

学位論文題名

A rapid strip assay for detection of anti-herpes simplex virus antibodies: Application to prediction of varicella-zoster virus reactivation in patients with acute peripheral facial palsy

(単純ヘルペスウイルス抗体検出のための迅速診断 (Rapid strip assay):

末梢性顔面神経麻痺症例における

水痘帯状疱疹ウイルス再活性化の診断への応用について)

学位論文内容の要旨

はじめに

水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化による末梢性顔面神経麻痺のうち、耳性帯状疱疹・第8神経障害 (難聴・めまい) を併発する症例は Ramsay Hunt 症候群と呼ばれている。Ramsay Hunt 症候群では顔面神経麻痺発症の数日後に帯状疱疹が出現することがあり、また VZV は zoster sine herpete (ZSH) と称される帯状疱疹を欠く顔面神経麻痺を起こすこともある。このような症例は初診時には Bell 麻痺と診断される。

一般に VZV 再活性化を伴う顔面神経麻痺症例の完全治癒率は Bell 麻痺症例のそれよりも低い。Ramsay Hunt 症候群では発症後3日以内に acyclovir と prednisone の併用療法を行うことによって良好な治療率が得られることが報告されている。我々は ZSH の早期診断に PCR 法が有効であること、ZSH 症例においても抗ウイルス剤の併用療法が有効であることを報告した。しかしながら、PCR 法では ZSH 症例の 36% において VZV DNA が検出されず、また結果が得られるまでには 24 時間以上を要するため、抗ウイルス剤の併用開始が遅れる欠点がある。

末梢性顔面神経麻痺患者においては血清 HSV 抗体が陰性の場合、88% という高い割合で VZV 再活性化が認められることを以前我々は報告した。これは初診時に Bell 麻痺と臨床診断された症例について VZV 再活性化を疑う場合に、抗 HSV 抗体陰性であることが信頼しうる marker となることを示唆している。今回我々は Western blot 法を改変した簡便で迅速な抗 HSV 抗体の検出法を開発し、更にその手法が VZV 再活性化の迅速診断に応用できるか否か検討した。

対象と方法

対象：末梢性顔面神経麻痺患者 100 症例 (抗 HSV 抗体陰性 26 例、抗 HSV 抗体陽性 74 例) の血清について検討した。対照として HSV 陰性の正常例 24 例についても検討した。

HSV type-specific Western blot

HSV-1 strain 90:395 または HSV-2 strain B4327 を感染させた細胞を培養して抗原を抽出し、通常の Western blot 法を行った。

Rapid strip assay

従来の immunoblot 法の所要時間を短縮するため血清及び2次抗体の反応時間及び濃度・洗浄時間について検討した。HSV1 型・2型の共通抗原である glycoprotein D (gD) を含む範囲で membrane を切断して strip を作成した。strip を希釈した血清あるいは2次抗体とともに温度を一定に保った oven 内で反応させた。結果判定については2名の検者がそれぞれ独立に行い、感度と特異度について評価した。

結 果

1) Type-specific Western blot

HSV 抗体陽性の47症例について HSV の型特異的な Western blot を行った。51症例が HSV-1 抗体のみ陽性、4症例が HSV-2 抗体のみ陽性であり、19症例が HSV-1 抗体および HSV-2 抗体の両方に陽性であった。HSV-1 抗体陽性の血清の大部分は、gD-1 および glycoprotein G-1 (gG-1) に反応した。HSV-2 抗体陽性の血清では gD-1 に反応したが gG-1 には反応しなかった。

2) Rapid strip assay

十分な発色が得られる範囲で最も所要時間が短い条件について検討した結果、以下の条件が最適と判断され、所要時間は約1時間30分であった。

- ・血清反応：1/25 希釈で、37℃30分間の反応時間。
- ・2次抗体反応：1/100 希釈で、37℃30分間の反応時間。
- ・洗浄時間・回数：1分間2回、5分間1回

3) 判定結果

HSV 抗体陰性の血清についてはどちらの検者においても陰性と正しく判定された。HSV-1 抗体陽性の血清については49症例が正確に診断されたが、2例については両方の検者が陰性と判定した。これらの血清では ELISA 法で HSV 抗体価が低値であった。HSV-2 のみ陽性の症例では全症例について陽性と判定できた。HSV-1 と HSV-2 抗体の両方に陽性の血清中、1症例が一方の検者により陰性と診断された。結果的に感度と特異度はともに95%以上となった。

考 察

今回の研究では抗 gD 抗体の検出に要する時間を短縮するため、tube 内で扱いやすいように短い strip を使用することや、反応時間を短縮することなど従来の immunoblot 法の改変を行った。Rapid strip assay は簡易な方法でかつ迅速に血清中抗 HSV 抗体を検出できることが示された。検査に必要なとされる血清量も約 40 μ l と少量である。更に rapid strip assay では感度・特異度が高いことが示された。

従来の ELISA 法に比較すると、我々の方法では1つの sample についても迅速に診断できるため優れていると考えられる。Strip の作成には HSV-1 を感染させた細胞や Western blot の手技が必要であるが、これらの行程は他の HSV 特異的な glycoprotein を精製する方法に比較してそれほど複雑ではない。

今回の研究では2症例について rapid strip assay による gD 抗体の検出が不可能であった。これらの血清は ELISA 法では低抗体価を示し、従来の Western blot 法では gB-1 には明らかに反応するものの、gD-1 にはわずかに反応するのみであった。gB も HSV の型共通抗原であるが、通常の Western blot 法ではいくつかの抗 HSV 抗体陰性症例において gB に近い部分に非特異的反応を認めたため、rapid strip assay には使用しなかった。HSV glycoprotein に対する免疫反応性が個々の血清によって異なるため、我々の gD-1 を用いた rapid strip assay ではいくつかの血清 sample に対しては検出が不可能であることが考えられる。

今回検討した 26 例の HSV 抗体陰性症例のうち、10 例が Ramsay Hunt 症候群で、14 例が ZSH であった。その 24 症例のうち、初診時に Bell 麻痺と診断された症例は 17 例であった。唾液を用いた PCR 法による検索では 17 例のうち 7 例において初診時に VZV DNA が検出されなかった。Rapid strip assay ではこれらの PCR 陰性の患者においても、疱疹が生じる前あるいはペア血清検査で VZV 再活性化が示される前に VZV 再活性化を予測することが可能である。更にこの rapid strip assay に要する時間は PCR 法に比較してはるかに短くてすむ。この診断法は抗 HSV 抗体の保有率が減少傾向にある若年者に対して主に適用されるべきであると考えた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 田 代 邦 雄

学 位 論 文 題 名

A rapid strip assay for detection of anti-herpes simplex virus antibodies: Application to prediction of varicella-zoster virus reactivation in patients with acute peripheral facial palsy

(単純ヘルペスウイルス抗体検出のための迅速診断 (Rapid strip assay):

末梢性顔面神経麻痺症例における

水痘帯状疱疹ウイルス再活性化の診断への応用について)

我々は以前から VZV 再活性化による顔面神経麻痺について、PCR 法を用いた早期診断を行い、早期に acyclovir-prednisone 併用療法を行うことにより良好な治療成績を得ていた。しかし、PCR を用いた早期診断においては、検査陽性率が 50~60%程度であることや、nested PCR 法を用いているため DNA 抽出から診断までに 24 時間以上を要し、contamination による偽陽性の可能性があることなどの問題が指摘されていた。今回の研究は PCR 法による早期診断法の欠点を補う、新しい迅速診断法の確立を目的とした。抗 HSV IgG 抗体陰性の末梢性顔面神経麻痺症例の病因について検討した結果、高率に VZV 再活性化が認められた。このことから、血清中抗 HSV 抗体を調べることにより、それが陰性であった場合には VZV の再活性化が示唆され、marker として応用できると考えられた。そこで Western blot 法を改変した血清中抗 HSV 抗体の有無を迅速に診断する方法の確立について検討し、最終的に最も短時間かつ十分な発色が得られる条件を設定し、所要時間を約 90 分間とした。Type 別の Western blotting の pattern から type1,2 の共通抗原であり、また抗体陰性症例における非特異反応も認められないことから glycoprotein D-1 を assay に使用した。Membrane を細長く切断した strip を用いる方法であるため、この方法を Rapid strip assay と称した。Western blot 法により抗 HSV 抗体の有無を確認した末梢性顔面神経麻痺 100 症例を対象に検討を行い、Rapid strip assay の有効性を確認した。陽性・陰性の判定には主観的な要素が関与する可能性が考えられたため、2 人の検者により個別に血清中抗 HSV-IgG 抗体の有無を判定した。その結果、陰性例では 26 例全例について両者とも正確に陰性と診断することが可能であったが、陽性例では両者とも大部分で正確に判定できたものの、検者の 1 人が陰性と診断した例が 1 例、両者ともに陰性と診断した症例が 2 例認められた。感度は両者とも 95%以上で、特異度は 100%であった。Rapid strip assay の特長としては、短時間で結果が得られる方法であること・感度・特異度ともに高い方法であること・24 歳以下の若年者では VZV 再活性化症例が約 6 割を占め、HSV 抗体の保有率も低いため特に有用であることがあげられる。その反面、問題点としては血清中抗 HSV 抗体価が低い症例では検出不可能な場合があること、40~50 代以上の症例では HSV 抗体の保有率が高いため有用でないことがあげられる。

公開発表では、長嶋和郎教授からは1) 再活性化に伴う抗VZV抗体の早期診断への応用について、2) strip 作成に使用する HSV-1 抗原の精製法について、3) acyclovir の VZV に対する作用機序についての質問があった。また、田代邦雄教授からは Rapid strip assay の有効性を確認するための 100 症例の選択法について、特に年齢分布・重症度についての質問があった。犬山征夫教授からは抗 HSV 抗体陰性例でかつ VZV 再活性化が検出されなかった例の病因について質問があり、更に今後の展望についての発言を求められた。申請者はおおむね妥当な回答をした。

この論文は、抗 HSV 抗体陰性の症例に VZV 再活性化による末梢性顔面神経麻痺が多く認められることから、VZV 再活性化の早期診断のための新しい方法を開発し、実際の顔面神経麻痺 100 症例の検討によってその有用性を確認したことで高く評価された。今回の結果を基にして VZV 再活性化を伴う末梢性顔面神経麻痺の早期診断および治癒率の向上についてさらに進歩することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。