

目次

- 【1】水痘・帯状疱疹ウイルス感染症の概説
- 【2】検査に関する一般的注意
 - 1. 検査材料の採取
 - 2. 検査材料の輸送
 - 3. 検査の進め方
- 【3】検査法
 - 1. ウイルス分離
 - 2. 抗原検出 (免疫蛍光法)
 - 3. 抗体検出
 - A) 蛍光抗体法
 - B) 酵素抗体法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)
 - C) 中和試験法
 - 4. ウイルス DNA 検出
 - A) DNA 抽出法
 - B) PCR 法
 - C) Nested PCR 法
 - D) リアルタイム PCR
 - 5. ワクチン株と野生株の分別
- 【4】判定基準
- 【5】引用文献

【1】水痘・带状疱疹ウイルス感染症の概説

水痘・带状疱疹ウイルス（varicella-zoster virus、VZV）は、ヘルペスウイルス科 α ヘルペスウイルス亜科に属するDNAウイルスである。VZVの初感染により水痘を、再活性化により带状疱疹を引き起す。空気感染、飛沫感染、接触感染により広がり、水痘発症までの潜伏期間は感染から2週間程度（10～21日）である。発疹の出現する1-2日前から70%程度の患者が発熱し、一部の患者では40℃以上となり、この際に熱性痙攣を合併する場合がある。典型的な症例では、皮疹は紅斑から始まり、水疱を形成し、その後膿疱から最終的に痂皮化して終了する。皮疹出現後4日目までは、次々と皮疹が出現するため、紅丘疹、水疱、膿疱など様々なステージの発疹が混在するのが水痘の特徴である。治療を行わなければその数は増加し、全身の皮疹数として平均的には250～300個となる。皮疹数50個以下は軽症、500個以上は重症に分類され、重症になると入院治療が必要となる場合が多くなる。水痘治癒後、VZVは脊髄後根神経節や三叉神経節に潜伏感染し、後年免疫能が低下した場合に再活性化すると带状疱疹を発症する。

水痘は小児の軽症疾患と考えられる傾向にあるが、わが国では毎年100万人以上が罹患し、重症化に伴い入院を要する患者が推計4千人程度、有効な抗ウイルス薬が開発されている現在においても水痘による死亡者が20人前後発生している。入院事例は、小児では肺炎、気管支炎、熱性痙攣、細菌感染症といった合併症によることが多く、成人では水痘そのものが重症化する。また、免疫不全ないし免疫抑制状態にある人が罹患すると重症化する。妊娠末期に妊婦がVZVに感染すると胎児が胎内でVZV感染を受けて、出生前後に水痘を発症することがある。特に、妊婦が出産4日前から出産2日後の周産期に水痘を発症した場合には、新生児に移行抗体がないため、新生児水痘は重症化する。

水痘も带状疱疹も特徴的な臨床像を呈するので、実験室診断が必要となることはあまりない。しかし、時には発疹の性状が他の水疱性疾患と判別しにくい場合や、带状の水疱群がVZVによるのか単純ヘルペスウイルス（HSV）によるのか紛らわしいことがある。また、天然痘の初期臨床像が水痘と似ていることや天然痘患者を診た経験をもつ医師が減少してきているため、バイオテロ対策の観点から迅速診断が必要となる場合がある。こうした場合には、血清学的検査またはウイルス学的検査によって原因ウイルスを早く確定し、早期に治療方針を決定することが必要になる。また、ハイリスク児では、より早期に診断することで重症に至る前に治療を行うことが可能となる。

VZV感染の予防のために弱毒水痘生ワクチン（岡株）が日本で開発され、国内外で広く使用されている。本ワクチン接種後の副反応は極めてまれである。ワクチンを接種したにも関わらず、軽症の水痘に罹患する”breakthrough水痘”が起こることがある。米国・ドイツなどでは、その対策として2回接種が推進されている。ワクチン接種者からの2次感染は極めてまれである。2010年時点での水痘ワクチンに関する情報は「ファクトシート」として厚生科学審議会感染症分科会予防接種部会に提出されており、下記サイトよりダウンロードすることができる(www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000000bx23-att/2r9852000000bxqx.pdf)。なお、ワクチンに関する疫学的調査では、VZV野生株とワクチン株かの分別を求められる場合がある。

【2】 検査に関する一般的注意

VZV は病原体のバイオセーフティレベル分類でレベル 2 に属するので、ウイルスの取り扱いには BSL2 の安全設備を備えた実験室内で行う。

1. 検査材料の採取

- (1) VZV の分離は、水疱内容液、咽頭ぬぐい液、末梢血リンパ球、髄液などの検体から行う。水疱液からは高率に分離できるが、その他の検体からの分離率は低い。水疱液からのウイルス分離は、1 ml の注射器で水疱液を無菌的に採取し、0.5ml の希釈液（10% ウシ胎児血清、5% ショ糖、100µg/ml のカナマイシンを含む PBS）が入ったチューブに注射器の内容を移し入れる。直ちに組織培養に接種することが望ましいが、後から分離を行う場合などでは -80℃ に保存しておく。
- (2) ウイルス分離結果が陰性でも、検査材料の一部を用いて PCR を行うと陽性となることがある。PCR を行うときは、水疱内容液、髄液は遠心した沈渣を材料とする。血液の場合は 2ml 程度を EDTA 採血し、リンパ球を分離して検体とする。痂皮は剥離したものの数 mg をマイクロチューブに入れて室温で輸送する。
- (3) 免疫蛍光試験は、水疱内容の感染細胞を 1ml の注射器または綿棒を用いて十分量採取する。直ちに塗抹標本を作り固定する。
- (4) 血清学的検査のための血清は、発病後 5 日以内の急性期と 2 週以後の回復期にペアで採血することが望ましい。血清を分離して検査まで -20℃ に保管する。

2. 検査材料の輸送

- (1) ウイルス分離用、PCR 用の検体は感染性物質として適切に輸送する。
- (2) 血液は採血後速やかに保冷剤入りの容器に入れて検査室に運び、当日のうちに前処理を行う。血清反応用の血清は -20℃ に保管し、ドライアイス凍結で輸送する。

3. 検査の進め方

目的によって適切な検体と方法を、表 1 をもとに選択して検査する。

VZV 感染症疑い 患者検体	ウイルス 分離	抗原 検出	DNA 検出	抗体 検出
水疱液	○	○	○	
咽頭拭い液・髄液	△		△	
痂皮			△	
急性期末梢血リンパ球	△		△	
回復期血清				○

【3】 検査法

1. ウイルス分離

VZV の分離は、水疱内容液、咽頭ぬぐい液、末梢血リンパ球、髄液などの検体から行う。水疱液からは高率に分離できるが、その他の検体からの分離率は低い。材料をヒト二倍体細胞（HEL 細胞または MRC5 細胞）に接種し、特徴的な細胞変性効果（cytopathic effect, CPE）の出現で判定する。感染細胞から PCR 法により VZV 特異的 DNA を検出するか、抗 VZV モノクローナル抗体を用いた蛍光抗体法で確定する。

ヒトメラノーマ細胞 MeWo で、VZV の増殖は可能であるが、CPE が見づらいことや、ウイルスの増殖がヒト二倍体細胞に比べて遅いことから、使用することは薦めない。なお、水痘ワクチン株に限っては、モルモット線維芽細胞 GPL で増殖させることができる。

(1) 試薬・機材

- ・ 5%CO₂培養器（37℃）
- ・ 培養用プラスチックフラスコ（25cm²）
- ・ Eagle's MEM（pH7.2）
- ・ ウシ胎児血清（FBS）
- ・ 0.25%トリプシン溶液
- ・ 細胞凍結保存液（市販のもの、または 10%FBS,10%DMSO 含有 MEM）

(2) 培養液の調製

Eagle's MEM に L-グルタミンと炭酸水素ナトリウムを指示どおりに加え pH を 7.2 前後に調製する。FBS を細胞増殖用培養液には 10%、細胞維持用培養液には 2% になるように加える。

(3) 方法

- ① HEL 細胞または MRC5 細胞を、1 日後に単層培養が形成されるように細胞数を調整し、増殖用培養液を入れた培養用プラスチックフラスコに入れて 37℃ の培養器で培養する。なお、継代数が大きい細胞での分離効率は低くなる。
- ② 1 日後フラスコの培養液を除去し、0.2~0.5ml の検体を維持培養液で 2 倍に希釈して接種する。
- ③ 培養器内で 1~2 時間吸着させる。
- ④ 維持培養液を加えて 37℃ の 5%CO₂培養器内で培養しながら、3 日から 7 日位で出現する細胞変性効果（CPE）を観察する。感染細胞の円形化、膨大化などがみられる。CPE が出現しない場合でも 7 日目毎に新しい維持培養液に換えて、さらに 2 週間観察を続ける。
- ⑤ CPE が拡大したら、感染細胞をトリプシン処理してフラスコから剥がし、一部を感染細胞として細胞凍結保存液に浮遊させて -80℃ に保存する。
- ⑥ 残りの感染細胞は PCR による DNA 検出や免疫蛍光染色に用いる。免疫蛍光染色による場合は、トリプシンで分散した感染細胞を 10%FBS 含有 MEM に浮遊させた後遠心し、細胞を

PBS で懸濁後、12 穴などのマルチウェルスライドガラスのウェル内に滴下する。安全キャビネット内で十分に乾燥後、アセトン固定し染色をする。

(4) ウイルスの継代

VZV は細胞から細胞へと感染し、培養液上清に細胞フリーの感染性ウイルスはほとんど認められない。従って、通常は、感染細胞をトリプシンで分散し、1:5~1:20 程度で正常培養細胞へ感染させて継代する。

(5) 細胞フリーのウイルス液の調製

VZV は大変不安定であるため、増殖の良い継代数の少ない細胞を用いて大量に培養し、冷却などの細心の注意を払っても、数千 PFU/ml 以上の力価を有する細胞フリーのウイルス液を得ることは、相当困難である。また、ウイルス液を -80℃ に保存し、融解して使用する際には、力価は新鮮な場合に比べ数分の 1 程度になることにも注意が必要である。

方法

- 1 冷 PBS(-) で感染細胞を洗った後、スクレーパーで細胞を集める。
- 2 低速遠心で細胞を集めた後、5% sucrose, 10% FBS, 0.1% Na-glutamate 入り冷 PBS(-) に懸濁する（目安として、T150 フラスコ当り、2~5ml 程度）。
- 3 超音波破碎した後(条件は、機器やスケールに依存するため試行錯誤で決める必要がある)、低速遠心し、その上清を分注後、-80℃ に保存する。

(6) ウイルス感染価測定法

中和試験などに用いる細胞フリーのウイルスの感染価は次のように測定する。

- 1 HEL 細胞または MRC5 細胞を 6 穴組織培養用プレートに分注する (4×10^5 cells/well)。
- 2 37℃ の 5% CO₂ 培養器内で 1 日培養する。
- 3 細胞を単層培養したプレートから培養液を除去し 10 倍階段希釈をしたウイルス液を 100µl ずつ接種する。
- 4 37℃ の 5% CO₂ 培養器内で 90 分間吸着させる。
- 5 1% メチルセルロース、2% FBS 含有 Eagle's MEM を加える (2ml/well)。
- 6 37℃ の 5% CO₂ 培養器内で 6 日間培養する。
- 7 6 日目に培養液を除去し、細胞を染色液 (1% ホルマリン、0.1% メチレンブルー水溶液) で固定、染色する (2ml/well)。
- 8 約 2 時間染色した後水洗し、低倍率顕微鏡下でフォーカスを計数して感染価を算定する。

2. 抗原検出 (免疫蛍光法)

水疱内のウイルス感染細胞を検体として、直接蛍光抗体法で VZV 抗原を検出する。FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体が市販されている。信頼できる判定をするには、十分量の細胞数 (100 位) を採取することが重要である。(文献 1)

(1) 試薬・機材

- ・マルチウェルスライドグラス
- ・アセトン
- ・FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体
- ・PBS(-)
- ・封入液（無蛍光グリセリン：PBS(-)=9：1）
- ・落射型蛍光顕微鏡

(2) 方法

- 1 水疱液の内容を 1ml の注射器で採取し、マルチウェルスライドグラスに塗抹する。または水疱を覆っている上皮を剥がし、PBS で湿らせた滅菌綿棒で病巣基底部分を拭って水疱内の剥離感染細胞をスライドグラスのウェル内に塗抹する。
- 2 冷風で十分に乾燥させる。
- 3 冷アセトンに 5~10 分間浸して固定する。
- 4 FITC 標識抗 VZV モノクローナル抗体液を検体を塗抹したウェル上へのせる。
- 5 スライドグラスを湿潤箱に入れ 37℃で 20~60 分間反応させる。乾燥させないように注意する。
- 6 洗浄瓶またはシャーレ中で PBS に 2 回、水に 1 回、静かに浸して検体をはがれないよう注意しながら洗う。
- 7 冷風で乾燥後、封入液を滴下してカバースリップをのせ蛍光顕微鏡で観察する。
- 8 VZV 感染細胞は緑色の特異蛍光を発する。偽陽性反応に注意して判定する。対照として FITC 標識抗 HSV モノクローナル抗体による染色を行うことが望ましい。同時に、VZV 感染培養細胞、HSV-1、-2 感染培養細胞、非感染培養細胞を加える。

3. 抗体検出

VZV に対する各血清学的方法の特徴と限界については、文献 2 の総説を参考にするとよい。

A) 蛍光抗体法

FAMA (fluorescent antibody to membrane antigen)法（文献 3）が、抗体検出の gold standard 法として長年使用され、ELISA や他の蛍光抗体法より優れていると考えられている。しかし、FAMA は手順が多く熟練が求められる。アセトン固定した一般的な間接蛍光抗体法(IFA)では非特異的反応が出るとの批判が当初あったが、熟練した検査担当者が観察すると、さほど現実的には問題にならないと思われる(文献 4)。VZV 感染 Vero 細胞をテラサキプレートに添加して FAMA を簡便にした方法や A549 細胞を用いた IFA も報告されている(文献 5, 6)。以下には、ほとんどの場合には使用できる一般的な間接蛍光抗体法を記載する。

(1)試薬・機材

- ・マルチウェルスライドグラス
- ・FITC 標識抗ヒト IgG 抗体
- ・PBS(-)
- ・封入液（無蛍光グリセリン：PBS(-)=9：1）
- ・落射型蛍光顕微鏡

(2)方法

- 1 20~30%程度の細胞がCPEを呈している感染細胞（もしくはgE/gI発現細胞）を回収後、12穴などのマルチウェルスライドグラスに滴下し、冷風で十分に乾燥させる。
- 2 冷アセトンに5~10分間浸して固定する。
- 3 洗浄瓶中でスライドグラスをPBSで1回洗浄後、余分な水分を除いたのち、ヒト血清を10倍から段階希釈し、ウェル上へのせ、湿潤箱に入れ37℃で30~60分間反応させる。
- 4 洗浄瓶中でスライドグラスをPBSで2回洗浄後、余分な水分を除いたのち、FITC標識抗ヒトIgG抗体液を、ウェル上へのせ、湿潤箱に入れ37℃で30~60分間反応させる。
- 5 スライドグラスを湿潤箱に入れ37℃で30~60分間反応させる。乾燥させないように注意する。
- 6 洗浄瓶またはシャーレ中でPBSに2回、水に1回、静かに浸して検体がはがれないよう注意しながら洗う。
- 7 冷風で乾燥後、封入液を滴下してカバースリップをのせ蛍光顕微鏡で観察する。
- 8 全ての細胞に見られる蛍光は非特異的なものである。VZV感染細胞では主に細胞膜に緑色の特異蛍光を発する。

B) 酵素抗体法（Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA）

精製糖蛋白抗原（文献7）をVZV抗原として用いるELISA(gpELISA)は、感染細胞全体を破碎して作製した抗原を用いたELISAに比して、特異性も感度も高い。ウイルスを感染させない細胞から作製した対照抗原を同時に準備する。

なお、VZV IgG-ELISA抗体、IgM-ELISA抗体を測定するためのキットが市販されておりほとんどの目的には適しているが、VZV感染が強く疑われるにも関わらず陰性となった場合には、より感度に優れるFAMAやgpELISAを実施する。

(1)試薬・機材

- ・ELISA用プレート
- ・Coating buffer（炭酸-炭酸水素緩衝液、pH9.6）

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g

H₂Oを加えて1,000mlにする
- ・洗浄バッファー（0.05%Tween-20含有PBS）
- ・精製糖蛋白抗原

- ・希釈緩衝液（1%BSA, 0.05%Tween-20 含有 PBS）
- ・標準抗体
- ・酵素標識抗体（HRP 標識抗ヒト IgG 抗体または IgM 抗体）
- ・基質溶液（TMB 液、TMB は錠剤が市販されている）

TMB	1mg/1錠（シグマ）
0.05M クエン酸リン酸緩衝液、pH5.0	10ml
30% H_2O_2	2 μ l
- ・酵素反応停止液（1N 硫酸液）
- ・プレートウォッシャー
- ・マイクロプレートリーダー

(2)検査方法

- 1 Coating buffer で至適濃度に希釈した抗原をプレートに分注する（100 μ l/well）。
- 2 検体の各血清希釈につきウイルス抗原と非感染対照抗原を 2well ずつ用意する。陽性血清対照、陰性血清対照および試薬のブランクを設定する。
- 3 プレートカバーをして 4 $^{\circ}$ C に一夜おく。
- 4 プレートを洗浄バッファーで 3~4 回洗浄する。
- 5 希釈緩衝液で 100 倍に希釈（IgM 抗体を測定する場合は 50 倍に希釈）した被検血清を 100 μ l ずつ入れる。同じプレートに至適濃度に希釈した陽性対照血清と 100 倍に希釈した陰性対照血清を 100 μ l ずつ入れる。ブランクには希釈緩衝液を 100 μ l 入れる。
- 6 プレートカバーをして 37 $^{\circ}$ C に 60 分間おく。
- 7 洗浄バッファーで 3~4 回洗浄する。
- 8 HRP を標識した抗ヒト IgG 抗体（IgM 抗体を測定する場合は抗ヒト IgM 抗体）を 100 μ l ずつ入れる。
- 9 プレートカバーをして 37 $^{\circ}$ C に 60 分間おく。
- 10 洗浄バッファーで 3~4 回洗浄する。
- 11 TMB 基質液を 100 μ l ずつ入れる。
- 12 遮光して室温に 30 分間おく。
- 13 反応停止液を 100 μ l ずつ加える。
- 14 吸光度を測定する（450nm）。

(3)結果の判定

ウイルス抗原の吸光度から非感染対照抗原の吸光度を引いた値が 0.2 以上を示した検体を陽性と判定し、0.1 以下の検体を陰性と判定する。0.1~0.2 の間は境界値として再検査をする。急性期血清がすでに VZV-IgG 抗体陽性の場合、ペア血清で IgG 抗体が上昇しても、HSV 感染に対する交差反応の可能性があるので、同時に HSV に対する抗体も測定することが望ましい。VZV 特異 IgM 抗体の上昇が認められれば、直近の VZV 感染の可能性が高いと判定できる。

C) 中和試験法

(1) 中和試験用抗原の作製 (文献 8)

- 1 75cm²の培養用プラスチックフラスコに HEL 細胞または MRC5 細胞を培養する。
- 2 1~2 日後単層培養が形成された細胞に、予め用意した VZV 感染細胞を、感染細胞対正常細胞の比が 1 : 10 になるような濃度で接種する。
- 3 37℃の 5%CO₂ 培養器内で 2 日間培養し、70~90%の細胞が CPE を示したとき、細胞を PBS (-) で 2 回洗浄し、ラバーポリスマンで回収する。
- 4 フラスコ 1 本あたりの感染細胞を 3ml のウイルス希釈液 (10%ウシ胎児血清、5%シヨ糖、100μg/ml カナマイシンを含む PBS (-)) に浮遊させ 60 秒間超音波処理をする。
- 5 3,000rpm (1,300G) で 30 分間遠心し (4℃)、上清を採取して抗原とする。少量ずつチューブに分注し -80℃に保存しておく。
- 6 抗原の一部を希釈してウイルス感染価を測定しておく。

(2) 中和試験

- 1 4 倍に希釈した被検血清を 56℃で 30 分間非働化する。
- 2 被検血清を希釈液で 4 倍階段希釈する。
- 3 200μl 中に 400PFU を含むウイルス液と希釈被検血清を等量混合し、37℃60 分間中和反応を行う。ウイルス対照として血清の代わりに希釈液を用いて同様に処理する。
- 4 6well の組織培養用プレートに単層培養した細胞上に、中和反応を終えた血清ウイルス混合液を 100μl ずつ接種し、37℃の 5%CO₂ 培養器内で 90 分間ウイルスを吸着させる。
- 5 1%メチルセルロース、2%FBS 含有 Eagle's MEM を加え (2ml/well) 37℃の 5%CO₂ 培養器内で 6 日間培養する。
- 6 6 日目に培養液を除去し、1%ホルマリン、0.1%メチレンブルー水溶液で固定、染色する。
- 7 低倍率顕微鏡下でフォーカスを計数し、平均フォーカス数がウイルス対照に比べて 50%以上の減少を示す最高の血清希釈倍数で表す。

4. ウイルス DNA 検出

A) DNA 抽出法

ウイルス DNA の抽出は、古典的なフェノール・クロロフォルムを用いる方法、市販の DNA 抽出キットを用いる方法など、いずれの方法でも良い。水疱液や髄液などの場合には、キャリア DNA を加えた方がいい場合もある。また、血液の場合には、Ficoll-Paque などリンパ球を調製してから、DNA を精製した方が、感度が上がる。

B) PCR 法 (文献 9)

(1) ORF62-1

- 1 プライマー配列
 - VL6U 5'-TTC CCA CCG CGG CAC AAA CA-3'
 - VL1L 5'-GGT TGC TGG TGT TGG ACG CG
- 2 反応液(全量 50 μ l)
 - H₂O 27 μ l
 - 10xBuffer 5 μ l
 - dNTP mixture (2.5 μ M each) 6 μ l
 - プライマー (25 μ M each) 1 μ l
 - AmpliTaq Gold DNA (2.5U) 1 μ l
 - テンプレート DNA 10 μ l
- 3 サイクル条件
 - 94 $^{\circ}$ C 1分 1回
 - 94 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分 30-40 サイクル
 - 72 $^{\circ}$ C 3分 1回
 - 4 $^{\circ}$ C hold
- 4 産物サイズ 268bp

(2) ORF62-2

- 1 プライマー配列
 - YL3 5'-CGG GCC CAA AAA CAC TTT ATC CTA C-3'
 - YU3 5'-CTC GAC TGG CTG GGA CTT GCG CTT G-3'
- 2 反応液 Aに同じ
- 3 サイクル条件 Aに同じ
- 4 産物サイズ 242bp

(3) ORF38

- 1 プライマー配列
 - HVZV1 5'-TTC AGC CAA CGT GCC AAT AAA -3'
 - HVZV2 5'-GAC GCG CTT AAC GGA AGT AAC-3'
- 2 反応液(全量 50 μ l)
 - H₂O 29.7 μ l
 - 10xBuffer 5 μ l
 - dNTP mixture (2.5 μ M each) 4 μ l
 - プライマー (25 μ M each) 1 μ l
 - Takara Taq ポリメラーゼ (5U/ μ l) 0.3 μ l
 - テンプレート DNA 10 μ l
- 3 サイクル条件
 - 94 $^{\circ}$ C 1分 1回

94°C 1分、55°C 1分、72°C 1分 30-40 サイクル
72°C 5分 1回
4°C hold

4 産物サイズ 642bp

C) Nested PCR 法

Nested PCR は偽陽性を防ぐために十分な措置を取る必要があるため、リアルタイム PCR を実施することを推奨するが、機器の面で制約がある可能性もあるため、下記に上記 ORF38 産物の nested PCR 条件を記載する。

1 プライマー配列

VZ38in1 5'-CTT GAT CCG TGT CAT CAT CAC-3'

VZ38in2 5'-CTG ATG TGG TTA CGG AAG ACG-3'

2 反応液

PCR 反応液組成は、1st PCR 産物 2~5 μ l を用いる以外は、ORF38 の条件に同じ

3 サイクル条件

上記 ORF38 に同じ

4 産物サイズ 498bp

D) リアルタイム PCR

1 プライマー配列

5'-CCTCCGTATCGGGACTTCAA-3'

5'-TGACCGTCCTCGCATAACGTA-3'

2 プローブ配列

FAM-TTGCGGAAGAGCTAAC-MGB-3'

3 反応液(全量 25 μ l/well)

H₂O 6.175 μ l

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied) 12.5 μ l

Sonicated salmon sperm DNA(100 μ g/ml) 0.5 μ l

プライマー(25 μ M each) 0.2 μ l

プローブ (10 μ M) 0.625 μ l

DNA サンプル 5 μ l

4 サイクル条件

50°C 2分、95°C 10分 1回

95°C 30秒、60°C 1分 40~45 サイクル

5 コピー数スタンダード: 標的となる ORF62 遺伝子を含んだプラスミド

5. ワクチン株と野生株の分別

ワクチン株と野生株の分別で最も確実な方法は、ORF62 遺伝子全体を PCR で増幅し、その産物の塩基配列を決めるものである。一方で、簡便な方法としては、1)PCR 産物の制限酵素切断による方法、2) PCR 産物中の一残基の違いを FRET による融解温度 (T_m) 測定で、その差を同定する方法 (文献 10)、3)SNP 解析に用いられる TaqMan allelic discrimination assay 法により、ワクチン型と野生型に対する 2つのプローブを利用して区別する方法 (文献 11) などがある。2)及び3) ともに特異性の高い方法であるが、よほど繰り返し検査を行うことがないと、事前の条件設定などに時間が取られるため、ここでは古典的な制限酵素による方法のみを記載する。

PCR 産物の制限酵素切断による方法

1) 上記 ORF62-1 PCR 産物：配列位置 106383 (位置は Oka 株配列に基づく)の残基の差

- 1 酵素：SmaI
- 2 切断産物 野生株：153bp, 79bp, 36bp、ワクチン株：112bp, 79bp, 41bp, 36bp
- 3 判定：153bp と 112bp の差で容易に確認できる。

2) 上記 ORF62-2 PCR 産物：配列位置 107257 の残基の差

- 1 酵素：HhaI
- 2 切断産物 野生株：122bp,88bp, 26bp、ワクチン株：88bp, 75bp, 45p, 26bp
- 3 判定：122bp と 75bp の差で容易に確認できる。

【4】 判定基準

次のいずれかにあてはまれば、VZV 感染とする。

1. VZV が分離される。
2. PCR 法により VZV 遺伝子が検出される。
3. 水疱内容液から抗 VZV モノクローナル抗体による免疫蛍光法で VZV 抗原が証明される。
4. 血清中に VZV 特異的 IgM 抗体が検出される。(ただし急性期と回復期のペア血清で IgM 抗体の有意な上昇を確認することが望ましい)
5. 急性期と回復期のペア血清で、IgG 抗体の 4 倍以上の上昇が認められる。ただしこの場合には HSV 感染である可能性もあるので、注意して鑑別診断をする。

【5】 引用文献

1. Dahl et al. Antigen detection: the method of choice in comparison with virus isolation and serology for laboratory diagnosis of herpes zoster in human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Microbiol. 35:347-9, 1997.
2. Breuer et al. Use and limitations of varicella-zoster virus-specific serological testing to evaluate breakthrough disease in vaccinees and to screen for susceptibility to varicella. J Infect Dis. 197 Suppl 2:S147-51, 2008.
3. Williams et al. Serologic response to varicella-zoster membrane antigens measured by direct

immunofluorescence. *J Infect Dis.* 130:669-72, 1974

4. Landry et al. Comparison of fluorescent-antibody-to-membrane-antigen test, indirect immunofluorescence assay, and a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for determination of antibody to varicella-zoster virus. *J Clin Microbiol.* 25:832-5, 1987
5. Baba et al. A simplified immunofluorescence technique for antibody to varicella-zoster membrane antigen (FAMA). *Biken J.* 27(1):23-9, 1984
6. Sauerbrei et al. Immunofluorescence test for sensitive detection of varicella-zoster virus-specific IgG: an alternative to fluorescent antibody to membrane antigen test. *J Virol Methods.* 119(1):25-30, 2004.
7. Hammond et al. The optimization and validation of the glycoprotein ELISA assay for quantitative varicella-zoster virus (VZV) antibody detection. *J Med Virol.* 2006 Dec;78(12):1679-87.
8. 高山道子、大谷明：水痘ウイルス中和試験用抗原調整方法と中和試験への影響。 *臨床検査* 26: 1525-28, 1982
9. **Loparev** et al. Improved identification and differentiation of varicella-zoster virus (VZV) wild-type strains and an attenuated varicella vaccine strain using a VZV open reading frame 62-based PCR. ***J Clin Microbiol.* 38:3156-60, 2000.**
10. Loparev et al. Rapid genotyping of varicella-zoster virus vaccine and wild-type strains with fluorophore-labeled hybridization probes. *J Clin Microbiol.* 38:4315-9, 2000.
11. Campsall et al. Detection and genotyping of **varicella**-zoster virus by **TaqMan** allelic discrimination real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 42:1409-13, 2004.

【執筆者】

井上直樹 国立感染症研究所ウイルス第1部