

蛍光標識モノクローナル抗体による 水痘・帯状疱疹ウイルス感染症の診断

東京慈恵会医科大学皮膚科 新村 真人	救世軍ブース記念病院皮膚科 村木 良一**
国立予防衛生研究所病理部 倉田 毅	藤田学園保健衛生大学医学部小児科 浅野 喜造
北海道大学歯学部口腔細菌学教室 坂岡 博	三重大学医学部小児科 神谷 斎** 伊藤 正寛
岩手医科大学医学部細菌学教室 川名 林治	大阪大学微生物病研究所麻疹部門 高橋 理明 山西 弘一
東京大学医学部付属病院分院産婦人科 川名 尚	近畿大学医学部皮膚科 吉田 正己
東京女子医科大学皮膚科 肥田野 信	大阪大学医学部眼科 下村 嘉一
東京大学医学部付属病院分院皮膚科 玉置 邦彦*	岡山大学医学部ウイルス学教室 新居 志郎
東京慈恵会医科大学皮膚科 本田まりこ	九州大学医学部ウイルス学教室 森 良一 皆川 洋子
東京大学医科学研究所病理部 本藤 良	宮崎医科大学微生物学教室 南嶋 洋一
国立予防衛生研究所病理部 佐多徹太郎	

* 現：山梨医科大学
** 現：筑波大学臨床医学系
*** 現：国立療養所三重病院
(平成1年6月13日受付)
(平成1年7月28日受理)

Key words : *Varicella-zoster virus, monoclonal antibody, diagnosis, varicella, herpes zoster*

要 旨

蛍光標識モノクローナル抗体 (mAb) を使用した水痘・帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus, VZV) 抗原検出用診断キットの有用性を検討した。本キットは本邦で分離された VZV14株の感染細胞すべてを明瞭に染色し、15株の単純ヘルペスウイルス1型 (HSV-1) および14株の同2型 (HSV-2) の感染細胞では交差反応はみられなかった。

別刷請求先：(〒105) 港区西新橋 3-19-18
東京慈恵会医科大学皮膚科 新村 真人

平成2年2月20日

ヘルペスウイルス感染症の疑いのある患者の病変部より採取した検体について検討をおこない、臨床診断で水痘と診断されたもの105例中92例(87.6%)、带状疱疹と診断された190例中176例(92.6%)でVZV抗原陽性であった。一方、単純ヘルペスと診断された96例中VZV陽性と判定されたものが5例あり、これらの5例はすべて蛍光抗体法でHSV抗原陰性であることが確認された。更に、臨床的に带状疱疹、単純ヘルペスいずれとも診断のつかなかった24例中9例がVZV抗原陽性であった。またウイルス分離培養を実施した258例中VZVが分離された109例すべてについて本キットで陽性判定が得られ、HSVが分離された69例はすべてについて陰性であったことから本キットの感度が高く、HSVとの交差反応性のないことが確認された。また水痘または带状疱疹と臨床診断されたもので、ウイルス分離でVZV、HSVともに分離されなかった60例中53例(88.3%)が本キットでVZV抗原陽性と判定された。以上より、本キットは特異性がきわめて高く、臨床診断を補い、かつウイルス分離培養法に比較し検出率も高く、操作が簡便で迅速であり、水痘および带状疱疹の臨床検査用の診断薬として極めて有用であると結論された。

序 文

水痘・带状疱疹ウイルス(Varicella-zoster virus, VZV)は、主に小児期での初感染で水痘を発症させる。その後、脊髄後根などの知覚神経節に潜伏感染し、中高年期にかけて、あるいは種々の重篤疾患による宿主の免疫状態の低下などに伴い、ウイルスが再活性化され带状疱疹を発症する^{1)~3)}。水痘および带状疱疹はときに単純ヘルペスウイルス(Herpes simplex virus, HSV)感染症と鑑別が困難で、臨床診断が容易でないこともある。また、最近では選択毒性のある抗ウイルス剤の開発が進むにつれ、治療においても両者を鑑別する必要を生じるようになった。したがって、すでに市販されているHSV用蛍光抗体診断薬^{4)~6)}に加え、HSV感染とVZV感染とを厳密に、しかも迅速に診断するVZV診断薬の開発の必要性が高まってきた。今回我々はfluorescein isothiocyanate(FITC)を標識した抗VZVマウスモノクローナル抗体(mAb)⁷⁾を用いて、病変部より採取した材料および既に分離されているウイルスの感染細胞からVZV抗原を特異的に、しかも迅速、簡便に検出することができたので報告する。

材料と方法

(1) FITC 標識 mAb

山西らが確立したハイブリドーマのクローン8およびクローン17が産生するmAb⁷⁾にFITCを標識し、両者を混合し蛍光抗体診断用キットとして使用した(東燃株式会社より提供を受けた)。クローン8はVZVの糖タンパク質gp3を、クロー

ン17はVZV感染細胞の核タンパク質を認識するmAbであるが、後者の具体的な対応抗原は同定されていない。なお用いた標識抗体のF/P(色素と抗体の結合比)は3.6で、mAbの濃度は0.2mgタンパク質/mlであった。

(2) 対象材料

対象患者のサンプルは16の病院および研究施設で集められた431症例である。本試験は昭和63年2月より同年10月にかけておこなわれた。水痘あるいは带状疱疹患者を対象とし、対照として単純ヘルペスその他の水疱性疾患の水疱蓋、水疱内容、水疱底および糜爛面から材料を採取した。患者の病巣から、細胞を綿棒などで採取し、4穴のスポットスライドグラスに塗抹し、自然乾燥後、アセトンで10分間固定し直ちに染色を行うか、 -20°C 以下に保存し、後日染色した。また同時に、病変部からのウイルスの分離培養を後述の方法で行った。

(3) 抗原検出

染色は次の手順に従った。上記固定スライドグラス試料にFITC標識した抗VZV抗体(本キット)、抗HSV-1抗体あるいは抗HSV-2抗体をそれぞれ $30\mu\text{l}$ 重層し、 37°C 30~45分間、あるいは室温45~60分間湿潤箱にて反応させた。HSV-1とHSV-2の鑑別診断用にはマイクロトラック・ダイレクト用キット⁴⁾を使用した。次に、リン酸緩衝液と蒸留水あるいは水道水にて洗浄後、緩衝グリセリン液(pH 9.4)でマウントし、蛍光顕微鏡にて観察した。明瞭な核を持ち、細胞形態のはっきり

したものについてのみ判定し、細胞質と核に顆粒状の特異蛍光を認めたものを陽性とした。陽性および陰性の標準試料として、VZV 感染および非感染の HEL 細胞を塗抹したスライドグラスを同時に観察した。通常は200倍および400倍で鏡検した。

(4) VZV と HSV 間の交差反応性

VZV キットの HSV-1あるいは HSV-2との交差反応性を検討するため、合計43株の HSV および VZV 新鮮分離株を選び、7つの各研究機関で、それぞれ6株づつについて、内容を知らせずにウイルス株の同定を行った。

(5) ウイルス分離培養

ウイルスの分離培養は、水疱内容を、VZV では HEL 細胞に、HSV では Vero 細胞あるいは HEL 細胞に接種して行った。ウイルスの同定は FITC 標識した VZV, HSV-1および HSV-2の mAb を使用し、あるいは中和法などで行った。

成 績

(1) キットによる染色所見

染色は一般に鮮明であった。陽性細胞の特徴は、細胞質全体が染まることと、核に特異的な顆粒状の染色のあることである。写真1は水痘例の水疱蓋塗抹標本で検出された VZV 抗原を示し、核内および細胞質に広汎に特異蛍光がみられる(原倍率×66)。写真2も水痘例の VZV 抗原の染色を示し、核内と細胞質に明瞭な特異蛍光がみられる。矢印(←)は多核巨細胞を示す(原倍率×132)。陰性細胞はエバンスブルーを添加することにより暗赤色に染色され、黄緑色の特異蛍光を示す陽性細胞から鮮明に区別できた。ただし、膿疱より得られる試料の中には時に白血球の細胞質中に非特異的な淡い dull green の染色像がみられることがあった。しかし、核の特異的な顆粒状の蛍光染色所見を目安にすることにより、判定することができた。

(2) 患者検体での抗原検出

対象症例数は431例、その内258例についてはウイルス分離を行った。臨床診断では、水痘105例、带状疱疹190例、単純ヘルペス96例、带状疱疹、単純ヘルペスの区別がつかなかったもの24例、その他の水疱7例であった。角膜ヘルペスおよび眼科関連の症例として带状疱疹が4例、単純ヘルペス

写真1 水痘検体塗抹標本

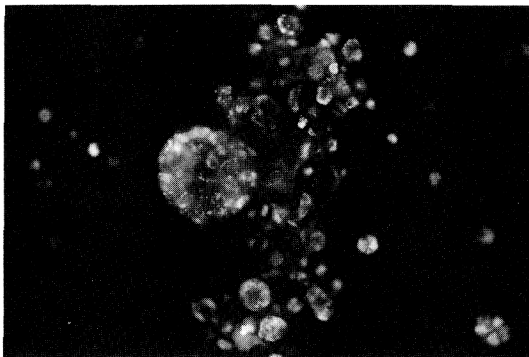


写真2 水痘検体塗抹標本

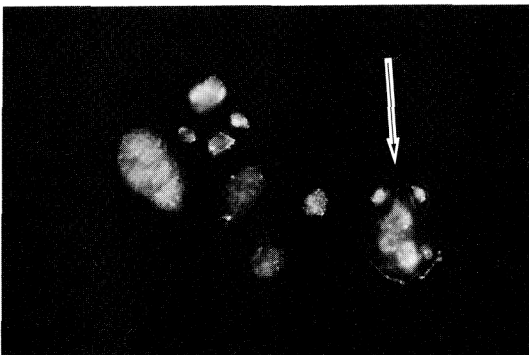


Table 1 Detection of VZV antigens in clinical materials using monoclonal antibody by immunofluorescence

Clinical diagnosis	Number	Immunofluorescence		
		Positive	Negative	Un-determined
Varicella	105	92 (87.6)	8	5
Herpes zoster	190	176 (92.6)	14	0
Herpes simplex	96	5	90	1
Herpes zoster/ Herpes simplex ?	24	9	15	0
Other vesicle	7	0	7	0
Cornea and relating herpes				
Herpes zoster	4	2	2	0
Herpes simplex	5	0	5	0
Total	431	284	141	6

() : Percentage of positive cases

が5例あった。水疱，その他から作製した全症例の塗抹標本について，本キットを用いて抗原を検出した。Table 1には，臨床診断と本キットによる蛍光抗体法の結果を示した。臨床的に水痘と診断されたもの105例中 VZV 抗原陽性92例 (87.6%)，陰性8例，塗抹標本に細胞が存在しないなどの理由による判定不能は5例であった。帯状疱疹と診断されたもの190例中，抗原陽性176例 (92.6%)，陰性14例であった。これら陰性例で，VZV が分離されたもの，あるいは蛍光抗体法で HSV と判定されたものはなかった。単純ヘルペスと臨床診断された96例中，蛍光抗体法で90例は VZV 陰性と判定されたが，5例は VZV 陽性であり，1例は判定不能であった。臨床診断で帯状疱疹と単純ヘルペスの区別がはっきりしなかった24例では，9例が蛍光抗体法で VZV 陽性であり，その内2例でウイルスが分離された。上記の9例はいずれも蛍光抗体で HSV 抗原陰性であった (Table 2)。また，蛍光抗体法で VZV 陰性であった残りの15例についてみると，ウイルス分離で VZV が検出されたものはなく，6例については HSV-1/2が分離され，そのうち4例と分離できなかった1例で HSV 抗原が検出された。Table 1 および 2 から明らかなように，臨床的に確定診断できなかった24例中9例では VZV と判定でき，また，HSV 用のキットを用いることで5例について HSV-1/2 と判定することができた。この点でも，蛍光抗体法は臨床診断を補うことができるといえる。なお角膜ヘルペスなど眼科関連のヘルペス疾患では，臨床で4例が帯状疱疹と診断されそのうち蛍光抗体法で2例が VZV 陽性，2例が陰性であった。単

Table 2 Virological diagnosis by immunofluorescence and virus isolation in clinically undetermined cases

No	Immunofluorescence		Virus Isolation	
	VZV	HSV-1, 2	VZV	HSV-1, 2
1	+	-	+	ND
2	+	-	+	ND
3	+	-	-	ND
4	+	-	-	ND
5	+	-	-	ND
6	+	-	ND	ND
7	+	-	ND	ND
8	+	-	ND	ND
9	+	ND	ND	ND

10	-	HSV-1	-	HSV-1
11	-	HSV-1	-	HSV-1
12	-	HSV-1	ND	HSV-1
13	-	HSV-2	-	HSV-2
14	-	HSV-2	ND	ND
15	-	-	ND	HSV-2
16	-	-	-	ND
17	-	-	-	ND
18	-	-	-	ND
19	-	-	ND	ND
20	-	-	ND	ND
21	-	-	ND	ND
22	-	-	ND	ND
23	-	ND	ND	HSV
24	-	ND	ND	ND

純ヘルペスと診断された5例ではいずれも VZV 陰性であった。

(3) 分離株での HSV の交差反応性

内容を知らされていない (盲検) ウイルス試料を培養細胞 (HEL および Vero 細胞) に感染させ，細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) を観察

Table 3 Comparison between virus isolation and immunofluorescence

Virus Isolation	Immunofluorescence		
	VZV positive	VZV negative	Undetermined
VZV positive	109	109	0
VZV and HSV negative	80	57	22
HSV positive	69	0	69
Total	258	166	91

Table 4 The detailed analysis of the 80 cases which were negative both in VZV and HSV isolation

Clinical diagnosis	Immunofluorescence			
	VZV positive	VZV negative	Undetermined	
Varicella	27	23	4	0
Herpes zoster	33	30	3	0
Herpes simplex	11	1	9	1
Herpes zoster/ Herpes simplex?	6	3	3	0
Others	3	0	3	0
Total	80	57	22	1

した後、塗抹標本を作り、本キットとマイクロトラックを用いて判定し、全例 HSV は HSV (29例)、VZV は VZV (14例) と確認され、HSV との交差反応は認められなかった。

(4) 患者検体でのウイルス分離培養

上記症例中、VZV あるいは HSV-1/HSV-2 のウイルス分離培養を試みた症例は合計258例である (Table 3)。このうち水痘および帯状疱疹と臨床診断されたものの陽性率はそれぞれ59.7%および67.6%であった。

VZV が分離された109例はすべて、蛍光抗体法でも陽性であった。HSV の分離された69例はすべてキットで VZV 抗原陰性であった。一方、ウイルス分離で VZV、HSV とともに陰性の80例のうち (Table 4)、臨床的に水痘と診断された27例中23例、帯状疱疹と診断された33例中30例がキットで VZV 陽性であった。また、単純ヘルペスと診断された11例中1例および帯状疱疹、単純ヘルペスいずれとも診断のつかなかった6例中3例が陽性であった。この様に蛍光抗体法と臨床診断は良く対応する。ウイルス分離培養法と蛍光抗体法の結果は材料採取の方法によっても左右されるが、試料採取病変によってどのように変わるか検討した。蛍光抗体法陽性例に対するウイルス分離率は水疱蓋では高かった (79.7%) が、水疱内容、水疱底、あるいは糜爛面の順に低下した (水疱内容、54.2%；水疱底、37.0%；糜爛面、25.0%)。一方、蛍光抗体法では採取病変にかかわらず高い陽性率が得られた。ウイルス分離法の判定所要時間は、109例中3日以内が23例 (21.1%)、4～7日が67

例 (61.5%)、8日以上が19例 (17.4%) で、平均日数は5.4日であるのに対して、蛍光抗体法はほぼ一時間半で終了することができる。

考 察

VZV は水痘や帯状疱疹の原因となるばかりでなく、重篤疾患下で全身感染を引き起こし、しばしば致命的となることがある。近年、抗ヘルペス剤の進歩⁸⁾⁹⁾がみられているが、適切な治療をできるだけ早く開始するためには、迅速に診断を下す必要性が生じてきた。HSV の分離は早い場合1～2日で可能であるが、VZV では数日以上を要する。VZV 感染症では、皮膚粘膜部に水疱を形成する特徴があり、その病巣材料を用いての診断が可能である。今回は、抗 VZV マウスモノクローナル抗体を用い、臨床材料での診断への有用性と、HSV との交差反応性などを検討した。

今回用いた mAb による染色ではクローン8は感染細胞の細胞質に、クローン17は感染細胞の核に陽性所見が認められた。本キットは、HSV-1および HSV-2と交差反応すること無く、VZV 感染細胞を特異的に染色することが示された。例外的にまぎらわしい試料が極く少数存在したが、核の特異染色に注目すればそれも回避できると思われる。市販の単純ヘルペスウイルス検出用キットを併用すれば、確実な診断が可能であるの言うまでもない。本キットによる染色が鮮明であるという点で一致を見ているが、とりわけクローン17 mAb による核の染色は明瞭であるため、将来この mAb のみを使用したキットを作製することも可能である。

ヘルペス性の疾患で带状疱疹か単純ヘルペスカ臨床診断が困難であった症例が、5.6% (431例中24例) 存在したが、蛍光抗体法により、そのうち9例がVZV、5例がHSV-1/2抗原陽性と判定された (Table 1, 2)。また、臨床上単純ヘルペスとされた96例中、蛍光抗体法でVZV陽性のものが5例みられており、本キットが臨床診断を補助役目を十分果たすと考えられた。従来からVZV感染の確実な診断方法は、ウイルスを分離培養することである。ウイルス分離培養で陽性の109例は蛍光抗体法でもすべて陽性であった。このことは、蛍光抗体法に偽陰性の無いことを示す。ウイルス分離培養でVZV感染を判定するには数日を要する。また、臨床診断で水痘ないし带状疱疹とされ、蛍光抗体法でVZV陽性と判定されたにもかかわらず、ウイルス分離でVZV陰性のものが53例も存在した。このようにHSVに比べ、ウイルス分離培養の困難なVZVでは、蛍光抗体法による迅速診断の必要性がより高いということもできる。また、検体の取り扱いにあたっては、膿疱になる前のできるだけ早い時間の水疱蓋を蛍光抗体法用およびウイルス分離用にもっていくことが診断の効率を高めることに結びつくと思われる。以上の結果からつぎのことが言える。①臨床材料できわめて明瞭にVZV抗原を検出できた、②本キットの判定ではHSVとの交差反応はなかった。③臨床的に確定診断できない症例を、本キットで診断することができた、④VZVのウイルス分離率が水痘で59.7%、带状疱疹で67.6%と低いのに対して、本法では陽性率が水痘で94.0%、带状疱疹で97.1%と高い。これらの点に加えるに、本キットは操作が迅速かつ簡便であるという利点があり、

感染のごく初期に外来での迅速診断が可能であり、治療薬の選択あるいは院内感染予防などに威力を発揮することが期待される。

文 献

- 1) 青山友三, 倉田 毅, 本藤 良, 佐多徹太郎: 水痘・带状疱疹. 病理と臨床, 3: 497—503, 1985.
- 2) 新村真人: 带状疱疹. 最新医学, 44: 51—55, 1989.
- 3) 伊藤正寛: 水痘. 最新医学, 44: 56—62, 1989.
- 4) 川名 尚, 倉田 毅, 佐多徹太郎, 川名林治, 佐藤成大, 玉置邦彦, 久木田淳, 新村真人, 大木 和, 手塚 正, 吉田正己, 森 良一, 安元慎一郎: 蛍光標識モノクローナル抗体 (Microtrak Herpes) による単純ヘルペスウイルス感染症の診断. 感染症学雑誌, 61: 1030—1037, 1987.
- 5) Goldstein, L.C., Corey, L., McDougall, J.K., Tolentino, E. & Nowinski, R.C.: Monoclonal antibodies to herpes simplex viruses: Use in antigenic typing and rapid diagnosis. J. Infect. Dis., 147: 829—837, 1983.
- 6) Nowinski, R.C., Tam, M.R., Goldstein, L.C., Stong, L., Kuo, C.C., Corey, L., Stamm, W.E., Handfield, H.H., Knapp, J.S. & Holmes, K.K.: Monoclonal antibodies for diagnosis of infectious diseases in humans. Science, 219: 637—644, 1983.
- 7) Kitamura, K., Namazue, J., Campo-Vera, H., Ogino, T. & Yamanishi, K.: Induction of neutralizing antibody against varicella-zoster virus (VZV) by VZV gp3 and crossreactivity between VZV gp3 and herpes simplex viruses gB. Virology, 149: 74—82, 1986.
- 8) Schaeffer, H.J., Beauchamp, L. & de Miranda, P.: 9-(2-Hydroxyethoxy methyl) guanine activity against viruses of the herpes group. Nature, 272: 583—585, 1978.
- 9) Biron, K.K. & Elion, G.B.: *In vitro* susceptibility of varicella zoster virus to Acyclovir. Antimicrob. Agents. Chemother., 18: 443—447, 1980.

Diagnosis of Varicella-Zoster Virus (VZV) Infection by using FITC-labeled Monoclonal Antibodies

Michihito NIIMURA & Mariko HONDA

Department of Dermatology, Jikeikai University School of Medicine

Tsuyoshi KURATA & Tetsutaro SATA

Department of Pathology, The National Institute of Health

Hiroshi SAKAOKA

Department of Oral Bacteriology, School Dentistry Hokkaido University

Rinji KAWANA

Department of Bacteriology, Iwate Medical University

Takashi KAWANA

Department of Obstetrics and Gynecology, School Medicine, The University of Tokyo

Akira HIDANO

Department of Dermatology, Tokyo Women Medicine College

Kunihiko TAMAKI

Department of Dermatology, School Medicine, The University of Tokyo

Ryo HONDO

Department of Pathology, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

Ryoichi MURAKI

Department Dermatology, The Salvation Army Booth Memorial Hospital

Yoshizo ASANO

Department Pediatric, Fujita Gakuen Health University

Hitoshi KAMIYA & Masahiro ITŌ

Department of Pediatrics, School Medicine, Mie University

Michiaki TAKAHASHI & Koichi YAMANISHI

Department of Virology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Masami YOSHIDA

Department Dermatology, School Medicine, Kinki University

Yoshikazu SHIMOMURA

Department of Ophthalmology, School Medicine, Osaka University

Shiro NII

Department of Virology, School Medicine, Okayama University

Ryoichi MORI & Yōko MINAGAWA

Department of Virology, School Medicine, Kyushu University

Yoichi MINAMISHIMA

Department of Microbiology, Miyazaki Medical University

Anti-varicella zoster virus (VZV) mouse monoclonal antibodies conjugated with fluorescein isothiocyanate were evaluated for their usefulness as a practical diagnostic tool in the clinical field by examining cells infected with isolated herpes viruses and 431 clinical samples. The kit stained clearly the cells infected with 14 isolated VZV strains without cross reaction to 15 isolated herpes simplex virus type-1 strains (HSV-1) and 14 type-2 (HSV-2) strains.

In clinical specimens, viral antigens of VZV were detected in 92/105 (87.6%) cases of varicella and in 176/190 (92.6%) cases of herpes zoster. Specific fluorescence of VZV was also observed in 5 out of 96 cases diagnosed as HSV infections, although these samples had no specific reaction to HSV when tested by the commercially available diagnostic kit. In 24 cases which could not be clinically diagnosed as herpes zoster or herpes simplex, the VZV antigen was demonstrated in 9 cases. All 109 VZV-positive cases in virus isolation by culture were also judged VZV-antigen positive by the kit, while all 69 HSV-positive cases in virus isolation were VZV-antigen negative. Furthermore, the VZV antigen was detected by the kit in 53/60 clinical diagnoses of varicella or herpes zoster without successful virus isolation.

These results clearly indicate the usefulness of the kit as a practical VZV diagnostic reagent, especially in terms of specific sensitivity and easy technical manipulation.