

原 著

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

マルホ株式会社

帆 足 省 吾

小 坂 美 恵 子

野 澤 直 樹

要 旨

本研究では、新規に開発された単純ヘルペスウイルス (HSV) 抗原キットであるデルマティック[®] HSV [マルホ(株), 以下, 本キット] の性能評価を行った。

培養したウイルス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であった。

臨床性能試験では皮膚の水疱, 膿疱, びらん・潰瘍から採取された259検体を用いて, 本キットとリアルタイムPCR法との相関性を確認した。このうち, 性器由来の128検体については, 本キットとプライムチェック[®] HSV (単純ヘルペス) [アルフレッサ ファーマ(株), 以下, 対照キット] との相関性を確認した。その結果, リアルタイムPCR法では259検体中137検体がHSV陽性であり, リアルタイムPCR法に対して本キットの陽性一致率は78.8% (108/137), 陰性一致率は99.2% (121/122), 全体一致率は88.4% (229/259) であった。性器由来の128検体では, 対照キットに対して本キットの陽性一致率は94.4% (51/54), 陰性一致率は91.9% (68/74), 全体一致率は93.0% (119/128) であった。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。また, 採取した皮疹の状態別では, 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。

以上の結果から, 簡便な操作で5~10分でHSV抗原を検出できる本キットの臨床上的有用性が示された。

はじめに

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus, 以下, HSV) は, 水痘・帯状疱疹ウイルス (varicella-zoster virus, 以下, VZV) とともに α ヘルペスウイルス亜科に属するヒトヘルペスウイルスである。HSV感染症は, HSVの感染または潜伏ウイルスの再活性化により, 皮膚や粘膜に水疱, 膿疱やびらん・潰瘍を形成する疾患である¹⁾²⁾。

HSVは, 生物学的および免疫学的差異から, 1型 (HSV-1) と2型 (HSV-2) に分類され, HSV-1の多くは口唇や顔面を中心とした上半身に, HSV-2の多くは性器を中心とした下半身に再発を繰り返す³⁾⁴⁾。HSV感染症は主に病変部位の違いにより, ヘルペス性歯肉口内炎, 口唇ヘルペス, 顔面ヘルペス, 角膜ヘルペス, 性器ヘルペス, 臀部ヘルペス, ヘルペス性瘰癧や, 特殊な病型としてカポジ水痘様発疹症等の病型に分類される¹⁾³⁾。

HSV感染症は典型例では十分な問診と臨床所見のみで診断が可能とされているが, 帯状疱疹や他の皮膚疾患との鑑別が困難な症例も少なからず存在する。HSV感染症は発症早期に抗ウイルス薬を用いることで, 有効に治療することができるため, 迅速かつ感度の高い検査は臨床診断の重要な要素となっている^{5)~9)}。

臨床的に他疾患との鑑別が必要な場合, 保険適用のあるウイルス抗原検出法 (蛍光抗体法など) や抗体検査に加え, 必要に応じてウイルス分離, ウイルスDNA検出法 (PCR法, LAMP法など) も組み合わせて, 診断のための検査を行うことができる⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾。しかし, これらの検査の多くは手技に熟練を要するか特殊な機材を必要とし, 外注で実施する場合には検査結果が判明するまで数日~数週が必要となることもある。さらに, 一部の検査は保険適用がないため, 一般病院や開業医で行うには制約がある。これらのことから, 臨床現場では検査による確定診断を行わない, ある

いは検査を実施しても結果の判定を待たずに, 抗ヘルペスウイルス薬の投与を開始するかどうかを判断する必要があり⁵⁾⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾, 簡便かつ迅速な検査法が望まれていた。

イムノクロマト法による抗原検査は, 簡便かつ迅速性に優れた検査法であり, HSVに対しても短時間でHSV抗原の検出が可能な診断キットが発売されている。感度, 特異度にも優れ, ウイルス分離培養法と比較しても高い検出感度が示されている¹²⁾。しかし, 既承認のキットは保険で適用できる検体に制限 (性器, または角膜由来の検体のみ) があり, HSV感染症のうち患者数の多い口唇, 顔面など, 性器と角膜以外の部位に発症する皮疹の検査に用いることはできなかった。

そこで, 我々はHSV感染症が疑われる全身の皮疹 (水疱, 膿疱, びらん・潰瘍) を適用検体にできるイムノクロマト法を測定原理としたHSV抗原検出キット「デルマクイック[®] HSV」を開発し, 2021年7月に本邦で体外診断用医薬品として製造販売承認を取得した。今回, デルマクイックHSVの性能について臨床検体を用いた検討結果を含めて報告する。

I 材料と方法

1. 使用試薬: HSV抗原検出キット

1) デルマクイックHSV [マルホ(株)] (以下, 本キット)

本キットは, 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り, 皮疹 (水疱, 膿疱) の内容物またはびらん・潰瘍のぬぐい液中のHSV抗原を検出し, HSV感染の診断を補助する。

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) が固相化してあり, 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 (図1)。キット付属の滅菌綿棒で採取した検体を専用

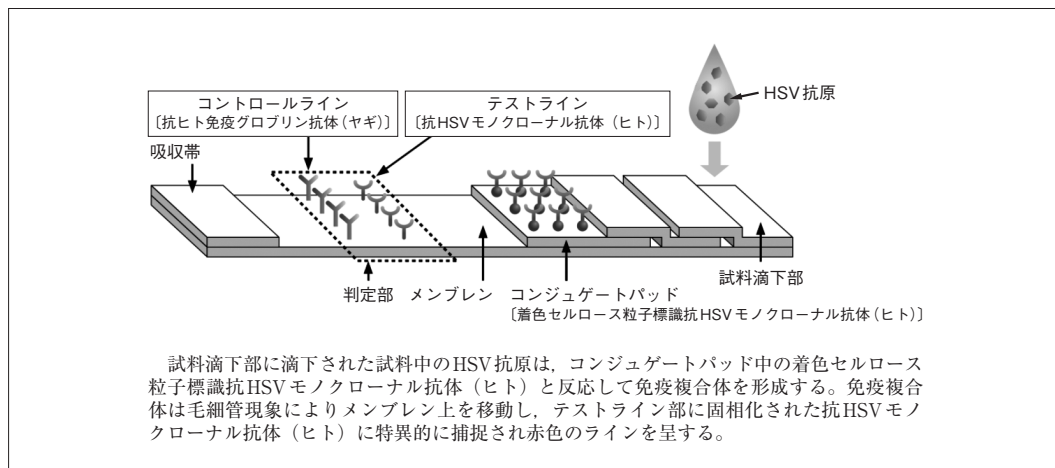


図1 テストカートリッジ内模式図

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。

2) プライムチェック[®] HSV (単純ヘルペス) [アルフレッサファーマ(株)] (以下、対照キット)

本キットと同様に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り、水疱、潰瘍またはびらん中のHSV抗原を検出し、生殖器ヘルペスウイルス感染症の診断を補助する。

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4滴をテストカートリッジの試料滴下部に滴下し、10~15分後に判定部に出現する赤~赤紫色のラインの有無により判定を行う。

2. 最小検出感度試験

培養したHSV-1 (F strain) およびHSV-2 (MS strain) を本キットの検体抽出液で希

釈し、HSV-1 (F strain) は $4.2 \times 10^2 \sim 4.2 \times 10^3$ pfu/mL、HSV-2 (MS strain) は $4.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ pfu/mLの試料を調製した。調製した試料を用いて本キットの操作方法に従い、3回試験を行い、滴下後5~10分の間のテストラインの有無を判定した。

3. 臨床性能試験

1) 対象

2017年4月~2020年11月の間に、試験実施医療機関15施設に来院し、臨床所見にて水疱、膿疱、びらん・潰瘍などの皮疹が出現し、HSV感染症、またはその他の疾患が疑われた患者のうち、研究内容について予め説明した上で、文書による同意が得られた患者を対象とした。本試験は倫理審査委員会(医療法人社団廣仁会札幌皮膚科クリニック倫理委員会、特定非営利活動法人全国臨床研究協議会倫理審査委員会)の承認を得て実施した。

2) 検体採取およびHSV抗原検出キットによる測定

検体は、各医療機関において本キット指定の滅菌綿棒を用いて皮疹(水疱、膿疱)の内容物またはびらん・潰瘍のぬぐい液を採取した。疾患部位が生殖器の場合、対照キットとの比較のために2種類のキット指定の滅菌綿棒

表1 最小検出感度試験結果 (HSV-1)

ウイルス力価	1回目	2回目	3回目
4.2×10^3 pfu/mL	陽性	陽性	陽性
1.7×10^3 pfu/mL	陽性	陽性	陽性
8.4×10^2 pfu/mL	陰性	陰性	陽性
4.2×10^2 pfu/mL	陰性	陰性	陰性

本キットの最小検出感度は 1.7×10^3 pfu/mLであった。

表2 最小検出感度試験結果 (HSV-2)

ウイルス力価	1回目	2回目	3回目
1.0×10^4 pfu/mL	陽性	陽性	陽性
6.7×10^3 pfu/mL	陽性	陽性	陽性
4.0×10^3 pfu/mL	陰性	陰性	陰性

本キットの最小検出感度は 6.7×10^3 pfu/mLであった。

2本を用いて、採取量が同等になるように同時に同一患部より検体を採取した。

採取した検体は操作方法に従い、各キットによる測定に供した。

3) リアルタイムPCR法による測定

本キットの検体抽出液の残液からQIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN) を用いて操作方法に従いウイルスDNAを精製し、リアルタイムPCR法による測定に供した。

リアルタイムPCR法はHSVのgB envelope geneを標的としたAumakhan¹³⁾の方法に従い実施した。

PCR反応はTaqManTM Gene Expression Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を使用して、StepOnePlusTM システム (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

4) 相関性の検討

本キットの結果をリアルタイムPCR法の結果と比較し、陽性一致率、陰性一致率、全体一致率を算出した。このうち、性器由来検体については、本キットと対照キットの結果を比較し、陽性一致率、陰性一致率、全体一致率を算出した。その他、本キットの結果を臨床所見、ウイルスDNA濃度、皮疹出現から検体採取までの日数、皮疹の状態について検討した。

II 結果

1. 最小検出感度試験

培養したHSV-1、およびHSV-2を用いて本キットの最小検出感度試験を実施した(表1, 2)。3回繰り返し測定の結果、3回とも陽性と判定した最も低い濃度を最小検出感度とした。その結果、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。

2. 臨床性能試験

1) リアルタイムPCR法との相関性試験

医療機関を受診し、皮疹(水疱、膿疱)またはびらん・潰瘍を形成した患者から259検体を採取し、本キットとリアルタイムPCR法との相関性を確認した。259検体の内訳は、男女比が男性35.1%、女性64.9%、平均年齢が38.5歳(0~86歳)であり、性器以外の皮膚由来(以下、皮膚由来)が131検体、性器由来が128検体であった。リアルタイムPCR法によるHSV型別判定の結果、HSV-1陽性が68検体、HSV-2陽性が69検体であった(表3)。

リアルタイムPCR法陽性137検体のうち、本キット陽性は108検体で陽性一致率は78.8%、リアルタイムPCR法陰性122検体のうち、本キット陰性は121検体で陰性一致率は99.2%、全体一致率は88.4%であった〔表4-(1)〕。

皮膚由来の131検体では、リアルタイムPCR法陽性61検体のうち、本キット陽性は51検体で陽性一致率は83.6%、リアルタイムPCR法陰性70検体のうち、本キット陰性は69例で

表3 組み入れ症例数とリアルタイムPCR法による結果

		症例数	リアルタイムPCR法	
			HSV-1陽性	HSV-2陽性
皮膚由来	口唇	51	37	0
	頭部*	25	13	0
	体幹	16	0	1
	上肢	14	3	1
	下肢	16	0	1
	臀部, 肛門	9	2	3
	計	131	55	6
性器由来		128	13	63
合計		259	68	69

※：口唇の検体を除く

皮疹（水疱，膿疱）またはびらん・潰瘍から採取した259検体の採取部位，およびリアルタイムPCR法によって判定したHSV型別の内訳を示す。

陰性一致率は98.6%，全体一致率は91.6%であった〔表4-(2)〕。

性器由来の128検体では，リアルタイムPCR法陽性76検体のうち，本キット陽性は57検体で陽性一致率は75.0%，リアルタイムPCR法陰性52検体のうち，本キット陰性は52検体で陰性一致率は100.0%，全体一致率は85.2%であった〔表4-(3)〕。

2) 対照キットとの相関性試験

性器由来の128検体に対して本キットと対照キットとの相関性を確認した。対照キット陽性54検体のうち，本キット陽性は51検体で陽性一致率は94.4%，対照キット陰性74検体のうち，本キット陰性は68検体で陰性一致率は91.9%，全体一致率は93.0%であった（表5）。

3) 臨床所見との比較

臨床所見とリアルタイムPCR法，および本キットとの結果を比較した。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〔表6-(1)〕。

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%，全体一致率は73.4%であった〔表6-(2)〕。

4) ウイルスDNA濃度分布と本キット陽性一致率の関連性

リアルタイムPCR法で陽性であった137検体での検体抽出液中のウイルスDNA濃度分布，濃度別のリアルタイムPCR法陽性検体数，本キット陽性検体数と陽性一致率について確認した（表7）。

ウイルスDNA濃度の範囲は皮膚由来は $2.6 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^9$ コピー数/mL，性器由来は $1.7 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^9$ コピー数/mLであった。いずれの採取部位も $1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ コピー数/mL未満の範囲が最も検体数が多く， 1.0×10^6 コ

表4-1) 本キットとリアルタイムPCR法との比較 (全検体)

		リアルタイムPCR法		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	108	1 ^{*1}	109
	陰性	29 ^{*2}	121	150
	計	137	122	259

陽性一致率：78.8% (108/137), 陰性一致率：99.2% (121/122),
全体一致率：88.4% (229/259)

※1：本キットで陽性, リアルタイムPCR法で陰性の1検体は臨床所見
で帯状疱疹と診断された患者

※2：本キットで陰性, リアルタイムPCR法で陽性の29検体のうち,
25検体は臨床所見でHSV感染症と診断された患者, 4検体は臨
床所見でその他の疾患と診断された患者

表4-2) 本キットとリアルタイムPCR法との比較 (皮膚由来検体)

		リアルタイムPCR法		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	51	1	52
	陰性	10 ^{*1}	69	79
	計	61	70	131

陽性一致率：83.6% (51/61), 陰性一致率：98.6% (69/70),
全体一致率：91.6% (120/131)

※1：本キットで陰性, リアルタイムPCR法で陽性の10検体のうち, 7
検体はHSV-1陽性, 3検体はHSV-2陽性

表4-3) 本キットとリアルタイムPCR法との比較 (性器由来検体)

		リアルタイムPCR法		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	57	0	57
	陰性	19 ^{*1}	52	71
	計	76	52	128

陽性一致率：75.0% (57/76), 陰性一致率：100.0% (52/52),
全体一致率：85.2% (109/128)

※1：本キットで陰性, リアルタイムPCR法で陽性の19検体のうち, 3
検体はHSV-1陽性, 16検体はHSV-2陽性

表5 本キットと対照キットとの比較（性器由来検体）

		対照キット		
		陽性	陰性	計
本キット	陽性	51	6 ^{*1}	57
	陰性	3 ^{*2}	68	71
	計	54	74	128

陽性一致率：94.4% (51/54), 陰性一致率：91.9% (68/74),
 全体一致率：93.0% (119/128)

- ※1：本キットで陽性，対照キットで陰性の6検体はリアルタイムPCR法で陽性，うち5検体は臨床所見でHSV感染症と診断された患者
 ※2：本キットで陰性，対照キットで陽性の3検体はリアルタイムPCR法で陽性，臨床所見でHSV感染症と診断された患者

表6-(1) 臨床所見とリアルタイムPCR法との比較

		臨床所見		
		HSV感染症	その他の疾患	計
リアルタイムPCR法	陽性	131	6	137
	陰性	41	81	122
	計	172	87	259

陽性一致率：76.2% (131/172), 陰性一致率：93.1% (81/87),
 全体一致率：81.9% (212/259)

表6-(2) 臨床所見と本キットとの比較

		臨床所見		
		HSV感染症	その他の疾患	計
本キット	陽性	106	3 ^{*1}	109
	陰性	66 ^{*2}	84	150
	計	172	87	259

陽性一致率：61.6% (106/172), 陰性一致率：96.6% (84/87),
 全体一致率：73.4% (190/259)

- ※1：本キットで陽性，臨床所見でその他の疾患と診断された患者の3検体のうち，2検体はリアルタイムPCR法で陽性，1検体はリアルタイムPCR法で陰性
 ※2：本キットで陰性，臨床所見でHSV感染症と診断された66検体のうち，25検体はリアルタイムPCR法で陽性，41検体はリアルタイムPCR法で陰性

表7 ウイルスDNA濃度別の陽性数と陽性一致率

採取部位	コピー数/mL	リアルタイムPCR法陽性	本キット陽性	陽性一致率 (%)
皮膚由来 ($2.6 \times 10^3 \sim 1.2 \times 10^9$ コピー数/mL)	$1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{10}$ 未満	2	2	100.0
	$1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$ 未満	16	15	93.8
	$1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 未満	23	22	95.7
	$1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 未満	9	8	88.9
	$1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 未満	6	3	50.0
	$1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 未満	4	1	25.0
	$1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 未満	1	0	0.0
	計	61	51	83.6
性器由来 ($1.7 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^9$ コピー数/mL)	$1.0 \times 10^9 \sim 1.0 \times 10^{10}$ 未満	3	3	100.0
	$1.0 \times 10^8 \sim 1.0 \times 10^9$ 未満	9	9	100.0
	$1.0 \times 10^7 \sim 1.0 \times 10^8$ 未満	23	22	95.7
	$1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ 未満	22	19	86.4
	$1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 未満	6	3	50.0
	$1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 未満	10	1	10.0
	$1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4$ 未満	3	0	0.0
	計	76	57	75.0

リアルタイムPCR法によって判定したウイルスDNA濃度別にリアルタイムPCR法陽性となった検体数、本キット陽性となった検体数、およびリアルタイムPCR法陽性のうち、本キット陽性となった検体の割合（陽性一致率）を皮膚由来、および性器由来のそれぞれで示す。

ピー数/mL以上の検体数が皮膚由来は全体の82.0% (50/61)、性器由来は全体の75.0% (57/76) を占めた。

ウイルスDNA濃度が高いほど、本キットの陽性一致率が高い傾向が見られ、 1.0×10^6 コピー数/mL以上に限定した場合、皮膚由来の陽性一致率は94.0% (47/50)、性器由来の陽性一致率は93.0% (53/57) と非常に高い一致率を有した。 1.0×10^7 コピー数/mL以上で本キット陰性となった3検体はいずれもHSV-2であった。

5) 皮疹出現後日数と本キット陽性一致率の関連性

リアルタイムPCR法で陽性であった137検体のうち、皮疹出現から検体採取までの日数

が記録された135検体について、皮疹出現後日数別にリアルタイムPCR法陽性検体数、本キット陽性検体数と陽性一致率について確認した(表8)。

皮疹出現後日数は1日目から最大で15日目であった。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%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。

6) 皮疹の状態と本キット陽性一致率の関連性

リアルタイムPCR法で陽性であった137検体について、水疱、膿疱、びらん・潰瘍といっ

表8 皮疹出現後日数別の陽性数と陽性一致率

皮疹出現後日数	リアルタイムPCR法陽性	本キット陽性	陽性一致率 (%)
1日目	13	12	92.3
2日目	31	27	87.1
3日目	34	28	82.4
4日目	25	19	76.0
5～6日目	22	14	63.6
7～15日目	10	6	60.0
計	135 ^{*1}	106	78.5

※1：不明2検体を除く

皮疹出現後日数別でリアルタイムPCR法陽性となった検体数、本キット陽性となった検体数、およびリアルタイムPCR法陽性のうち、本キット陽性となった検体の割合（陽性一致率）を示す。

表9 皮疹の状態別の陽性数と陽性一致率、および検体抽出液中ウイルスDNA濃度

採取部位	皮疹の状態	リアルタイムPCR法陽性	本キット陽性	陽性一致率 (%)
皮膚由来 (n=61)	水疱	35	32	91.4
	膿疱	5	4	80.0
	びらん・潰瘍	18	12	66.7
	その他 ^{*1}	3	3	100.0
性器由来 (n=76)	水疱	14	12	85.7
	膿疱	5	4	80.0
	びらん・潰瘍	56	40	71.4
	その他 ^{*1}	1	1	100.0

※1：複数選択など、いずれかに特定できないもの

皮疹の状態別でリアルタイムPCR法陽性となった検体数、本キット陽性となった検体数、およびリアルタイムPCR法陽性のうち、本キット陽性となった検体の割合（陽性一致率）を皮膚由来、および性器由来のそれぞれで示す。

た皮疹の状態別にリアルタイムPCR法陽性検体数、本キット陽性検体数と陽性一致率について確認した（表9）。皮疹の状態が複数選択され、いずれかに特定できない検体はその他に分類した。

検体数は皮膚由来では水疱が最も多く57.4% (35/61)、性器由来ではびらん・潰瘍が最も多

く73.7% (56/76)であった。

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% (32/35)、80.0% (4/5)、66.7% (12/18)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% (12/14)、80.0% (4/5)、71.4% (40/56)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。

Ⅲ 考 察

今回、イムノクロマト法を用いたHSV抗原検出キットであるデルマクイックHSV（本キット）の最小検出感度および臨床性能を検討した。

培養ウイルスを用いた最小検出感度の検討では、HSV-1が 1.7×10^3 pfu/mL、HSV-2が 6.7×10^3 pfu/mLであった。わずかな差はあるものの両方の型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することが確認できた（表1、2）。

臨床性能の検討では、259検体を対象に本キットとリアルタイムPCR法との相関性を確認し、このうち、性器由来の検体については本キットと対照キットとの相関性を確認した。また、得られた結果について、臨床所見、ウイルスDNA濃度、皮疹出現後日数、皮疹の状態との関連性を確認した。

臨床検体は皮膚由来と性器由来がほぼ同数となるように集積した（表3）。皮膚由来はリアルタイムPCR法で陽性であった61検体のうち、90.2%（55検体）がHSV-1であり、口唇を含む頭部は全てHSV-1であった。なお、臀部、肛門からの検体は対照キットとの比較を実施していないため、本検討では皮膚由来に分類し集計した。性器由来はリアルタイムPCR法で陽性であった76検体のうち、82.9%（63検体）がHSV-2であった。本検討では、初発、または再発の症例情報を取得していないが、口唇や顔面での多くはHSV-1が再発し、性器でHSV-2が多く再発するという報告⁴⁾と齟齬がない結果であった。

全検体での相関性はリアルタイムPCR法を対照に評価した。その結果、本キットとの全体一致率は88.4%と良好な相関性を有して

いることが確認できた〔表4-(1)〕。不一致例について、本キットで陽性、リアルタイムPCR法で陰性となった1検体は、臨床所見で帯状疱疹と診断されており、本キットの偽陽性と考えられる。また、本キットで陰性、リアルタイムPCR法で陽性となった29検体のうち、25検体は臨床所見でHSV感染症と診断され、4検体は臨床所見でその他の疾患と診断された。リアルタイムPCR法でウイルスDNAが検出されたことから、採取された検体中のHSV抗原量が本キットの検出限界以下であったことによる本キットの偽陰性の可能性が高いと考えられる。

採取部位別では、皮膚由来の陽性一致率が83.6%であるのに対して、性器由来の陽性一致率が75.0%であり、性器由来の陽性一致率が低かった〔表4-(2)(3)〕。採取部位別のウイルスDNA濃度の分布（図2）から、性器由来は皮膚由来に比べて、比較的DNA濃度が低い検体、特に $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ コピー数/mL未満、および $1.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ コピー数/mL未満の検体の割合が高かったため、性器由来の陽性一致率が低かったと考えられる。なお、ウイルスDNA濃度と陽性一致率の検討でウイルスDNA濃度が高いほど陽性一致率が高くなる傾向が確認されていることから、ウイルスDNA濃度は本キットが検出するHSV抗原量のある程度パラレルに反映していると考えられる。ただし、DNA濃度が高くても本キット陰性になる検体や、 1.0×10^6 コピー数/mL未満の低濃度でも本キット陽性となる検体もあり、必ずしもウイルスDNA濃度と本キットが検出するHSV抗原量が比例しない検体も存在する可能性があると考えられる。

HSVと同じ α ヘルペスウイルス亜科に属するVZVの検出を目的とするVZV抗原キットデルマクイック[®] VZV〔マルホ(株)〕の臨床成績¹⁴⁾では、リアルタイムPCR法との相関性試験で陽性一致率が93.2%（69/74）であり、検出しているウイルスは異なるものの本キット

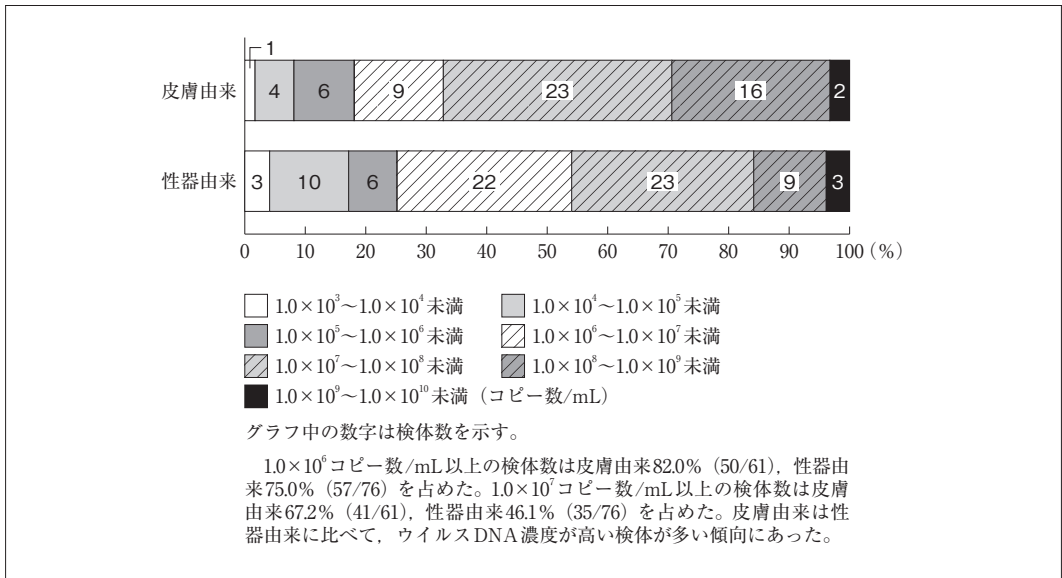


図2 検体採取部位別のウイルスDNA濃度分布

の陽性一致率78.8% (108/137) より高かった。デルマクイックVZVの試験¹⁴⁾では、リアルタイムPCR法陽性のうち、 1.0×10^7 コピー数/mL未満の5検体がデルマクイックVZV陰性であり、 1.0×10^6 コピー数/mL未満の検体は74検体中3検体 (4.1%) のみであったと報告されている。今回、 1.0×10^6 コピー数/mL未満の検体が皮膚由来で11検体 (18.0%), 性器由来で19検体 (25.0%) 存在しており (表7), ウイルスDNA濃度分布の違いが、本キットの皮膚由来検体と性器由来検体の陽性一致率の違い、および本キットとデルマクイックVZVとの陽性一致率の違いにつながったと考えられる。

臨床性能試験の性器由来検体での本キットと対照キットの全体一致率は93.0%と高い相関性を有していることが確認できた (表5)。このうち、本キット陽性で対照キット陰性は6検体、一方、本キット陰性で対照キット陽性は3検体であり、9検体のうち8検体は臨床所見でHSV感染症と診断された。不一致例の9検体はいずれもリアルタイムPCR法で

陽性であったことから、採取した検体中のHSV抗原量が本キットまたは対照キットの検出限界以下であったことによるそれぞれのキットの偽陰性と考えられる。対照キットの最小検出感度はHSV-1が 1.56×10^5 pfu/mL, HSV-2が 1.95×10^4 pfu/mLと報告¹⁵⁾されており、それぞれのキットの最小検出感度の違いにより結果の不一致が生じたと推定されるが、2本の滅菌綿棒を用いて検体を採取したことにより、滅菌綿棒間で採取されたウイルス量に差が生じて、結果に影響した可能性も否定できないと考えられる。

臨床所見との比較では、リアルタイムPCR法の全体一致率が81.9%, 本キットの全体一致率が73.4%であった [表6-(1)(2)]。臨床所見でHSV感染症と診断されているにもかかわらず、本キット、およびリアルタイムPCR法のいずれでも陰性となった検体は23.8% (41/172) 存在しており、HSV感染症と診断された症例の中に、その他の疾患が20%程度存在することが示唆される結果であった。

皮疹出現から検体採取までの日数と本キッ

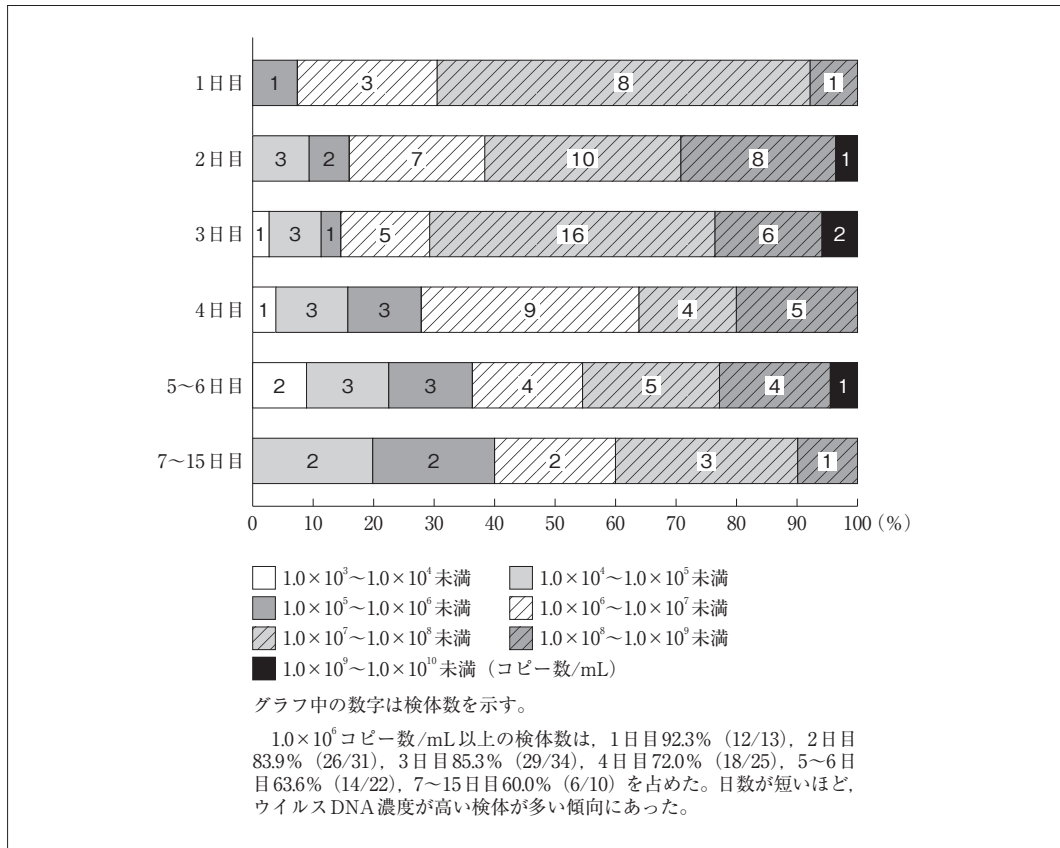


図3 皮疹出現後日数別のウイルスDNA濃度分布

トの陽性数の比較では、日数が短いほど本キットの陽性一致率が高かった(表8)。ウイルスDNA濃度の分布を皮疹出現後日数別に比較すると、1.0×10⁶コピー数/mL以上の検体数は、1日目92.3% (12/13)、2日目83.9% (26/31)、3日目85.3% (29/34)、4日目72.0% (18/25)、5~6日目63.6% (14/22)、7~15日目60.0% (6/10)を占め、日数が短いほど、ウイルスDNA濃度が高い検体が多い傾向にあった(図3)。

また、採取した皮疹の状態別では、採取部位にかかわらず、陽性一致率は水疱が最も高く、続いて膿疱、びらん・潰瘍の順に高かった(表9)。ウイルスDNA濃度の分布を皮疹の状態別に比較すると、1.0×10⁶コピー数/mL

以上の検体数は、水疱87.8% (43/49)、膿疱90.0% (9/10)、びらん・潰瘍68.9% (51/74)を占めた。さらに、1.0×10⁷コピー数/mL以上の検体数は水疱は73.5% (36/49)、膿疱は50.0% (5/10)、びらん・潰瘍は41.9% (31/74)を占め、水疱、膿疱、びらん・潰瘍の順にウイルスDNA濃度が高い検体が多い傾向にあった(図4)。HSV感染症は水疱を形成後、経過とともに次第に膿疱化し、びらん、痂皮へと変遷する経過を辿り、発症早期ほどウイルスの増殖が盛んであると報告²⁾されていることから、皮疹の進行状態とウイルスDNA濃度が本キットの結果に影響を及ぼしたことが考えられる。本キットの実施は、皮疹出現後からの日数が短いこと、もしくは水疱から検体を

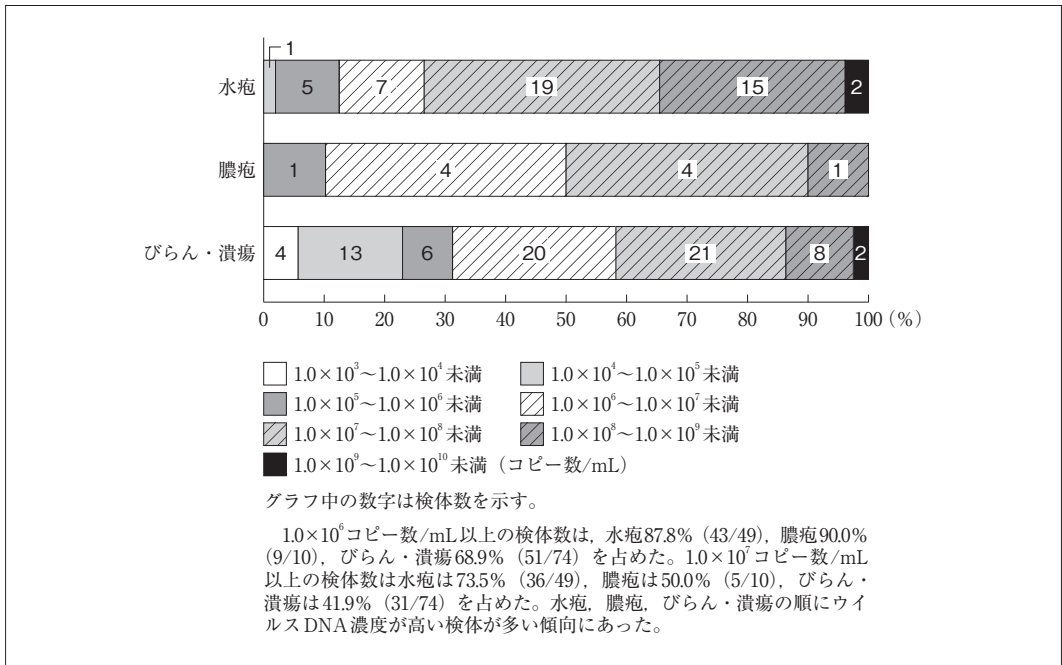


図4 皮疹の状態別のウイルスDNA濃度分布

採取することが望ましいと考えられる。

本研究の限界は、臨床所見をHSV感染症かその他の疾患のみに区別した点である。HSV感染症のうち、臨床的に他疾患との鑑別が必要とされる非典型例で本キットは特に有用性を発揮すると考えられるが、検体を採取した症例の詳細や非典型例の割合など本研究で明確になっていない点は留意する必要がある。

以上の結果から、全身の皮疹（水疱、膿疱、びらん・潰瘍）を対象としてリアルタイムPCR法と良好な相関性を有していること、また、対照キットとも高い相関性を有していることが確認でき、本キットの臨床上の有用性が示された。皮疹出現後からの日数や皮疹の状態によって本キットの陽性一致率に影響を及ぼすことが示唆されるものの、本キットは簡便な操作で5~10分でHSV抗原を検出できることから、HSV感染症の正確な早期診断の補助となる。特に臨床的に他疾患との鑑別が必要な場合において本キットを使用することにより、

適切な治療につながることを期待される。

<謝辞>

本研究を行うにあたり、検体採取にご協力いただいた岩佐クリニック、おのだ皮膚科、かわしま皮膚科、ササセ皮フ科、さたクリニック、湘南皮膚科、たち皮フ科クリニック、谷皮フ科、茶屋町レディースクリニック、なかむら皮フ科、西大沼皮フ科クリニック、にしむら皮フ科形成外科、はしろクリニック、早川クリニック、南森町レディースクリニックの医師およびスタッフの方々に感謝いたします。

利益相反

本研究に関する費用はマルホ株式会社が負担した。また、帆足省吾、小坂美恵子および野澤直樹はマルホ株式会社の社員である。

参考文献

- 1) 本田まりこ. αヘルペスウイルス-単純ヘルペスウイルス (HSV) と水痘・帯状疱疹ウイルス

- (VZV)- α ヘルペスウイルス感染症の治療と予防 α ヘルペスウイルス感染症(皮膚科領域)に対する治療. 日本臨牀 2006 ; **64**(増刊号3) : 306-310.
- 2) Spruance SL, Overall JC, Kern ER, et al. The natural history of recurrent herpes simplex labialis : implications for antiviral therapy. *N Engl J Med.* 1977 ; **297** : 69-75.
- 3) 本田まりこ. ヘルペスウイルス感染症 各科領域でのヘルペスウイルス感染症 皮膚科領域. 日本臨牀 2006 ; **64**(増刊号3) : 95-98.
- 4) Wald A, Ericsson M, Krantz E, et al. Oral shedding of herpes simplex virus type 2. *Sex Transm Infect.* 2004 ; **80** : 272-276.
- 5) 宮地素子, 今福信一. ヘルペス感染症に対する最近の検査と考え方. 臨床皮膚科 2017 ; **71**(5) : 71-74.
- 6) 太和田知里, 清島真理子. 特集/感染症診断の進め方 ヘルペスウイルス感染症診断の進め方. *MB Derma.* 2014 ; **215** : 52-58.
- 7) 木村 宏, 森島恒雄. ヘルペスウイルス感染症診断・治療・予防 ヘルペスウイルス感染症の診断. 日本臨牀 2006 ; **64**(増刊号3) : 55-58.
- 8) 渡辺大輔. 特集/皮膚科内服剤の使用法と留意点 抗ウイルス薬. *MB Derma.* 2016 ; **246** : 21-29.
- 9) 古賀文二, 今福信一. 特集/皮膚科治療薬処方ガイド—年齢・病態に応じた薬の使い方—アシクロビル, パラシクロビル, ファムシクロビル. *MB Derma.* 2017 ; **255** : 39-43.
- 10) 佐藤孝至, 田中弘一. 特集・口腔内ウイルス感染の診断と治療 ヘルペス. *MB ENT.* 2011 ; **129** : 29-39.
- 11) 安元慎一郎. オフィスでの迅速診断法と解釈, 生活指導. 日本医師会雑誌 2020 ; **149** : 1207-1210.
- 12) 早川 潤, 早川謙一, 南 八重子, 白木公康. イムノクロマト法を測定原理とする単純ヘルペスウイルス抗原検出キットの臨床的性能評価. 日性感染症会誌 2010 ; **21** : 134-138.
- 13) Aumakhan B, Hardick A, Quinn TC, et al. Genital herpes evaluation by quantitative TaqMan PCR : correlating single detection and quantity of HSV-2 DNA in cervicovaginal lavage fluids with cross-sectional and longitudinal clinical data. *Virology Journal.* 2010 ; **7** : 328.
- 14) 渡辺大輔, 浅田秀夫, 山本千尋ほか. 水痘・帯状疱疹ウイルス抗原検出キットの基礎的, 臨床的性能評価. 新薬と臨牀 2018 ; **67** : 23-34.
- 15) 堀場千尋, 大黒 徹, 白木公康ほか. イムノクロマト法を測定原理とする単純ヘルペスウイルス抗原検出キットの基礎的性能評価. 日性感染症会誌 2010 ; **21** : 128-133.

Performance Assessment of The Herpes Simplex Virus Antigen Kit Using Immunochromatography

Shogo Hoashi, Mieko Kosaka and Naoki Nozawa

Maruho Co., Ltd.

Corresponding author : Shogo Hoashi
Diagnostics Department, Maruho Co., Ltd.
1-11-1, Nakatsu, Kita-ku, Osaka 531-0071, Japan

Abstract

This study was conducted to assess the diagnostic performance of a newly developed herpes simplex virus (HSV) antigen kit, DermaQuick[®] HSV (Maruho Co., Ltd. ; hereinafter, “this kit”).

The minimum detection limit of this kit as determined using cultured viruses was 1.7×10^3 pfu/mL for HSV-1 and 6.7×10^3 pfu/mL for HSV-2.

In a clinical performance test, 259 clinical samples collected from skin blisters, pustules, erosions/ulcers were used to confirm the correlation between this kit and the real-time PCR method. Of these, 128 clinical samples collected from genitalia were used to confirm the correlation between this kit and Primecheck[®] HSV (herpes simplex) (Alfresa Pharma Corporation ; hereinafter, “control kit”). As a result, 137 out of 259 samples were HSV positive by the real-time PCR method. Compared with the real-time PCR results, this kit had positive percent agreement of 78.8% (108/137), negative percent agreement of 99.2% (121/122) and overall percent agreement of 88.4% (229/259). In 128 specimens from genitalia, compared with the control kit, this kit had positive percent agreement of 94.4% (51/54), negative percent agreement of 91.9% (68/74), and the overall percent agreement of 93.0% (119/128). There was a tendency that the shorter the number of days from the onset of skin eruption to the specimen collection, the higher the positive percent agreement of this kit. In addition, according to the conditions of the collected eruptions, the positive percent agreement of this kit tended to be higher in the order of blisters, pustules, and erosions/ulcers.

These results indicate the clinical usefulness of this kit, which can detect HSV antigens in 5 to 10 minutes with a simple procedure.

(受理日：2022年12月5日)