴下部に滴下された試料中のHSV抗原は、コンジュゲートパッド中の着色セルロース粒子標識抗HSVモノクローナル抗体(ヒト)と反応して免疫複合体を形成する。免疫複合体は毛細管現象によりメンブレン上を移動し、テストライン部に固相化された抗HSVモノクローナル抗体(ヒト)に特異的に捕捉され赤色のラインを呈する。

(文献4)より転載)

であり、皮疹出現から検体採取までの日数が短いほど本キットの陽性一致率が高い傾向が見られた。

皮疹の状態と陽性率の関係では、皮膚由来のうち、水疱、膿疱、びらん・潰瘍の陽性一致率はそれぞれ91.4%、80.0%、66.7%であった。性器由来のうち、水疱、膿疱、びらん・潰瘍の陽性一致率はそれぞれ85.7%、80.0%、71.4%であった。採取部位にかかわらず、水疱、膿疱、びらん・潰瘍の順に本キットの陽性一致率が高い傾向が見られた。

3. 実際の臨床でどう使うか？

デルマクイック®HSVの基礎的検討の結果では、培養HSVでの最小検出感度はHSV-1が 1.7×10^3 PFU/mL、HSV-2が 6.7×10^3 PFU/mLであったこと、既存のイムノクロマトキットと比べても性能に遜色ないこと、またリアルタイムPCRとの比較でも、陽性一致率はやや低いながらも遜色ない結果であり、実際の臨床現場でも効力を発揮すると思われる。また、臨床試験の結果からは本キットの陽性一致率は61.6%、陰性一致率は96.6%、全体一致率は73.4%であった。この臨床試験ではリアルタイムPCRとの陽性一致率は76.2%であったことを考えると、単純疱疹は臨床的にかなり過剰診断されている可能性が考えられる。そのため、臨床的にHSV感染症を疑った場合は、積極的に本検査を実施し、陰性だった場合は改めて臨床診断を考え直すことで、正しい診断に近づくものと思われる。また、本キットの特

徴として、先行して販売されているVZV診断キット(デルマクイック®VZV)と同一の試薬を使用しているため、HSV感染症を疑って本キットを使用し、陰性だった場合、同一検体でVZVの抗原検出検査をすることができる(図2)⁵⁾。皮疹の種類別での検討では水疱、膿疱、びらん・潰瘍の順に本キットの陽性一致率が高い傾向が見られた。びらん・潰瘍病変では感染表皮が欠損しているため、採取ウイルス量が少なくなる傾向があると考えられる。このため、本キットを用いた診断にあたっては、なるべく水疱病変から検体を採取すること、また、びらん、潰瘍病変では検体採取を十分に行うようにする事が望ましいと考えられる。

おわりに

以上、HSV感染症を疑った場合の検査について、イムノクロマト法を中心に解説した。ヘルペスウイルスは潜伏感染、再活性化するという特殊な生活環を持つウイルスである。本稿で解説した検査はそれぞれの有用性や感度、特異度、そして限界を持っている。診断にあたっては各検査法についてよく理解した上で適切な検査を選択し、正しい解釈をしていく事が非常に重要である。また、臨床現場で簡便に使用できるイムノクロマト法を積極的に使用することで、単純疱疹の過剰診断を防げる可能性がある。

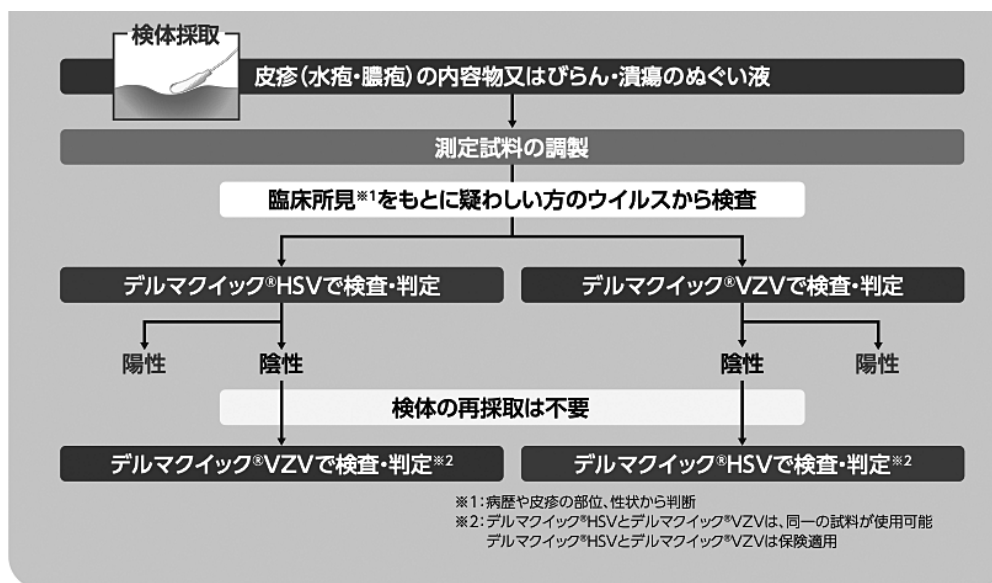


図2 イムノクロマト法の併用
(文献5)より転載)

文 献

- 1) 渡辺大輔. 臨床講義 単純ヘルペスウイルス感染症の最前線-正しい診断, 治療のために. 皮膚科の臨床. 2011; **53**(2): 233-239.
- 2) Miyachi M et al. Incidence of serum antibody titers against herpes simplex virus in Japanese patients. *J Dermatol.* 2017; **44**: 47-51.
- 3) Enomoto Y, et al. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid: comparison between loom-mediated isothermal amplification and real-time PCR. *J Clin Microbiol*, 2015; **194**(4): 181-185.
- 4) 帆足省吾, 他. イムノクロマト法を用いた単純ヘルペスウイルス抗原キットの性能評価. *新薬と臨牀*. 2023; **72**: 107-121.
- 5) マルホ株式会社. 「デルマクイック HSV の検体採取方法」, https://www.maruho.co.jp/medical/articles/dermaquick_hsv/sample/index.html (引用 2023年5月14日)