

目次

- 【1】 性器ヘルペスウイルス感染症の概説
  - [1] はじめに
  - [2] 単純ヘルペスウイルス(HSV)の特徴
  - [3] 性器ヘルペスウイルス感染症
  - [4] HSV 型別の意義
  - [5] 診断と検査方針
- 【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] 感染症法に基づく届出基準
- 【3】 検査法
  - [1] ウイルス分離と同定
  - [2] 抗原検出
  - [3] ウイルス DNA 検出
    - 1) コンベンショナル PCR
    - 2) リアルタイム PCR
- 【4】 引用文献
- 【5】 問い合わせ先
- 【6】 執筆者一覧

## 【1】 性器ヘルペスウイルス感染症の概説

### [1] はじめに

性器ヘルペスは、単純ヘルペスウイルス (*herpes simplex virus*:HSV, HSV-1 型又は2型) が感染し、性器又はその付近に発症したものをいう。性感染症定点医療機関からの届出を要する5類感染症に分類されている。わが国の性感染症に占める割合は、男性では淋菌、クラミジアに次いで3位、女性ではクラミジアに次いで2位を占めている。HSVには、1型と2型の2種が知られており、感染症法に定められた報告対象疾患のなかでは、性器ヘルペス以外に全数把握5類感染症の急性脳炎や5類定点感染症の無菌性髄膜炎の病原体となることもある。

HSVの皮膚粘膜病変は、性器ヘルペスのほかに、口唇ヘルペス、ヘルペス性歯肉口内炎や、単純ヘルペス、Kaposi水痘様発疹などの病態が知られている。単純ヘルペスウイルスは、眼感染症(急性角結膜炎、虹彩炎、角膜ヘルペス、急性網膜壊死)や新生児ヘルペス、単純ヘルペス脳炎、脊髄炎、Mollaret髄膜炎の病原体としても重要である。皮膚粘膜病変では、基本的に上半身は1型が、下半身は2型が、それぞれ多くみられる。角膜ヘルペスや脳炎では1型、性器ヘルペスや新生児全身感染例では両型が検出される。またMollaret髄膜炎や急性網膜壊死が2型によるという報告がある。Mollaret髄膜炎は比較的若い女性に多くみられる軽度の再発性髄膜炎で、性器ヘルペスを随伴しないこともある。髄液にはリンパ球系細胞が軽度(200/μl程度)に増加し、大型の血管内皮系ないしは単球系細胞(Mollaret細胞)がみつかるといわれる。一方、性器ヘルペスは初感染では1型もみられるが、再発例の多くは2型である。接触感染によるので性感染症(STD)と考えられ、さらに女性性器ヘルペスは、新生児ヘルペスの重要な感染源である。

### [2] 単純ヘルペスウイルスの特徴

ヒトに感染するヘルペスウイルスは8種が知られており、このうちHSVは、HSV-1型(正式名称は*Human Herpesvirus-1*:HHV-1)とHSV-2型(正式名称は*Human Herpesvirus-2*:HHV-2)の2種を占める。二本鎖DNAのゲノムサイズは152kbpと大きく、1型と2型の塩基配列には70%以上の相同性がある。被膜(エンベロープ)をもった直径200nm前後のウイルス粒子のほかに、感染細胞の核内には直径100nm前後のカプシドがみられる(図1)。ウイルス粒子像はヒトヘルペスウイルスにはほぼ共通であるが、電子顕微鏡で観察される付随した構造物の存在や粒子形態像が同定型別に役立つことがある。HSV-1およびHSV-2は水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)とともにアルファヘルペスウイルス亜科に属し、その感染動態にはいくつか類似点がある。接触等の初感染後に皮膚粘膜病変を起こし、その後知覚神経節に終生潜伏感染し、ヒト宿主の状態が変化(免疫低下やストレスなど)すると再活性化するという特徴をもつ。再活性化は明瞭な病変を伴う回帰発症以外に、明らかな病変を伴わない無症候性ウイルス排泄のみであることも多く、いずれも感染源となる。HSVの宿主域はVZVよりも広く、全身感染を起こした場合は種々の細胞に感染する。

### [3] 性器ヘルペスウイルス感染症

性器ヘルペスは、外部から入ったウイルスによる初感染の場合と、仙髄神経節に潜伏しているウイルスの再活性化による場合の2つがある。臨床症状は、初感染では、感染後3~7日の潜伏期の後に外陰部に小水疱又は浅い潰瘍性病変が数個ないし集簇的に出現する。発熱などの全身症状を伴うことが多い。2~4週間で自然に治癒するが、抗HSV剤を投与すると7~10日で治癒する。治癒後も月経、性交その他の刺激が誘因となって、再発を繰り返す。発疹は外陰部のほか、臀部、大腿にも生じることがある。病変部位は男性では包皮、冠状溝、亀頭、女性では外陰部や子宮頸部である。口を介する性的接触によって口唇周囲にも感染する。HSV-2による性器ヘルペスは、HSV-1によるものより再発しやすい。

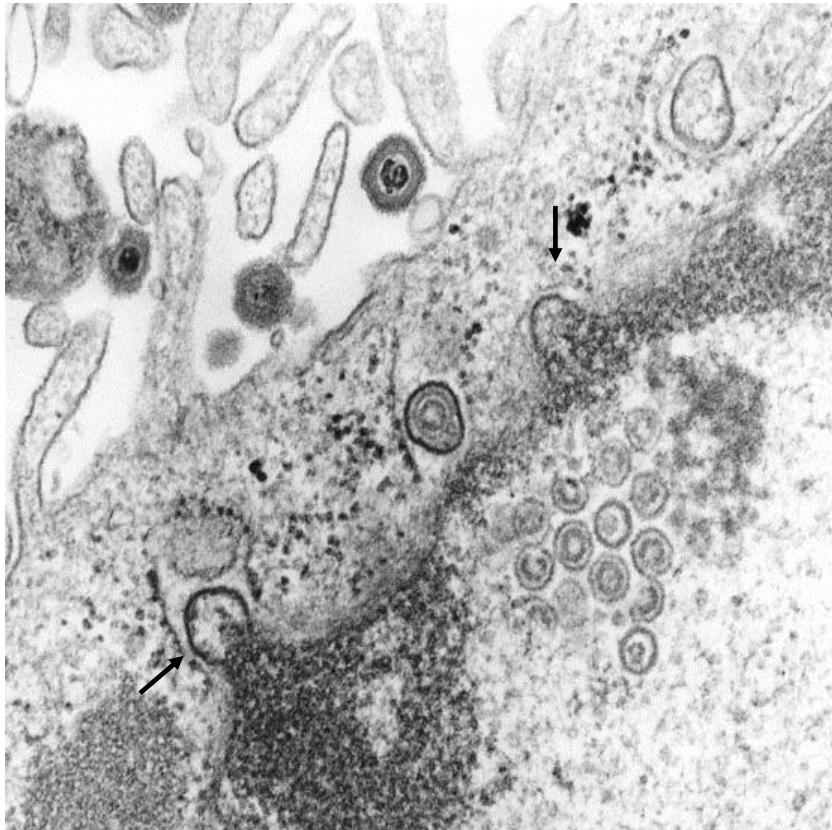


図1. HSV-1感染Vero細胞の電顕写真（国立感染症研究所 感染病理部）  
 右下が細胞の核で、左上が細胞質と細胞外になる。核内には直径100 nmのヌcleoカプシドが集簇してみられ、細胞質内にはウイルス被膜をかぶった粒子が、そして細胞外には成熟したヘルペスウイルスに特徴的な粒子（直径200 nm）が認められる。核膜で出芽する粒子が見られる（矢印）。

#### [4] HSV 型別の意義

性器ヘルペスでは、HSV-2 のほうが再発しやすく、再発病変の多くは HSV-2 によることが多い。脳炎は HSV-1 によることがほとんどであるが、脊髄炎、髄膜炎や髄膜脳炎では HSV-2 が多く、血清型情報は感染様式や今後の再発の可能性予測などに役立つ。HSV 皮膚粘膜病変の初期は、水痘帯状疱疹ウイルス (Varicella-zoster virus: VZV) の初期病変との鑑別が困難なことがある。また、同じ皮膚節(dermatome)に HSV-1 と HSV-2 が同時に検出されることもある。

#### [5] 診断と検査方針

性器ヘルペスウイルス感染症の臨床診断は、単発～数個の病変のみがみられる初期以外は困難ではないが、血清診断よりは病原体診断のほうが有益である。病原体診断はウイルス分離、特異抗原の検出、ウイルス核酸の検出により可能である。ウイルス分離に成功すれば、HSV 型別試験や抗ウイルス剤に対する感受性検査も可能となる。わが国の成人は 60%以上が感染しているので、血清診断の臨床的価値は高くないが、有用となる事例もあるため、血清検体の採取も必要である。中和抗体試験のほか、酵素抗体法(EIA)により IgG, IgM 抗体の検出が可能である。なお、一部の商業検査では、安価な補体結合反応(CF)測定法が用いられているが、その特異性・感度は不十分であることから、推奨されない。

ウイルス分離は薬剤感受性や分子疫学への応用が可能となるため公衆衛生上きわめて有用であるが、2～7日間を要し、初期病変やより後期の病変では感度が顕著に低下する。迅速診断という観点からは、ウイルス抗原やウイルス核酸の検出は有用性が高い。PCR 法や LAMP 法による増幅ステップを含む核酸の検出は高感度であるが、contamination に由来する偽陽性（リアルタイム PCR 法など増幅産物を直接取扱う必要のない手技ではリスクが低減される）ないし手技上の偽陰性の問題や、感染性病原体ではなく核酸断片の検出であ

るため病因的意義に関して問題がある。ウイルスが盛んに増殖中の皮膚粘膜病変の診断には、ウイルス抗原の検出やウイルス分離が適当であるが、髄液や量の限られる眼前房水や硝子体等の検体では、ウイルス核酸をPCR法等で増幅して検出するのが实际的である。

## 【2】検査に関する一般的注意

### [1] 検査材料の採取

病変部から直接組織、感染細胞およびウイルスを採取し検査に供する。できるだけ無菌的な検体が望ましいが、患部を採取直前にエタノール消毒すると細胞膜に由来する被膜（エンベロープ）を有するHSVは不活化されてしまうおそれがある。

図1及び表1に検査材料、検査方法及び検体保存の関係について、まとめた。

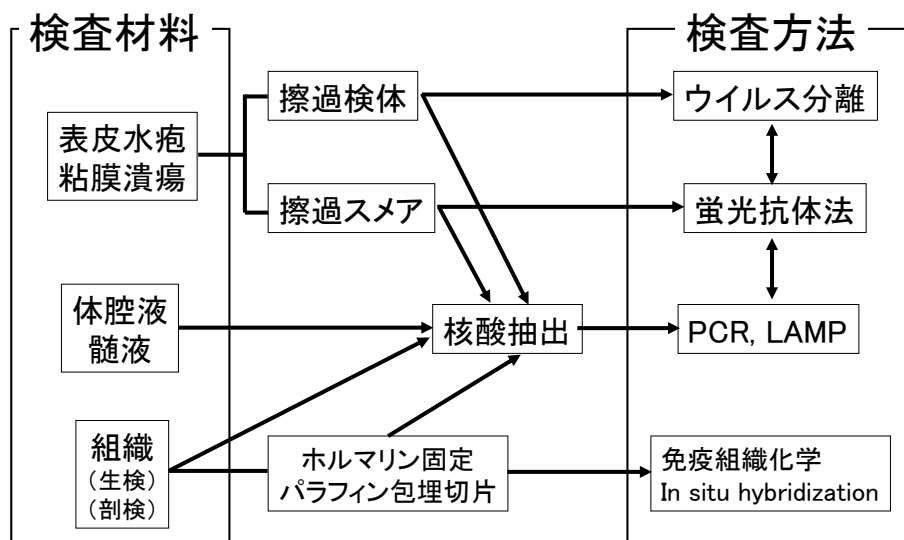


図2 検査材料と検査方法

表1 単純ヘルペスウイルス患者検体による検査法と保存法

患者検体	検体成分	検査法	保存法
血液	血清	抗体検出(EIA, 中和抗体法)*	-20℃
	血球	通常は実施しない	
皮膚粘膜	水疱内容液, 水疱蓋,水疱底	ウイルス分離	-80℃**
		細胞スミアでのウイルス抗原検査	アセトン固定後4 ~ -20℃
		ウイルスDNAの検出(PCR, LAMP)	-20 ~ -80℃
体腔液		ウイルス分離	-80℃***
		ウイルスDNAの検出(PCR, LAMP)	-20 ~ -80℃
組織	感染細胞	核内封入体(Full型、Cowdry A型)	ホルマリン固定 パラフィン包埋
		免疫組織化学	
		In situ hybridization	
		ウイルスDNAの検出(PCR, LAMP)	

\*抗体検出には、EIA法、補体結合（CF）反応、中和抗体(NT)法、およびウェスタンブロット(WB)法などがあるが、EIAもしくはNTが推奨される。詳細は、成書を参照されたい。なお、HSV抗体陽性血清に対し、さらに型別を可能とするEIA法は有用であるが、感度は100%ではない。

\*\* ウイルス分離のためには、冷蔵状態で検体を移送し、できるだけ早く細胞に接種することが望ましい。

\*\*\* 髄液からウイルス分離ができるケースは少ない。

表皮には角化層があるため水疱が形成される。水疱病変の場合、感染細胞は水疱蓋と水疱底ないし水疱を取り囲む扁平上皮細胞（表皮細胞）に存在し、ウイルス粒子は水疱液内にも存在するので、1)水疱蓋と 2)水疱内容液および 3)水疱蓋を取った後の病変部を滅菌生食水で浸した綿棒等で擦過して感染細胞を採取し、1 ml 以下の少量の滅菌生食水等に浸す。表皮では水疱が破れたあとのびらん、潰瘍では病変部、特に辺縁部を擦過する。一部はスライドガラスに細胞塗沫標本を作製し、乾燥後アセトンで 10 分間固定し、ウイルス抗原の検出に用いる。直ちに検討しない場合は-20°C ないし-80°C で凍結保存する。ウイルス核酸の抽出用にはそのまま直ちに凍結保存するか、細胞組織を可溶化するための液に入れる。ウイルス分離用の検体としては、上記擦過液や体腔液を、可能な限り早急に細胞に接種することが望ましいが、数日中に接種可能な場合には冷蔵状態で、後日接種する場合にはウイルス力価は低減するが-80°Cに冷凍保存する。体腔液（髄液など）はそのまま凍結保存するか、検体量が多い場合は、遠心して細胞成分やウイルス粒子を集める。

生検ないし剖検組織は、通常の pH7.4 前後の 10%緩衝ホルマリンで固定し（一週間以内が望ましい）、パラフィン包埋する。形態学的診断とともに、免疫組織化学や *in situ hybridization* 法でウイルス抗原やウイルスゲノムを検出することができる(図 2)。免疫組織化学的に型別が可能である。また良好に処理されたものであれば、パラフィン切片からウイルス核酸検出を行うことが可能である。

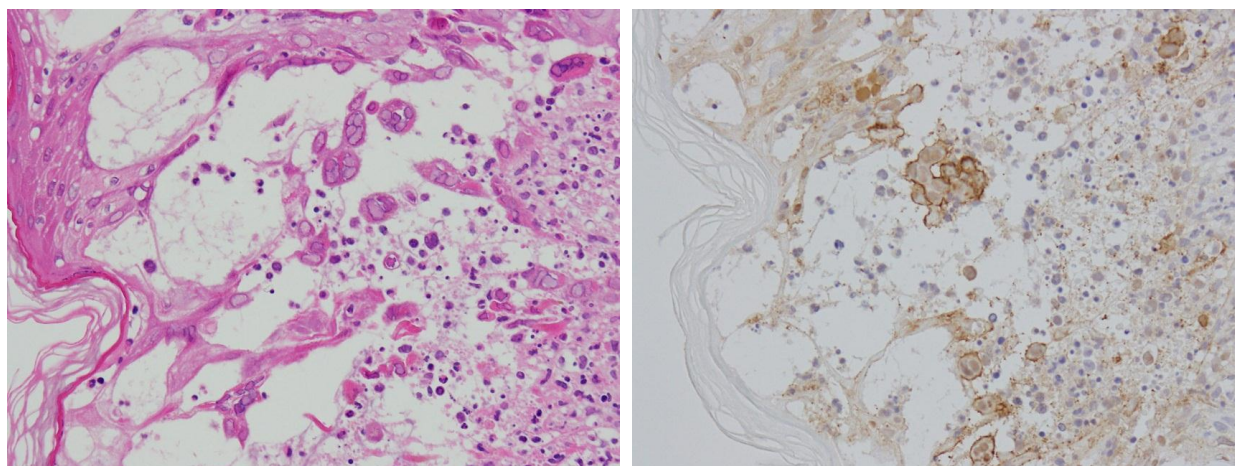


図 3 HSV-1の病理組織学的検索：（左）HE染色。表皮内水疱に核内封入体を持つ感染細胞が多数認められる。（右）抗HSV-1マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学。封入体を持つ細胞、および周辺組織にHSV-1抗原を認める。（国立感染症研究所 感染病理部）

## [2] 検査材料の輸送

HSV はバイオセーフティレベル 2 の病原体で、通常の臨床検体の取り扱いと同じである。病変部から採取した擦過標本は少量の滅菌生食水ないしリン酸緩衝食塩水（PBS）に浸したまま滅菌チューブにいれ、低温で搬送する。スミアも同様である。WHO は UN 容器（3 重包装）を推奨しており、わが国のゆうパックを用いる場合も同様である（WHO: 感染性物質の輸送規則に関するガイダンス。 [http://www.nih.go.jp/niid/docs/guidance\\_transport.pdf](http://www.nih.go.jp/niid/docs/guidance_transport.pdf)）。直ちに検査しない場合は-20°C ないし-80°C で凍結保存するが、後者が望ましい。

## [3] 感染症法に基づく届出基準

定点医療機関において、上記【1】[3]に記した臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から性器ヘルペスウイルス感染症が疑われ、かつ、※に記した臨床症状を認めて性器ヘルペスウイルス感染症患者と診断した場合。明らかに再発であるもの及び血清抗体のみ陽性のものは除外する。

※届出のために必要な臨床症状: 男女ともに、性器や臀部にヘルペス特有な有痛性の 1 から多数の小さい水疱性又は浅い潰瘍性病変を認めるもの

### 【3】検査法

#### [1] ウイルス分離

病変からのウイルス分離同定は感染症診断の基本であり、分子生物学的手法が盛んになった昨今も決してその重要性は失われていない。病変が感染性病原体によることが証明できること、血清型別のみならず抗ウイルス剤への感受性など病原体の性状をさらに詳しく調べることが可能になるためである。VZVはヒト細胞にしか感染しないが、HSVは宿主域が広くマウス等の実験動物にも感染しうる。またVZVはおもに感染細胞内にのみ存在するが、HSVはcell freeウイルスとして細胞外の体液等にも存在する。ウイルスの細胞内一段増殖はHSVでは8時間と早く、病変部から採取した検体を培養細胞に接種すると、多くは翌日に細胞変性効果(cytopathic effect; CPE)が出現し、ウイルスを分離することができる。HSVの分離にはVero細胞を、VZVにはHEL細胞を使うのが原則である。後者の場合、検体内のウイルス量にもよるが、最低1~3回の盲継代が必要であるが、HSVの場合は通常必要がない。分離されたウイルスの同定と型別は、市販のモノクローナル抗体で行うのが一般的となっている。

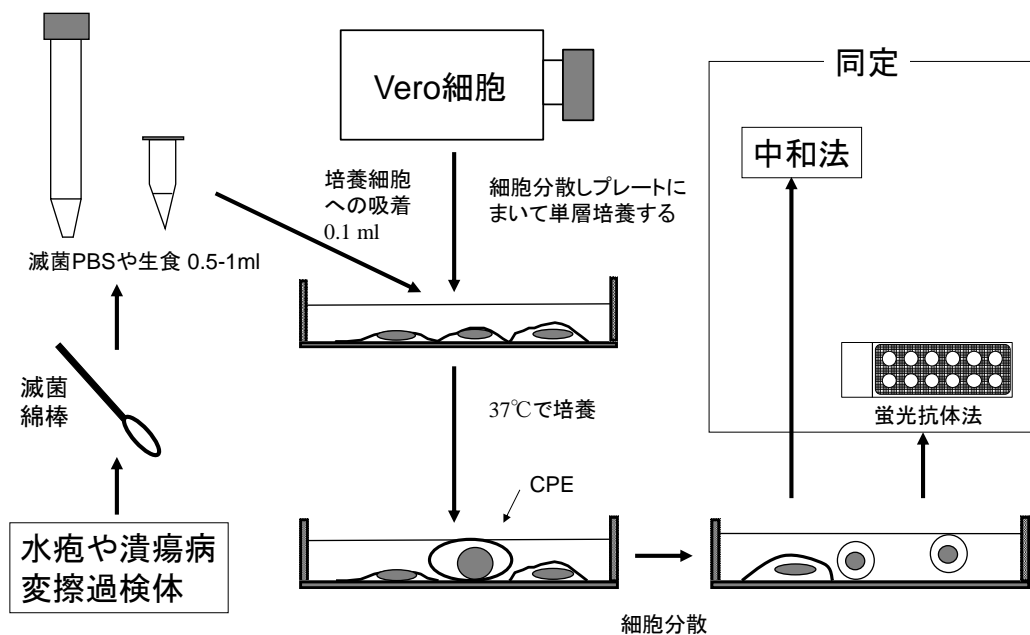


図4 ウイルス分離と同定

#### <必要な器具、試薬>

- ・感受性細胞：Vero細胞が一般的だが、ほかにGMK、RK13ないしPRK(ウサギ腎初代細胞)などが使われる。
- ・培地：Eagle MEMが基本だが、細胞によって適切なものを使用する。  
増殖培地は10% FCS、維持培地は2% FCSとし、ほか抗生物質、必要ならファンギズンを加える。
- ・他試薬：細胞分散用トリプシン、PBS、EDTA
- ・培養器具：細胞増殖用には25-75cm<sup>2</sup>のTフラスコ、分離用には6~24 well plate。
- ・他の器具：スライドガラス (スポットスライド)

#### <方法>

- 検体の前処理：HSVはcell-freeになるので、検体が細菌や真菌に感染している可能性がある場合には、事前に増殖培地あるいは0.1% PVP(ポリビニールピロリドン)液で前処理した0.45 μmのフィルターを通す。擦過検体の場合はそのまま使用することが多い。組織検体の場合は、適量のケイ砂と維持培地を用いて10%乳剤を作製する。
- 培養細胞への接種：6~24 well plateに培養した細胞をPBSで1回洗浄した後、通常100 μL程度の検体を

接種する。検体液を培養細胞に良くなじませてから（ティルディング）、37°C 1～2時間吸着させる。維持培養液を加えて37°Cの炭酸ガスフラン器で培養する。

- c) 観察：翌日から1週間以内に細胞が類円形化する細胞変性効果(CPE)が出現するので、毎日観察する。ウイルス量が多い場合は翌日広範なCPEが出現するが、少ない場合は5～7日程度かかる。CPEがみられないときやCPEの数が少ないときは、1週間後に1:1で盲継代する。細胞の増殖程度によっては細胞数を減らすこともある。
- d) 同定：ある程度の数のCPEが観察されたら、培養細胞表面をPBSで洗浄したのち、トリプシンで細胞分散し、1 ml程度の維持培地を加えて凍結融解を3～5回行い遠心する。上清を分注後保存し、中和法による同定を行う。最近では、モノクローナル抗体による抗原の検出による同定が一般的である。そのためにはトリプシンで分散した後、PBSで一回遠心洗浄した培養細胞の一部を、スライドガラスやスポットスライドに塗抹し、乾燥後、アセトンで10分間固定する（図5）。CPEの出現した培養細胞はPCR法によるゲノムの検出にも使えるので、分散した細胞は目的に応じて分注保存する。

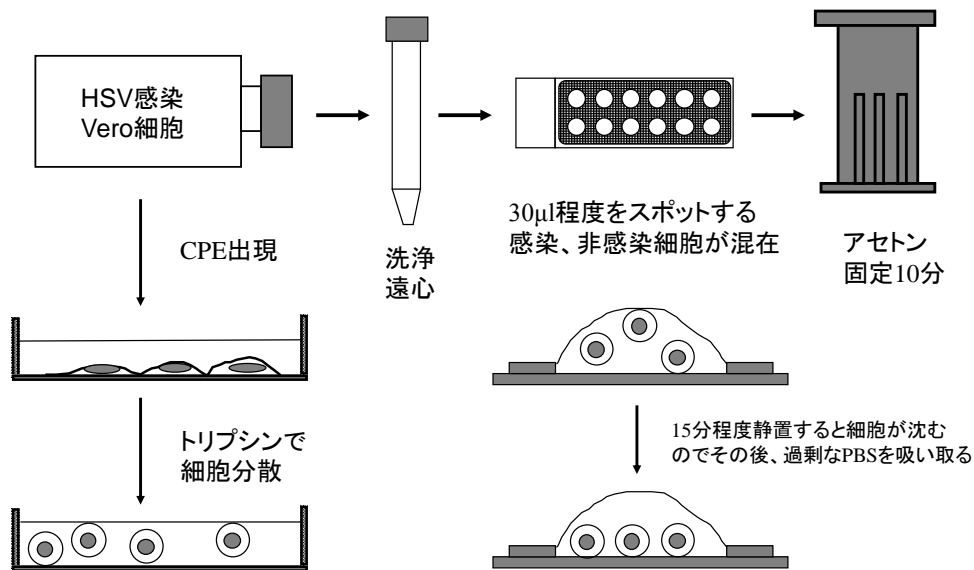


図5 ウイルス分離同定用抗原スライドの作製法

## [2] 抗原検出

病変部擦過標本ないし分離陽性細胞スミア中のHSV抗原を、FITC等の蛍光標識したモノクローナル抗体を用いて検出する。ウイルス被膜を構成する糖タンパク(gDやgG等)に対する抗体の場合は、細胞質内に陽性所見が得られるが、ウイルス核抗原に対する抗体の場合は感染細胞の核内に陽性所見が認められる。HSV同定後に型別が必要となることが多いが、型別可能なモノクローナル抗体は限られているので、事前に陽性対照標本や非感染細胞で確認したうえで使用する。FITCの蛍光色素は通常の蛍光顕微鏡ではアップルグリーンになるので、全体が淡い緑色を示す場合は非特異所見であり、また蛍光が細胞に一致していることが重要な判定基準となる。判定には形態診断の経験が役に立つ。カウンター染色として、1%エバンスブルー/H<sub>2</sub>Oを1 mLの抗体液に50 µLの割合で加えておくと細胞の核が赤色になり判定しやすくなる。なお、商業ラボに型別を含め検査依頼することも可能である。さらに、各型に対する複数のモノクローナル抗体のカクテル及びコントロール用のスライドがキットとなった型別試薬も市販されている。

### <必要な器具、試薬>

- HSV-1 および HSV-2 に対するモノクローナル抗体 (FITC 等でラベルされたもの使いやすい)
- 固定用アセトン、洗浄用 PBS、封入用緩衝グリセリン (0.5M 炭酸重炭酸緩衝液ないし PBS)
- スライドガラス (4穴のスポットスライドが使いやすい)、反応用湿潤箱、染色バットと染色カゴ

<方法>

- a) 細胞スミア（塗抹標本）の固定：標本は十分に乾燥させ、冷アセトンで 10 分間固定する。アセトン固定により感染性を消失させ、また感染細胞の細胞膜を抗体が通過しやすくなる。アセトン固定後はすぐにアセトンが消失し乾燥するので、そのまま抗原抗体反応を行うか、あるいは 25 枚入りプラスチックスライドボックスにいれ、箱をビニールテープで密閉したのち、-20℃ で凍結保存する。この凍結保存スミア標本は 10 年以上使用に耐えるので、陽性ないし陰性対照としても使うことができる。
- b) 抗体の反応：通常は 4 ウェル（VZV を鑑別する必要のない場合は 3 ウェル）の細胞を用意する。つまり HSV-1、HSV-2、VZV の抗体、そして PBS を反応させるからである。PBS は抗体反応の陰性対照として使う。もし陽性対照が用意されていれば、スポットスライド上に同じパターンで抗体をかけるとよい。4 種類の検体細胞が用意できないときは、パップペン等で 4 箇所に分けるとよい。抗体液は適宜 PBS で希釈し 30-50μL 程度を使用する。スライドガラスを湿潤箱にいれ、37℃ で 15 分から 1 時間反応させる。直接法の場合は、PBS で 3 回洗浄したのち、緩衝グリセリンで封入するが、間接法ではつぎに FITC 標識抗マウス IgG 抗体等の二次抗体を同様に反応させ、洗浄してから封入する。
- c) 蛍光顕微鏡による観察：細胞の核あるいは細胞質に一致したアップルグリーンの蛍光を陽性とする。証拠となる写真を撮影しておく（例、図 7）。

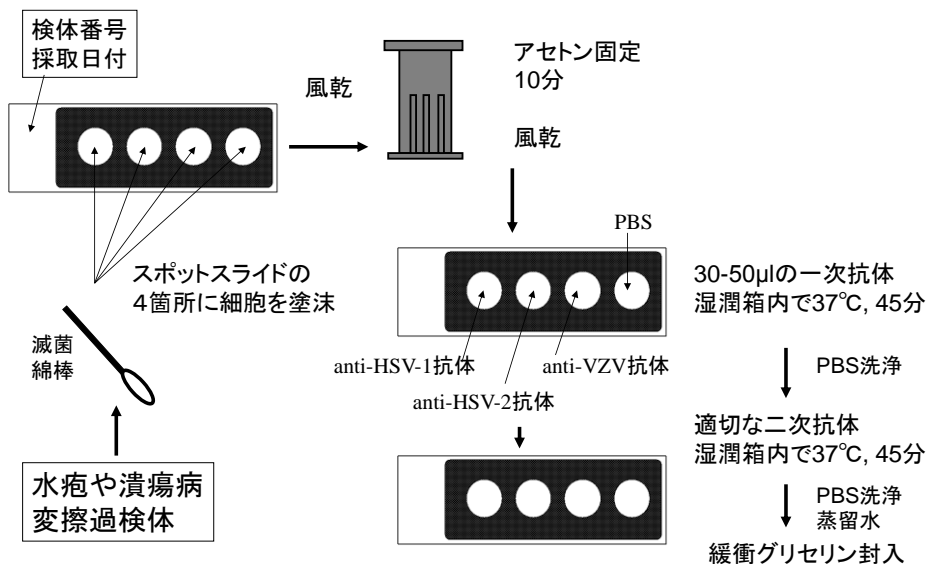


図6 ウイルス抗原検出用擦過スミアの作製法

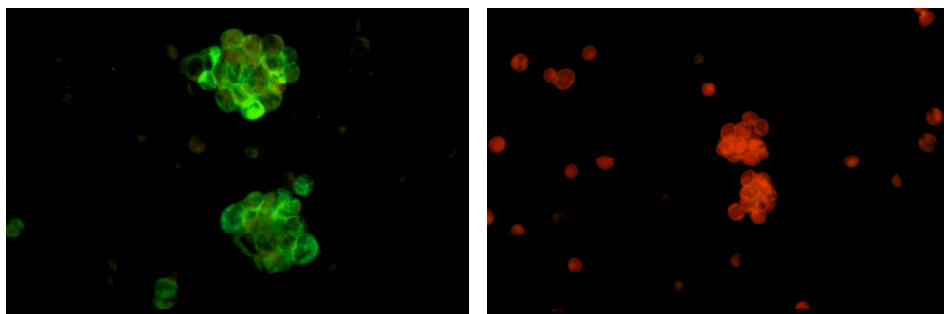


図7 型特異的モノクローナル抗体を用いて免疫蛍光抗体法によるHSVの型同定。

ウイルス分離培養細胞スミア標本では、1型特異的なモノクローナル抗体で陽性（左）だが、（左）2型特異的モノクローナル抗体では陰性（右）。抗体はウイルスの糖タンパクに対するもので、ウイルス抗原は細胞質に陽性である。抗体にはエバンスブルーを加えてあるため、細胞の核が赤色に染まる。



### [3] ウイルス DNA 検出

ウイルス DNA の検出に当っては、最初に組織や体液からの DNA 抽出が必要である。以前は、SDS を含む buffer 中で proteinase K を反応させ検体を可溶化し、蛋白等の PCR 反応阻害物質の除去が必要であるために Phenol/Chloroform/isoamylalcohol 抽出を行い、エタノール沈殿により DNA を回収していた。最近、市販キットにより簡便に DNA 抽出できる。なお、髄液や眼液など少量検体の場合は、5~10 分間の boiling のみでも増幅が可能であるが、その検出効率は良いとはいえない。

コンベンショナル PCR 法、リアルタイム PCR 法、LAMP 法によるウイルス DNA の検出および型別について、種々のプロトコルが公表されている。多くのプライマーおよびプローブ配列が報告されているが、HSV 遺伝子のなかでは、糖蛋白 gB, gC, gG, gD や DNA polymerase, DNA-binding protein をコードする領域を増幅することが多い。これらのウイルス構成蛋白は、塩基配列の変化が比較的少ないという理由による。コンベンショナル PCR 法として発表されているプライマーには HSV-1 と-2 の両者をともに増幅するもの、型特異的に増幅する 2 種があり、型別には制限酵素切断パターンやプローブによる Southern hybridization、ELISA 法を応用したもの、さらに塩基配列の決定で行うものなどがある。以前は型共通プライマーで増幅し、制限酵素切断パターンで型別する方法がもっとも簡便であったが、シーケンサーの普及に伴い増幅産物の塩基配列を直接決定する方法や型別ができるリアルタイム PCR 法が用いられている。

リアルタイム PCR 法は、脳炎やぶどう膜炎において抗ウイルス薬の効果判定や病気のモニタリング等の目的で感染ウイルス量（遺伝子コピー数）を知るために汎用されてきた。増幅特異配列の蛍光強度で定量し、HSV-1 と-2 の型別とともにウイルス量の定量により、診断だけでなく病変の評価や予後判定にも使われる。また、検討対象の病原体として HSV だけでなく他のウイルスないし病原体が原因となる場合も少なくなく、Multiplex PCR として多種のウイルス等の病原体を同時ないし数本に分けて検出する方法も報告されている。

LAMP 法は、臨床現場で用いることができることから簡便である。市販のキットが研究用に販売されていることもあり、このマニュアルでは取り上げていない。詳細は引用文献を参考にされたい。

#### 1) コンベンショナル PCR 法

型共通プライマーで増幅し、制限酵素切断パターンで型別する方法を記載する（表 2）。

#### <方法>

a) PCR mixture の作製：PCR キット付属のバッファーを使う。

5x PCR buffer (ex. 50mM KCl, 10mM Tris HCl(pH 8.4), 1.5mM MgCl)  
200 μM each dNTP  
1 μM each primer  
Taq polymerase 1-4 U

26-100 μL の反応液となるように準備する。検体数分の master mix を作り、PCR チューブに分注する。この作業は毎回特定の場所（部屋あるいはキャビネット）で行う。

b) サンプル DNA: サンプル DNA はおよそ 100 - 500 ng を使う。3 で使った場所と異なる場所でサンプル DNA を PCR チューブに入れる。

c) サーマルサイクラー：機種は不問であるが、増幅設定温度・時間条件を守れるもの。

d) 電気泳動：増幅 DNA を 2-10 μL とり、色素入りのサンプルバッファーで混合したのち、アガロースないしポリアクリルアミドゲルで 1 時間泳動する。100bp DNA マーカーを必ず同時に泳動する。

e) UV 照射により写真撮影する。

f) 制限酵素切断パターンの違いにより型別を行う場合は、増幅サンプルを適量とり、制限酵素とバッファーを加えて 37°C, 1 時間以上反応させ、同様に電気泳動する。その際に未切断増幅検体も同じゲルで電気泳動する。

表2 コンベンショナル PCR 法のプライマー及び反応条件の詳細

1. 型共通プライマー(gB 領域)

文献 : Lakeman et al. J Infect Dis 1995, 171:857

プライマー F GCATCGTCGAGGAGGTGGAC

プライマー R TTGAAGCGGTCCGCGGCGTA

サザンロットプローブ GGCGACTTTGTGTACATGTCCCCGTTTTACGGCTACCGG

増幅条件 : 95°C 45s, 62°C 45s, 72°C 45s (3 s extension), 40 cycles

増幅 DNA 断片のサイズ : 149 bp

検出感度 : 25-18,000 copy/ $\mu$ L

型別 : *Bsr*I 切断 HSV-1(84, 64 bp), HSV-2(non-cut)

酵素切断のコントロール : *Hha*I 切断 HSV-1(128, 20 bp), HSV-2(126, 22 bp)

2. 型共通プライマー(DNA polymerase 領域)

文献 : Kimura et al. J Infect Dis 1991, 164:289; Ando et al. J Med Virol 1993, 41:170

プライマー F CAGTACGGCCCCGAGTTCGTGACCGGG

プライマー R GGCGTAGTAGGCGGGGATGTCCGCG

サザンロットプローブ ATGGTGAACATCGACATGTACGG

増殖条件 : 96°C 1 min, 67°C 2 min, 72°C 3 min, 35 cycles

増幅 DNA 断片のサイズ : 330 bp

検出感度 :  $10^2$ - $10^5$  copy/mL, 0.3 pfu

型別 : *Bg*III 切断 HSV-1(77, 253 bp)、HSV-2(no-cut)

*Xho*I 切断 HSV-1(no-cut)、HSV-2(89, 241 bp)

## 2) リアルタイム PCR 法

プライマー・プローブなど異なる4種類の方法を記載する(表3)。具体的な方法は各文献を参照されたい。

表3 リアルタイム PCR 法のプライマー設定、反応条件

### 1. HSV 型共通検出 (DNA polymerase 領域)

文献: Wada et al. Microbiol Immunol 2009, 53:22

プライマー F ACATCATCAACTTCGACTGG

プライマー R CTCAGGTCCTTCTTCTTGTC

プローブ **FAM-ATGGTGAACATCGACATGTACGG-BHQ1a**

増幅条件: [94 °C 1min, 62 °C 90 s] x 50 cycles

増幅 DNA 断片のサイズ: 271 bp

検出感度: 5 ~ 50 copy/reaction

### 2. HSV 型ごとの増幅・検出(gG 領域)

文献: Pevenstein et al. J Virol 1999, 73:10514-10518

HSV-1 プライマー F CTGTTCCTCGTTCCTCACTGCCT

gG (gG1) プライマー R CAAAAACGATAAGGTGTGGATGAC

プローブ **FAM-CCCTGGACACCCTCTTCGTCGTCAG-TAMRA**

HSV-2 プライマー F CAAGCTCCCGCTAAGGACAT

gG (gG2) プライマー R GGTGCTGATGATAAAGAGGATATCTAGA

プローブ **FAM-ACACATCCCCCTGTTCTGGTTCCTAACG-TAMRA**

増殖条件: [95 °C 15 s, 60°C 1 min] x 55 cycles

検出感度: <10 copy/500 ng DNA

### 3. HSV 型ごとの増幅・multiplex 検出(gG 領域)

文献: 長島真美他. 感染症学雑誌 2007, 81:549-555

HSV-1 プライマー F GGGCCGTGATTTTGTGTTGTC

gG (gG1) プライマー R CCG CCA AGG CAT ATT TGC

プローブ **FAM-TAGTGGGCCTCCATGGG-MGB**

HSV-2 プライマー F GCTGCATTGCGAACGACTAG

gG (gG2) プライマー R CGCCGGAGGTCAAACG

プローブ **VIC-TTT TTC GTG TGC ATC GCG-MGB**

増殖条件: 50°C 2 min, 95°C 10 min, [95°C 1min, 57°C 1 min] x 45 cycles

検出感度: <15 copy/reaction

### 4. HSV 型共通増幅・型特異的検出(gB 領域)

文献: Corey et al. J Med. Virol 2005 76:350-355

共通プライマー F CGCATCAAGACCACCTCCTC

共通プライマー R GCAGCTCGCACCACGCGA

gG1 用プローブ **FAM-TGGCAACGCGGCCAAC-MGB**

gG2 用プローブ **FAM(or VIC)- CGGCGATGCGCCCCAG-MGB**

増幅条件: 50°C 2 min, 95°C 10 min, (95°C 30 s, 60°C 30 s) 40-50cycles

増幅 DNA 断片のサイズ: 114 bp

検出感度: <10 copy/reaction

定量標準: HSV-1 及び HSV-2 gB を含むプラスミド<sup>#</sup>

<sup>#</sup>プラスミドの希釈系列作製に当っては、キャリアとしてサケ精子 DNA を終濃度(1 µg/mL)となるように加え、低コピーでの定量性を保証する。

#### 【4】引用文献

(一般)

- 1) ヘルペスウイルス感染症。 新村 真人、山西 弘一編、中外医学社、1996年
- 2) 瀬川文徳：Mollaret 髄膜炎。 Clin Neurosci 2010, 28:271-273.
- 3) 皆川洋子：アルファ ( $\alpha$ ) ヘルペスウイルス亜科。「戸田新細菌学 第33版」吉田眞一、柳雄介、吉開泰信編、南山堂、2007年
- 4) デンカ生研株式会社：ヘルペス (1・2) F A 試薬「生研」 添付文書

(コンベンショナル PCR)

- 5) Kimura H, Futamura M, Kito H, et al.: Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infection: Frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. J Infect Dis 1991, 164: 289-93.
- 6) Ando Y, Kinura H, Miwata H, et al.: Quantitative analysis of herpes simplex virus DNA in cerebrospinal fluid of children with herpes simplex encephalitis. J Med Virol 1993, 41:170-3.
- 7) Lakeman FD, Whitley RJ.: Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. J Infect Dis 1995, 171: 857-63.

(リアルタイム PCR)

- 8) Pevenstein SR, Williams RK, McChesney D, et al.: Quantitation of latent Varicella-Zoster Virus and Herpes Simplex Virus genomes in human trigeminal ganglia. J Virol 1999, 73:10514-8.
- 9) Wada K, Mizoguchi S, Ito Y, et al.: Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection of herpes simplex virus, human herpesvirus 6, and human herpesvirus 7. Microbiol Immunol 2009, 53:22-9.
- 10) 長島真美、貞升健志、新開敬行、吉田靖子、山田澄夫: 単純ヘルペス 1 型および 2 型ウイルス検査のための Multiplex Real-time PCR 法の開発 感染症学雑誌 2007, 81:549-54.
- 11) Corey L, Huang ML, Selke S, Wald A. Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time taqman PCR assay. J Med Virol. 2005 76:350-5.

(LAMP 法)

- 12) Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, et al.: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol. 2005 43:951-5.
- 13) Kaneko H, Iida T, Aoki K, et al.: Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2005 43:3290-6.

#### 【5】問い合わせ先

ウイルス分離および遺伝子検出は、技術的には感染研及び全国の地方衛生研究所において対応が可能な手技であるが、検査受託対応は個々の機関により異なる。PCR による HSV DNA の検出及び血清抗体検査は、コマーシャルラボラトリー（民間衛生検査所）への依頼が实际的である。

感染研における HSV についての一般的な問い合わせ窓口：ウイルス第一部第四室

感染研における HSV の病理診断についての問い合わせ窓口：感染病理部第一室

#### 【6】執筆者一覧(あいうえお順)

井上 直樹	国立感染症研究所	ウイルス第一部
片野 晴隆	国立感染症研究所	感染病理部
佐多 徹太郎	富山県衛生研究所	
長島 真美	東京都健康安全研究センター	
皆川 洋子	愛知県衛生研究所	