

## 24. 水痘の実験室診断法の確立と臨床応用

倉田 貴子 (大阪府立公衆衛生研究所)

### 【研究目的】

水痘は感染力が強く、しばしば小児での集団感染が問題となる。水痘ワクチンの小児に対する定期接種が平成 26 年から導入されており、今後は患者数の減少が見込まれる。それに伴い、Vaccine Preventable Diseases (VPD) である水痘の正確な診断とそれに基づく疫学情報の重要性が増す事が予想されるため、水痘の実験室診断体制の整備と臨床への応用を目的として、検査法の基礎的検討を行う。

### 【研究の必要性】

水痘は感染症法上の 5 類感染症に分類されている小児科定点把握疾患である。感染力が非常に強く、しばしば小児での集団感染が問題となる。水痘患者の 95% は小児であるが、近年成人の割合が増加傾向にあるとの報告もある。成人で初感染した場合には重篤化しやすく、合併症の頻度も高くなる。特に妊婦で水痘の初感染を起こした場合は、妊娠早期なら流産の危険性があり、中期以降は先天性水痘症候群(CVS)の危険性が生じる。また、妊娠後期の水痘肺炎は重症化することが知られている。平成 26 年度の厚生労働省の血清疫学調査では、日本国内の 10 代後半から 20 代前半のおよそ 10% が水痘に対する抗体を持たないことが明らかになっており、子供だけの病気ではなくなっている。

水痘の予防にはワクチン接種が有効であり、生ワクチンの 2 回接種で発症を予防できるとされている。平成 26 年 10 月からは小児における定期接種が導入されており、今後は患者数の減少が見込まれる。患者数の減少およびワクチン接種率の上昇に伴って、麻疹や風疹などと同様にワクチンで予防できる病気として、日本国内の水痘症例の正確な診断と疫学情報収集が重要となってくると考えられる。入院を要する重症の水痘症例については、既に平成 26 年年 9 月から全数把握が開始されている。

しかし、現在地方衛生研究所における水痘の実験室診断法は、一般的に普及しておらず、水痘の実験室診断法の基礎的検討を行う必要があると考えられる。実験室診断法については、既に国立感染症研究所により検査マニュアルが公開されているが、検出感度が高いと予想される核酸検査の項目には複数の方法が併記されており、それぞれの方法の検出感度についての記載もない。本研究では既報の方法をもとに検査法の比較を行い、高い特異性で検査できる方法を選定するとともに、検出感度の決定を行う。また高感度で検出できる系において、実際の臨床検体からの水痘ウイルスゲノムの検出を検討する。

### 【実施内容と結果】

#### 1) 使用ウイルスおよび臨床検体と核酸の抽出

ウイルスは乾燥毒生水痘ワクチン「ビケン」を添付書類に従って調製し、培養細胞 (MRC-5) で増殖

させたものを使用した。臨床検体は、感染症流行予測調査事業に基づいて検査依頼があった水痘が疑われる患者の咽頭拭い液を用いた。核酸の抽出はPSS社のMagtration® System 12GC PLUSを用いて行った。

#### 2) 陽性コントロールの作成

Real-Time PCRではORF62領域、Nested PCRではORF38領域を増幅対象とした。陽性コントロールは、ワクチン株ウイルスから抽出した核酸から増幅したPCR産物を用いて行った。陽性コントロールの作成に際して、以下Real-Time PCR、Nested PCRともに増幅領域より外側にプライマーの設計を行った。(Real-Time PCR: ORF62 F2:5' - ATCGGCTCCTGTTGGTTCTC-3'、ORF62 P2:5' - GGGTCGCCTGATACTTTGGA-3'、Nested PCR: ORF38 F:5' - GTTTCAGCCAACGTGCCAAT-3'、ORF38 R:5' - CGCGCTTAACGGAAGTAACG-3') Premix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0)を用いて反応条件 94°C1min→94°C10sec/50°C 10sec/72°C30sec(30 cycle)→72°C3min→4°C∞にてPCRを行った。得られた増幅産物は、精製後に核酸量を測定して1μLあたりのコピー数を決定し、陽性コントロールとして用いた。

#### 3) PCR法

Nested PCR法はPremix Taq™ (TaKaRa Taq™ Version 2.0)を使用してTaKaRa PCR Thermal Cycler Dice®で行い、Real-Time PCR法はABI Taqman Fast Virus1-step mastermix、を使用してABI StepOnePlus™ Real-Time PCR Systemを用いて行った。PCR反応は、国立感染症研究所の提示するマニュアルに従い、以下のプライマーおよびプローブを用いた。Nested PCRは、1<sup>st</sup>、2<sup>nd</sup> PCR共に、水痘検出マニュアルに記載されている反応条件を一部変更し、94°C 1min→94°C 10sec/55°C 10sec/72°C 30sec(30cycle)→72°C3min→4°C∞で反応させ、2%アガロースゲルで75mV、25分電気泳動後、バンドの有無を判定した。Real-Time-PCRは、マニュアルに記載の条件(50°C2min→95°C10min→95°C 30sec/60°C1min(40cycle)→4°C∞)で反応させ、判定を行った。

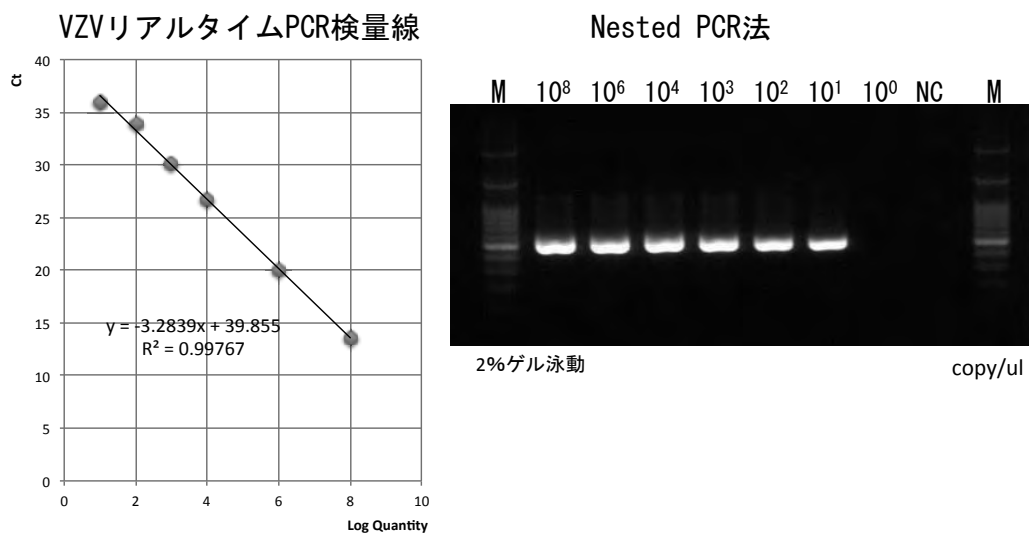
PCR法	プライマー	5'	3'
リアルタイムPCR	Forward:	5'-CCTCCGTATCGGGACTTCAA-3'	
	Reverse:	5'-TGACCGTCCTCGCATAACGTA-3'	
	Probe:	5'-FAM-TTGCGAAGAGCTAAC-TAMURA-3'	
Nested PCR	HVZV1	5'-TTC AGC CAA CGT GCC AAT AAA -3'	
	HVZV2	5'-GAC GCG CTT AAC GGA AGT AAC-3'	
	VZ38in1	5'-CTT GAT CCG TGT CAT CAT CAC-3'	
	VZ38in2	5'-CTG ATG TGG TTA CGG AAG ACG-3'	

#### 4) 検出感度の算出

Real-Time PCRおよびNested PCRによる感度の違いは見られず、どちらも10コピー/μLという高い検出感度が得られた。Real-time PCRの検量線は、Slope -3.28、R<sup>2</sup> 0.99であり、増幅効率良好であった。

PCR反応に要した時間は、Nested PCRでは175分、Real-time PCRでは95分で、Real-time PCRに

要する時間は、Nested PCR に要する時間のほぼ半分（54%）であった。



## 2) 臨床応用

上記の結果を踏まえて、実際に臨床的に水痘と診断された児の臨床検体からの水痘ウイルスの検出を Real-time PCR 法で試みた。3 検体(水疱内容物、唾液、咽頭拭い液それぞれ 1 検体)から抽出した核酸を用いてリアルタイム PCR を行った。いずれの検体も発症翌日に採取された検体であり、全ての検体でリアルタイム PCR 陽性となった。水疱内容物の Ct 値が最も低く (Ct 24.2)、次いで咽頭拭い (Ct 27.19)、唾液 (Ct 35.9) の順であった。いずれも良好に検出されており、臨床検体での検査でも問題なく使用できることが示された。

### 【考察と今後の課題】

今回の研究では、水痘ワクチン株ウイルスの PCR 産物を用いて検出感度の検討を行ったが、いずれも 10 コピーであり、臨床応用にも十分耐えうる感度であると考えられた。2つの検査系のうち、Real-time PCR 法は、反応時間が短く、PCR 産物の移し替えの手に伴うコンタミネーションの可能性がないこと、プローブによる特異的増幅の確認ができることから、より実際の検査に適した検査系である。3 種類の臨床検体を用いて行った水痘疑い症例のリアルタイム PCR では、いずれの臨床検体でも核酸の増幅がみられ、実際の検査として使用できることが示唆された。今後はより多くの臨床検体を用いて検査系の確認を行い、非特異的反応などの有無を検証するとともに検査への導入を図ることで、水痘のより迅速な診断の一助となり、患者の治療や重症化防止を講じる上で非常に有効な手段となり得ると考えられた。

【経費使途明細】

項目	金額
ウイルス培養関連試薬類	130,000 円
核酸検査関連試薬	115,000 円
実験器具等消耗品	55,000 円
合計	300,000 円