

デングウイルス感染症の検査法、抗原定性について

Diagnostic testing for dengue virus infection, antigen detection method

かめ おか まさ のり
 亀 岡 正 典
 Masanori KAMEOKA

ルス感染症が重症化するという説もある¹⁾。

はじめに

デング熱・デング出血熱はフラビウイルス属フラビウイルス科のデングウイルス感染により引き起こされる蚊媒介性ウイルス感染症であり、デングウイルス感染者を吸血した蚊がウイルスに感染し、その蚊が非感染者を吸血することで、ヒト-蚊-ヒトのサイクルで感染伝播する。原因となるデングウイルスには4つの血清型、1-4型があり、熱帯・亜熱帯地域に広く蔓延している。そのため、世界中で25億人に感染リスクにあるとされる。また、年間約1億人のデング熱患者と約50万人のデング出血熱患者の発生が推定される。日本には年間100-200例の輸入感染例が認められる。また、2014年に約70年来の国内感染例が160例以上発生した^{1,2)}。

デングウイルス1-4型のすべてがデング熱やデング出血熱を引き起こす。デングウイルスに感染後、5-8割は不顕性感染と考えられる。一方、顕性感染については、比較的軽症なデング熱と重篤なデング出血熱に分類される。デング熱は一過性の熱性疾患であり、主な症状として発熱(39-40℃)、頭痛、眼窩痛、筋肉痛、関節痛などが挙げられる。また、食欲不振や腹痛、便秘を伴うこともある。一方、重篤なデング出血熱を発症すると、出血、血小板の減少、また、血管透過性亢進による血漿漏出を引き起こす。また、デングショック症候群に発展して出血性ショックを引き起こすこともある。デング出血熱を発症した場合、適切な治療を施さないと死に至る。デング熱の致死率は1%未満であるのに対して、デング出血熱のそれは10-20%とされている。血清型の異なるウイルスに二次感染することでデングウイ

I. デングウイルス感染症の診断

直接的に病原体であるウイルスを検出する病原学的検査として、血清からのウイルス分離、RT-PCR法によるウイルス遺伝子の検出、ウイルス非構造タンパク質NS1抗原の検出(定性検査)が用いられる。また、間接的にウイルス感染を検出する血清学的検査として、デングウイルス特異的IgM抗体の検出、急性期と回復期の血清(ペア血清)で中和抗体価の4倍以上の上昇を検出する方法などが用いられる。これらのいずれかが認められるとデングウイルス感染症とみなす³⁾。各検査法の詳細に関しては国立感染症研究所が発行するデングウイルス感染症診断マニュアル、WHOや米国CDCが発行するガイドラインなどを参照されたい³⁻⁵⁾。今回、検査法の概要を以下に述べる。また最近保険適用された抗原検出に関して検出方法の詳細を述べる。

II. 検査法の概要

WHOのガイドラインによると、病原学的検査の中では、ウイルス分離、遺伝子検出、抗原検出の順に信憑性が高いと考えられる。また、遺伝子検出やウイルス分離は抗原検出と比べて感度が高いとされるが、同時にコスト高でもある⁴⁾。また、血清学的検査の一つであるIgM抗体の検出はウイルス分離や遺伝子検出などの病原学的検査より低コストであるが、感染後に免疫反応が誘導されるまで多少の時間がかかるため、病原学的検査と比較すると診断に時間を要する。

ウイルス分離は、発症後 5-6 日以内の血清試料と Dengue ウイルスに感受性の高いヒトスジシマカ培養細胞株 C6/36 細胞を用いて行う。ウイルス分離を行うには病原体の取り扱いが可能なバイオセーフティレベル (BSL) 2 施設で行う必要がある。また、細胞培養技術が必要となる。ウイルス分離に用いる血清試料は採取後 24 時間以内は冷蔵保存、それ以降は超低温フリーザーに冷凍保存が必要となり、試料の凍結融解は避けるべきである。ウイルスが分離されるまで 1-2 週間の細胞培養を要する。ウイルス分離の判定は次に述べる遺伝子検出などで行う。

遺伝子検出として、発症後 5-6 日以内の血清試料より RNA を抽出して、Dengue ウイルス RNA ゲノムを RT-PCR 法により検出する。遺伝子検査には分子生物学的実験技術が必要となる。試料の保存条件はウイルス分離と同様である。検査には 1-2 日かかる。遺伝子検出には Dengue ウイルスの血清型も解析できる利点がある。

血清からの Dengue ウイルス特異的 IgM 抗体の検出は ELISA 法 (正式名称は Enzyme linked immunosorbent assay、原理は後述) などで行う。Dengue ウイルスに初感染した場合、発症後 3-5 日で感染者の 50% が、また、10 日目には感染者の 99% が IgM 抗体陽性となる。一方、ウイルスに二次感染した場合は、感染初期の IgM 抗体レベルは低いか、あるいは、検出できないレベルとなる⁴⁾。血清学的検査に用いる検体は冷蔵保存するが、IgM 抗体を含む検体を長期間保存する際は超低温フリーザーでの保存が望ましい。検査には数時間から数日かかる。Dengue ウイルスに対する IgM 抗体は他のフラビウイルスと交差反応があるため検査結果の判定には注意が必要である。

Dengue ウイルスに対する中和抗体価の検出は、アフリカミドリザル腎細胞株 Vero 細胞に Dengue ウイルスと共に血清試料を混和した細胞培養系で、ウイルス増殖が血清試料の添加により阻止されるか否か評価する。ウイルス分離と同様に BSL2 施設で行う必要がある。通常、Dengue ウイルスに対する IgG 抗体は、初感染の場合、発症後約 1 週間で低レベルに検出されはじめ、その後、IgG 抗体レベルが上昇して数ヶ月間検出され続ける。一方、二次感染では IgG 抗体は感染初期より上昇する。抗体価の評価には、急性期血清 (発症後 1-5 日) および回復期血清 (発症

後 15 日以降) のペア血清を比較して検査する⁴⁾。検査には 1 週間以上かかる。

Ⅲ. NS1 抗原検出について

病原学的検査の中で、遺伝子検査やウイルス分離は操作が煩雑で熟練を要し、上記の通り、ウイルス分離は 1-2 週間、核酸検出には 1-2 日を要する。一方、抗原検出はこれらの検査法に比べると簡便かつ迅速に行える。抗原検出の感度はウイルス分離や核酸検出に劣るとされ、また、Dengue 熱発症初期に診断の補助的に使用することが提唱されている。しかし RT-PCR 法によりウイルス遺伝子が検出不能な遺伝子変異ウイルス株についても NS1 抗原の検出は可能という報告もあり⁶⁾、有用な検査法と考えられる。WHO のガイドラインでは、NS1 抗原は発症後 6 日まで、別の報告では初感染および二次感染の両方で発症後 9 日目まで検出可能とされている^{7,8)}。抗原検出に用いる血清試料は、採取後 24 時間以内は冷蔵保存、それ以降は -20℃ に冷凍保存が必要となり、試料の凍結融解は 3 回程度までとする。以下に NS1 抗原検出について検出方法の原理も含めた詳細を述べる。

1. ELISA 法による抗原検出 (図 1)

ELISA は抗体を使った免疫学的測定法の一つである。抗原と抗体の反応は特異性が高く、また抗原・抗体反応により生じる免疫複合体は安定している。この性質を利用してウイルス抗原などを特異的に検出することが可能である。通常は 96 ウェルのマイクロプレートを使う。また、基本的な方法としてサンドイッチ法が挙げられる。サンドイッチ法では、抗原キャプチャー抗体として、標的抗原に対する抗体をマイクロプレートのウェルに固相化する。その後、ウェルに抗原を含む測定試料を加え、キャプチャー抗体と抗原の間で免疫複合体を形成させる。洗浄操作により、抗原以外の試料中の物質を洗い流して、また、非特異反応を除いた後に、検出用の抗体を反応させる。結果として、測定試料中に抗原が存在すれば、抗原がキャプチャー抗体と検出用抗体でサンドイッチされた複合体がウェル内に形成される。検出用の抗体は酵素標識されていて、発色基質を加えることで呈色反応が起こる。その後、反応停

止液を加えて吸光度測定を行う。この方法で抗原の量が吸光度として測定できる。保険適用された NS1 抗原を検出する ELISA キット、プラテリア デング NS1 Ag キット (Bio-Rad) に関しては、抗原キャプチャー抗体として抗 NS1 単クローン抗体を、また、検出用抗体としてペルオキシダーゼ標識された別の抗 NS1 単クローン抗体を用いて、血清試料から約 90 分で NS1 抗原を検出する。データシート上では RT-PCR 法による遺伝子検査法と約 92%、IgM 抗体検出法と 74% の相関が認められるとされている。また、他のフラビウイルス (黄熱、日本脳炎、西ナイルウイルス) との交差反応は示さないとされている。南米などでデングウイルス試料やデング疑い試料を用いたいくつかの報告によると、デングウイルス陽性検体の約 70-93% が同キットでも陽性、またデングウイルス陰性検体を陰性と判定することなど

を基準とした特異性は約 92-100% と報告されている^{7,9-12)}。

2. イムノクロマトグラフィー法による抗原検出 (図 2)

イムノクロマトグラフィー法は、抗原・抗体反応により形成される免疫複合体をセルロース膜上で毛細管現象を利用したクロマトグラフィーにより検出する迅速検査の手法の一つである。抗原あるいは抗体のいずれの検出にも使用できる。抗原を検出する場合、検体滴下部に金コロイド粒子などの可溶性微粒子で標識した抗体を準備しておく。また、金コロイド粒子などで標識したstreptavidinを併せて検体滴下部に準備しておく。測定試料中の抗原と金コロイド標識抗体は免疫複合体を形成しながらセルロース膜上を移動し、セルロース膜上のテストエリアにあらかじめ線状に固相化されているキャプ

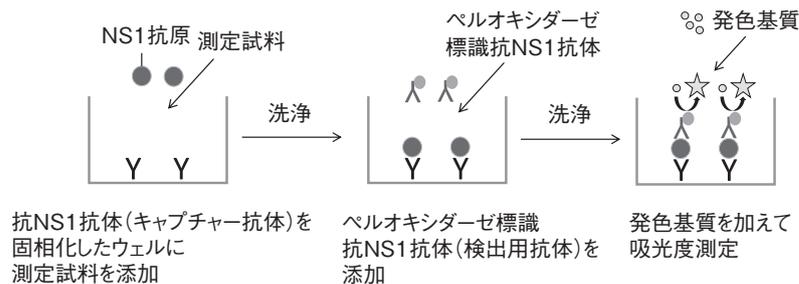


図 1 ELISA法によるデングウイルスNS1抗原の検出

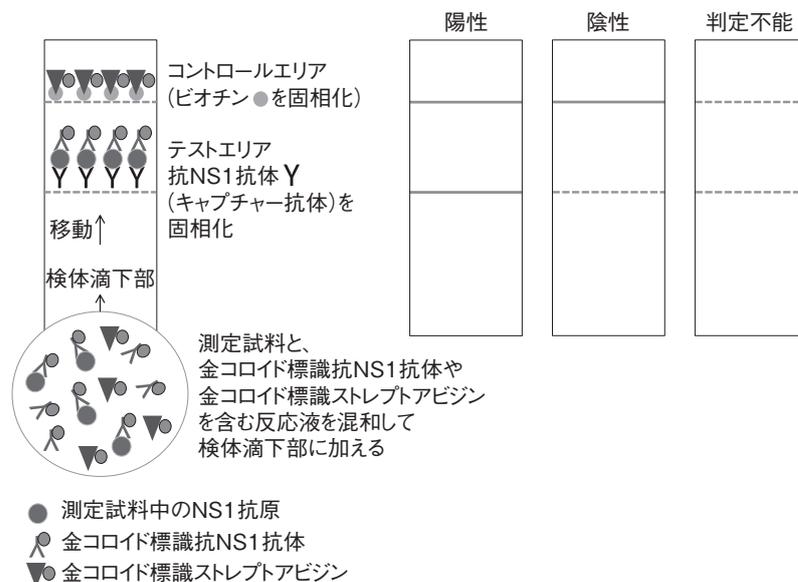


図 2 イムノクロマト法によるデングウイルスNS1抗原の検出

チャー抗体にトラップされ、可視化されたテストラインとして現れる。また、金コロイド粒子標識ストレプトアビジンはテストエリアを通過して移動して、コントロールエリアにあらかじめ固相化されているビオチン(ストレプトアビジンとビオチンで複合体を形成する性質を持つ)にトラップされ、可視化されたコントロールラインとして現れる。テストエリアとコントロールエリアの両方にラインが現れた場合は陽性と判定される。また、コントロールエリアのみにラインが現れた場合は陰性と判定される。なお、コントロールエリアにラインが現れない場合は判定不能となる。このように、イムノクロマトグラフィー法は目視で結果を判定することができるため、簡便な迅速診断方法として利用される。イムノクロマトグラフィー法による Dengue ウイルス NS1 抗原の検出キットに関しては、金コロイド標識された抗 NS1 単クローン抗体を使用して、血清から約 15-20 分の反応時間で判定可能とされている。複数のキットが市販されていて、中には NS1 抗原と Dengue ウイルスに対する IgM 抗体や IgG 抗体を同時に検出するキットもある。しかし、現時点ではイムノクロマトグラフィー法による NS1 抗原検出は保険適用されていない。イムノクロマト法を用いた複数のキットの感度や特異性について、キット間で多少ばらつきはあるが、南米の Dengue 疑い試料について、RT-PCR あるいは IgM 抗体検出法との相関性を解析して、感度がこれらいずれかの方法の約 51-90%、また、Dengue ウイルス陰性検体を陰性と判定することを基準とした特異性は約 93-100% と報告されている^{9~11)}。

おわりに

以上のように、Dengue ウイルスの NS1 抗原を検出する抗原検出法は、ウイルス分離や遺伝子検出と比較して簡便かつ迅速に Dengue ウイルス感染を検出でき、また、高い検出感度と特異性を示す検査法である。これまでに ELISA 法によるプラテリア Dengue NS1 Ag キットが保険適用されているが、今後、より簡便な迅速診断方法として利用できるイムノクロマトグラフィー法を用いた NS1 抗原検出キットも保険適用されることが望まれる。プラテリア Dengue NS1 Ag キットの保険適用条件は、国立感染症研

究所が作成した「Dengue 熱・チクングンヤ熱の診療ガイドライン」に基づき Dengue 熱を疑う患者のうち、患者の集中治療に対応できる医療機関に入院を要するような重症患者に限るとされている。すなわち、Dengue ウイルス感染者を早期発見するために一般病院や診療所などで行う検査については保険適用とされない。NS1 抗原検出のメリットとして、感染初期の Dengue ウイルス感染者を、軽症、重症にかかわらずベッドサイドなどで早期発見することが可能であることが挙げられる。感染者の早期発見は、Dengue ウイルスの発生を早期に把握することに繋がり、迅速な感染制御対策が可能となる。今回の保険適用は重症ケースに限られるということで、Dengue ウイルスの早期発見はその目的には考えられていないのかもしれない。個人的には、Dengue 疑い患者を他の熱性疾患やマラリアや腸チフスなどの熱帯感染症と迅速に鑑別するために、一般病院や診療所などでも NS1 抗原検出がより広く使われることが日本の Dengue ウイルス感染症対策に有効に働くと考える。

文 献

- 1) 国立感染症研究所, Dengue 熱・チクングニア熱の診療ガイドライン, http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou19/dl/dengue_fever_jichitai_20150421-02.pdf
- 2) 国立感染症研究所, Dengue 熱・Dengue 出血熱 2011~2014, IASR 2015 ; 36 : 136.
- 3) 国立感染症研究所, Dengue ウイルス感染症診断マニュアル, <http://www0.nih.go.jp/vir1/NVL/denguelabomanual.pdf>
- 4) WHO, Dengue : Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
- 5) CDC, Dengue Homepage : Laboratory Guidance and Diagnostic Testing, <http://www.cdc.gov/Dengue/clinicalLab/laboratory.html>
- 6) 赤地重宏, 田沼正路, 片山正彦, Dengue 熱症例における NS1 抗原検査有用性の検討, http://www.kinrenju.jp/housyou/H24_G7.pdf
- 7) Dussart P, Labeau B, Lagathu G, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum, Clin Vaccine Immunol. 2006 ; 13(11): 1185-1189.
- 8) Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. J

- Clin Microbiol. 2002 ; **40**(2) : 376-381.
- 9) Osorio L, Ramirez M, Bonelo A, et al. Comparison of the diagnostic accuracy of commercial NS1-based diagnostic tests for early dengue infection. *Virology*. 2010 ; **7** : 361.
 - 10) Lima Mda R, Nogueira RM, Schatzmayr HG, et al. Comparison of three commercially available dengue NS1 antigen capture assays for acute diagnosis of dengue in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 ; **4**(7) : e738.
 - 11) Pal S, Dauner AL, Mitra I, et al. Evaluation of dengue NS1 antigen rapid tests and ELISA kits using clinical samples. *PLoS One*. 2014 ; **9**(11) : e113411.
 - 12) Kumarasamy V, Wahab AH, Chua SK, et al. Evaluation of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for laboratory diagnosis of acute dengue virus infection. *J Virol Methods*. 2007 ; **140**(1-2) : 75-79.