病原体検査マニュアル

突発性発疹

Human herpesvirus 6 (HHV-6)

および Human herpesvirus 7 (HHV-7)

目次

Ⅰ．　突発性発疹の概説
1. 疫学・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
2. 病原体・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5
3. 感染経路・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 6
4. 臨床症状・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
5. HHV-6 および 7 による突発性発疹（図）・・・・・・・・・・・・・・ 10
6. 治療・予防・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

Ⅱ．　HHV-6、HHV-7 の検査に関する注意事項：検体の採取・輸送・保管及び検査の進め方
1. 検査材料の採取・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 12
2. 検査材料の輸送・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
3. 検査の進め方・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14
4. 検査の判定
　1）実験室内診断・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14
　2）感染症法に基づく診断基準・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14
5. 検査模式図・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 16

Ⅲ．　確定診断法
1. 病原体分離および抗原検出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17
2. 抗体検出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 18
　1) 間接蛍光抗体(IFA)法：：HHV-6 variant B 抗原スライドの作成方法 19
　2) 間接蛍光抗体(IFA)法：：HHV-7 抗原スライドの作成方法・・・ 20
　3) IgG 抗体価測定方法（IFA 法）・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21
　4) IgM 抗体価測定方法（IFA 法）・・・・・・・・・・・・・・・・・ 21
　5) 中和(NT)法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
3. DNA の検出・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 22
　1) サンプルの取り扱い・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
　　①　血漿・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23

② 血球・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 23
③ 髄液・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
④ 咽頭ぬぐい液・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24
⑤ 母乳・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
⑥ 肝臓、腸などの組織材料・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
2)PCR・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 25
3)Southern blot hybridization (non RI probe)・・・・・・・・・・・・
30
4)リアルタイム PCR・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32
5) 必要な器具・試薬・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 33

Ⅳ. 引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 37

Ⅴ. 本マニュアルに関する連絡先・・・・・・・・・・・・・・・ 38

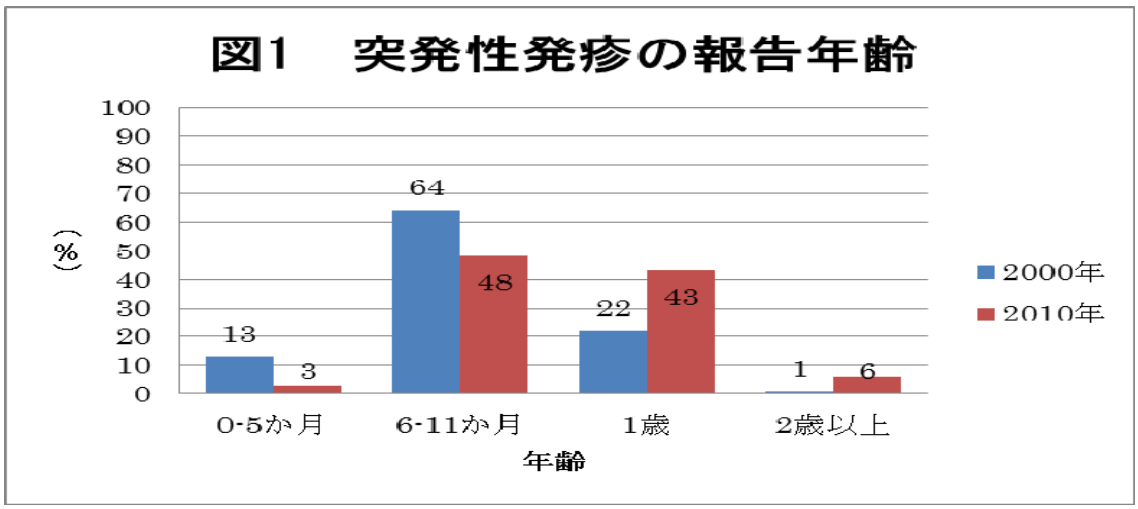
Ⅵ. 執筆者一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 39

Ⅰ． 突発性発疹の概説

１．疫学

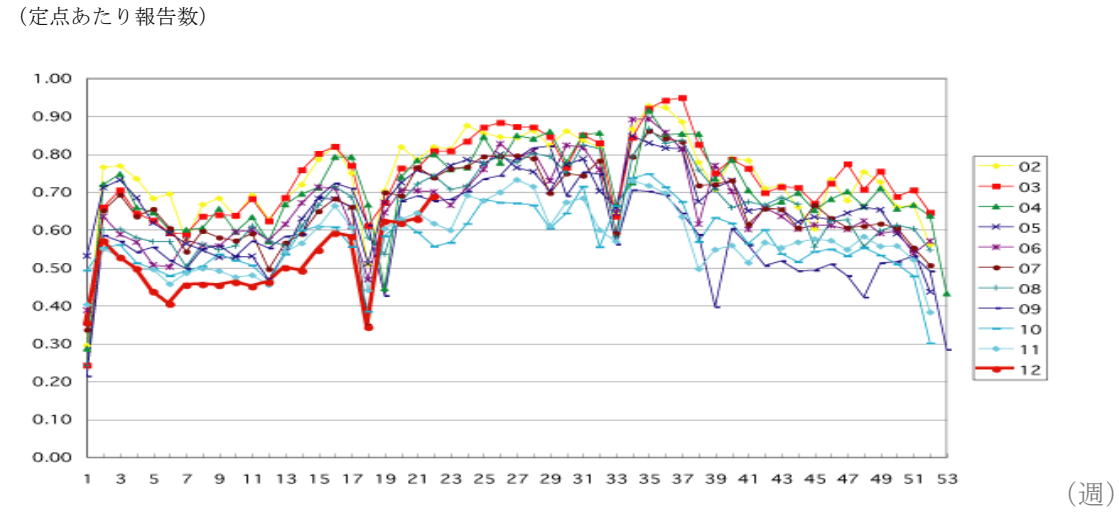
突発性発疹（exanthem subitum, roseola infantum）は、突然の高熱と解熱前後の発疹を特徴とするウイルス感染症で、生まれて初めての高熱であることが多いが、予後は一般に良好である。

感染症発生動向調査によると、従来、報告症例の年齢は 0 歳と 1 歳で 99%を占めており、全体の約 4 分の 3 が 0 歳の報告であったが、近年、発症年齢が 0 歳から 1 歳以上にシフトし、0 歳の報告は全体の約 2 分の 1 である（図 1）



季節性はなく、毎週の定点当たり報告数は一定しており、年次による差異もほとんどない(図 2)。

図 2　突発性発疹の年別週別定点あたり患者報告数(感染症発生動向調査)



本疾患の原因ウイルスであるHHV-6および7の血清疫学調査からは、3歳までに95%以上の乳幼児が抗体陽性となることが判明しており、初感染時に30〜60%が突発性発疹を発症すると言われている。不顕性感染は 20〜40%と報告されており、発熱のみあるいは発疹のみの報告もある。

このような疫学的特徴から、本疾患は過去、感染症発生動向調査のデータ解析の際に基準疾患として利用されてきた。ゴールデンウイークや年末など休日や病院の休業に伴って疾患報告数が変動することはよく知られているが、これを標準化するために、本疾患の発生数がほとんど一定であることを利用して、各疾患の報告数を突発性発疹の報告数で除した値でトレンドを比較しようとした試みがある（平成 6 年感染症サーベイランス事業年報、382-383p)。また、2歳までにほとんどの小児が本疾患に罹患することから、実際の突発性発疹の発生数を推計し、それと本調査の報告数を比較して定点医療機関での疾患捕捉率を算定し、各疾患の人口10万人当たりの罹患率を推定するのに利用されていたこともある（病原微生物検出情報、Vol.9、No.4、2p)。

２．病原体

1910 年に本疾患が記載されて以来長い間病原体は不明であった。HHV-6 は、当初 1986 年に Salahuddin らによってエイズ、リンパ腫、白血病などのリンパ球系疾患患者のリンパ球から発見されたヒトヘルペスウイルスであった。1988年に、山西らがこのウイルスは突発性発疹の原因ウイルスであることを発見した。その後、突発性発疹の中に一部エンテロウイルスを原因とするものが含まれていること、またHHV-6、エンテロウイルスいずれでもない原因不明の突発性発疹が存在することが明らかとなった。

HHV-7 は、1990 年に Frenkel らが健康成人の CD4 陽性 T リンパ球を活性化することによって発見したヒトヘルペスウイルスである。その後、健康成人の唾液から高率に分離されること、血清疫学的調査により幼小児期に初感染することが報告された。また、年齢別抗体陽性率から感染の時期は HHV-6 より HHV-7 の方が少し遅い事が判明している。筆者らは1994年にHHV-7も、その初感染像として突発性発疹を呈することを報告した。また HHV-7 の初感染時には発熱のみや感冒様症状のみという非典型例が認められることも報告した。 HHV-7 による突発性発疹は、HHV-7がHHV-6より遅く感染することから臨床的には二度目の突発性発疹として経験されることが多い。HHV-6あるいは7による突発性発疹を

臨床症状のみで区別することは困難で、ウイルス学的な検索が必要である。

HHV-6、7 の両者とも、ヘルペスウイルス科βヘルペスウイルス亜科に属し、HHV-6 は全長約 161kbp、HHV-7 は約 145kbp であり、いずれも直径 160～200nm のエンベロープをかぶったウイルスである。エンベロープの内側にはテグメント(tegment)を有し、その内側に正 20 面体のヌクレオカプシドをもつ２本鎖 DNA ウイルスである。いずれのウイルスも T リンパ球に親和性があり、CD4 陽性 T リンパ球でよく増殖する。βヘルペスウイルス亜科に属する HHV-6,7 およびサイトメガロウイルス(CMV)に共通の一部の遺伝子の塩基配列について解析した研究では HHV-7 は CMV よりも HHV-6 に近いβヘルペスウイルスであると報告されている。HHV-6 はモノクローナル抗体に対する反応性、血清疫学、DNA 制限酵素切断パターン、DNA シークエンス、培養細胞での増殖性、病原性の差によって variant A と B に分類されており突発性発疹を起こすのは variant B である。一方 variant A では具体的な疾患の関連性は知られていない。HHV-6,7 ともに初感染以降は潜伏感染状態となり、HHV-6 は唾液腺、リンパ節、神経系などに存続しマクロファージ、アストログリア細胞などで持続・潜伏感染を続け、HHV-7 は CD4 陽性 T 細胞に潜伏し、唾液腺の上皮細胞に持続感染して断続的に唾液中に排泄される。HHV-7 の方が唾液中に排泄される量が多く、容易にウイルスも分離されるが、HHV-6 は唾液から DNA は検出されるものの、ウイルス分離は困難である。

３．感染経路

現在のところ、唾液中に排泄されたウイルスが経口的、あるいは経気道的に感染すると考えられているが、なぜ排泄量が多い HHV-7 の方が HHV-6 より後に感染するのかなど、不明な点も多い。母体からの移行抗体が HHV-7 の方が長く残ることがその原因の１つと考えられている。子宮頸管粘液からウイルス DNA が検出されるという報告もあり、周産期における感染も感染経路の一つである可能性がある。一方、母乳については感染経路として否定的である。初感染後の潜伏期間は、1950 年 Kempe らの報告により約 10 日と推定されている。

また、染色体に組み込まれた形で親から子に遺伝的に伝播する chromosomally integrated HHV-6(CIHHV-6)も注目されている。

４．臨床症状

突発性発疹の臨床症状は 38℃以上の発熱が 3 日間ほど続いた後、解熱ととも

に淡紅色～鮮紅色の斑丘疹が体幹を中心に顔面、四肢に数日間出現する。

写真１：解熱後に出現した発疹（頁 8）
写真２：躯幹を中心に出現した淡紅色の紅斑（頁 8）

随伴症状としては、下痢、眼瞼浮腫、大泉門膨隆、リンパ節腫脹などがあげられるが、多くは発熱と発疹のみで経過する。診断については、特徴的な臨床経過、発疹出現によりなされることがほとんどであり、困難ではない。永山斑（病初期口蓋垂の根元の両側に認められる粟粒大の紅色隆起） を見つけることにより、有熱期間中に診断が予測できることもある。

発熱初期に熱性痙攣を合併することがあるが、一般に予後は良好であるとされてきた。しかし、0～14 歳の急性脳炎・脳症の原因として、インフルエンザについで突発性発疹が多く、予後不良の例も報告されている。また、まれに劇症肝炎、血小板減少性紫斑病など重篤な合併症をおこすことがある。

近年の移植医療の普及に伴い、HHV-6 は免疫抑制状態下での再活性化に伴う脳炎や、抗痙攣剤等の投与後に発症する drug induced hypersensitivity syndrome(DIHS)の原因としても注目されている。

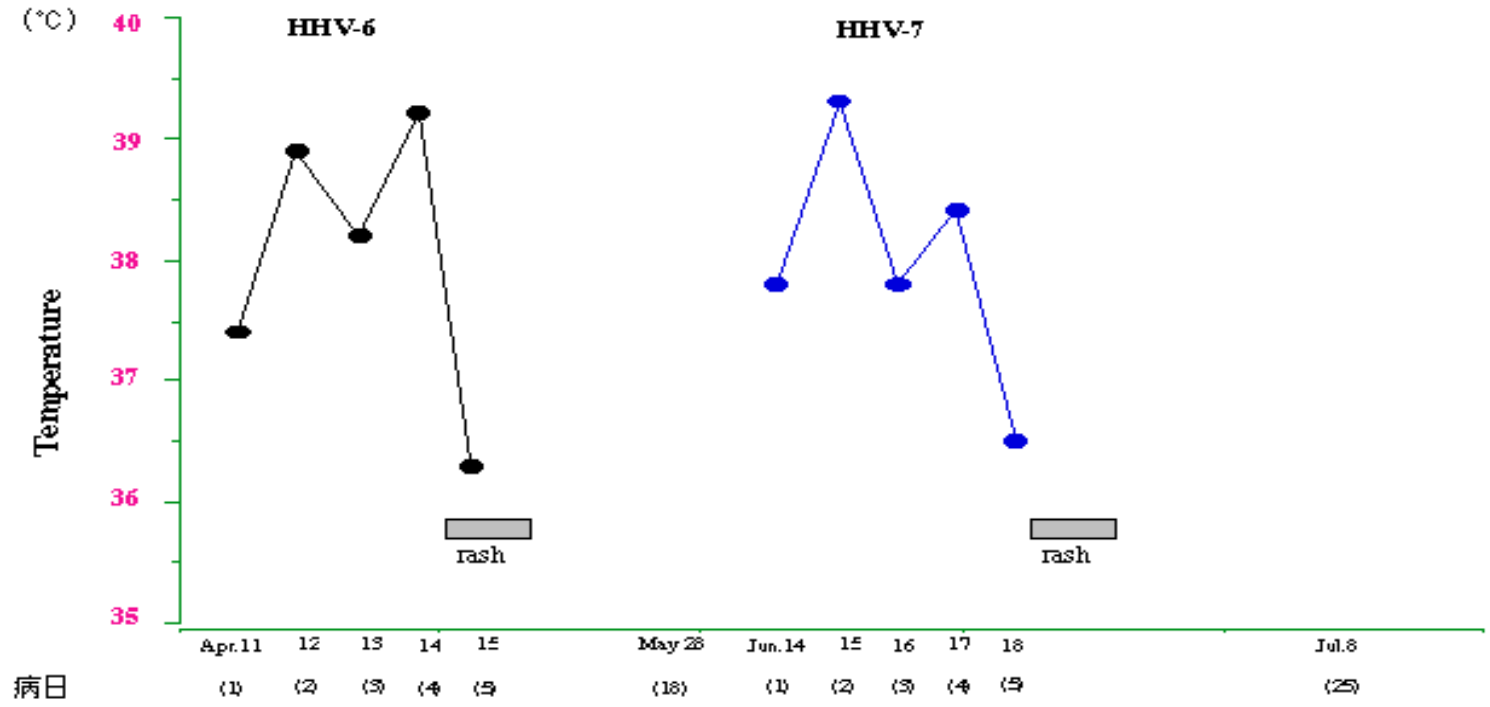
５．HHV-6 および７による突発性発疹

図３

写真１.

写真２.

HHV-6による突発性発疹　　HHV-7による突発性発疹



Virus isolation	(+)HHV-6		(+)HHV-7	
Ab titer (HHV-6)	<10	512C	2048C	512C
Ab titer (HHV-7)	<1C	<1C	160	64C

６．治療・予防

突発性発疹は従来予後良好な疾患であり、実際抗ウイルス療法を考慮しなければならない症例に遭遇することは稀であるが、重篤な合併症を呈した場合、あるいは移植患者やAIDS患者のように免疫抑制状態にある患者では、抗ウイルス剤の使用も検討する価値があると思われる。*In vitro* において、ガンシクロビルおよびホスカルネットにより HHV-6 の増殖が高率に阻害されたとする報告があり、アシクロビルに関しては、高濃度の時にのみ同様の効果が認められている。近年の報告では、ガンシクロビル、ホスカルネットおよびシドフォビアは急性感染症あるいは関連疾患に対して効果が証明されているものの、明確な投与基準等は確立されていない。

突発性発疹に対するワクチンは開発されておらず、現時点では、特異的な予防方法はない。

Ⅱ． HHV-6、HHV-7 の検査に関する一般的注意事項：検体の採取・輸送・保管及び検査の進め方

突発性発疹の診断は通常臨床症状のみで行われることがほとんどであり、重症合併症などをきたした場合や移植後の再活性化による症状が疑われる場合にウイルス学的な診断を求められることが多い。

病原体診断には、①末梢血単核球からのウイルス分離、②急性期のウイルス特異的 IgM 抗体の存在、③急性期と回復期のペア血清で抗体陽転あるいは抗体価４倍以上の有意上昇を証明することが一般的に用いられる。

最近は末梢血中のウイルス DNA 定量によってもその病態がかなり把握できるが、必ず一定量の template から一定量以上のウイルス DNA が証明されなければ病的意義は少ない。あるいは通常ウイルスが存在しない部位（血漿、髄液など）からの DNA 検出が求められる。

単核球から PCR 法で HHV-6 DNA を検出する場合は、10^5 個中 100 コピー以上のウイルス DNA が検出されないと、病的意義はほとんどない。突発性発疹の急性期では単核球 10^5 個中に通常 100～1,000 コピー以上検出される。発熱期では 1,000 コピー以上検出される場合が多い。HHV-7 に関しては健康成人の末梢血単核球から分離されたウイルスであり、単核球から DNA が検出されても病的意義はない。同様に、HHV-7 が唾液あるいは咽頭ぬぐい液から分離されたり DNA が検出されても病的意義はなく、そのヒトが既感染であることを証明するのみである。一方、血漿（必ず遠心して細胞成分を含まない血漿を用いること）20・1 中に HHV-6 あるいは HHV-7 DNA が検出された場合は初感染か再活性化のいずれかの状態であると考えられる。

HHV-6、7 感染症の診断には、上記のように血液からのウイルス分離、PCR 法による血漿中ウイルス DNA の検出、血清抗体価診断などがあるが、現在のところいずれも健康保険適応はない。

1. 検査材料の採取

ウイルス分離で HHV-6,7 感染症を診断するためには、急性期の末梢血を EDTA、クエン酸ナトリウムあるいはヘパリン(DNA 検出には用いないこと)入りの容器に無菌的に凝固しないように採取する。採血量は白血球数が正常の場合全血 2ml あればウイルス分離、DNA 検出、抗体価測定すべて可能である。ここから単核球を分離し、（３）検査方法　１．病原体分離 に従ってウイルス分離を行う。

すみやかに培養を始めた方が分離率は高いが、すぐに単核球成分を分離する時間がない場合は20℃前後で保存し1、2日以内に培養を開始する。

DNA検出でHHV-6,7感染症を診断するためには、PCR法によって細胞成分が含まれていない血漿からのウイルス DNA の証明が必要である。ウイルス分離用に採血された血液から血漿成分を分離し DNA を抽出する。血球成分も採血後すみやかにDNAを抽出するのがベストであるが、時間がない場合は全血を4℃で保存し 3 日以内に処理する。この場合はウイルス分離には用いず DNA 検出のみに用いる。

単核球から DNA を検出する場合は一定の細胞数にあわせて pellet で-80℃に保存するかあるいはすぐにK buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 3mM $MgCl_2$, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 100・g/ml proteinase K)で 56℃ 3 時間あるいは 65℃ over night で処理後-20℃に検査時まで保存する。PCR の際は通常 template として 5×10^4〜1×10^5個あるいは 0.5〜1・g DNA を使用するためそれに応じて保存しておくと便利である。抗凝固剤については、ヘパリンは PCR を阻害するため EDTA 加血を使用する方がよい。通常病院には血算検査用に EDTA 加採血管が常備されているためそれに採血し送付してもらうことが多い。

ウイルス分離や PCR を施行せず抗体価のみの検査の場合は、採血後血清を遠心分離し、検査まで-20℃に凍結保存する。急性期、回復期共に血漿でも検査可能である。

２．検査材料の輸送

ウイルス分離用の抗凝固剤を入れた全血は室温で輸送する。ただし、猛暑の時期は時に輸送車が40℃を超えることがあり、その場合は20℃前後で輸送するよう注意を要する。時に凍結されていたり、氷につめて送られてくることがあるがこの場合ウイルス分離に用いることは不可能である。また、採血は無菌的に行ってもらうよう依頼し、採血後はできるだけすみやかに培養を始める。少なくとも３日以内に培養を始めなければならない。その他、咽頭ぬぐい液や、脳脊髄液などは、検体採取後速やかに4℃で検査施設に輸送をしてもらう。もしそれが困難な場合は一旦その医療施設で-80℃に保存してもらい送付可能な日にドライアイスと共に送付してもらう。4℃で送付された場合はすぐにDNAを抽出するかあるいは少量ずつ分注し-80℃に保存する。

３．検査の進め方

通常急性期の血液検体が送られてくるが一部ウイルス分離、一部 DNA 検出、一部抗体価測定用に使用する。臨床の現場には回復期の血液検体を採取してもらうよう依頼する。

４．検査の判定

１）実験室内診断：突発性発疹は臨床診断のため、ここでは HHV-6,7 感染症の診断方法を記載する。①急性期末梢血単核球からウイルスが分離されること。②急性期と回復期で抗体陽転あるいは４倍以上の有意上昇を確認する（この場合は必ず HHV-6 と 7 を同時に測定する）こと。③急性期にウイルス特異的 IgM 抗体の存在を証明すること。④急性期の血漿（細胞成分を混じない）から PCR 法でウイルス DNA を証明すること。これらの結果の一部またはすべてを組み合わせて総合的に判断する。急性期の末梢血単核球を PCR の template に用いる場合は必ず定量 PCR が必要である。HHV-7 は末梢血単核球の結果を診断に用いてはならない。HHV-6,7 共に原因ウイルスではなかった場合はエンテロウイルス、麻疹、風疹、伝染性紅斑等、発熱・発疹性疾患について鑑別し、ウイルス学的な検討を実施する。エンテロウイルスのウイルス分離には便検体が必須である。エンテロウイルスのマニュアル参照。

２）感染症法に基づく診断基準：突発性発疹は 5 類感染症定点報告疾患であり、全国約 3,000 の小児科定点より毎週年齢階級別発生数が報告されている。報告の基準は以下の通りである。

（１）　定義

乳幼児がヒトヘルペスウイルス６、７型の感染による突然の高熱と解熱前後の発疹を来す疾患である。

（２）　臨床的特徴

乳幼児期、特に６～１８か月の間に罹患することが多い。５歳以上はまれである。

突然、高熱で発症、不機嫌で大泉門の膨隆をみることがある。咽頭部の発赤、特に口蓋垂の両側に強い斑状発赤を認めることがある。軟便若しくは下痢を伴うものが多く、発熱は３～４日持続した後に解熱する。

解熱に前後して小さな紅斑や紅色丘疹が出現し、散在性、時に斑状融合性に分布する。発疹は体幹から始まり上肢、頚部の順に広がるが、顔

面、下肢には少ない。発疹は１～２日で消失する。脳炎を合併することがある。

（３）　届出基準

ア　患者（確定例）

指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、（２）の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から突発性発しんが疑われ、かつ、（４）により、突発性発しん患者と診断した場合には、法第１４条第２項の規定による届出を週単位で、翌週の月曜日に届け出なければならない。

届出の対象は、上記の臨床的特徴に合致するものであるため、届出の対象は５歳未満のみとする。

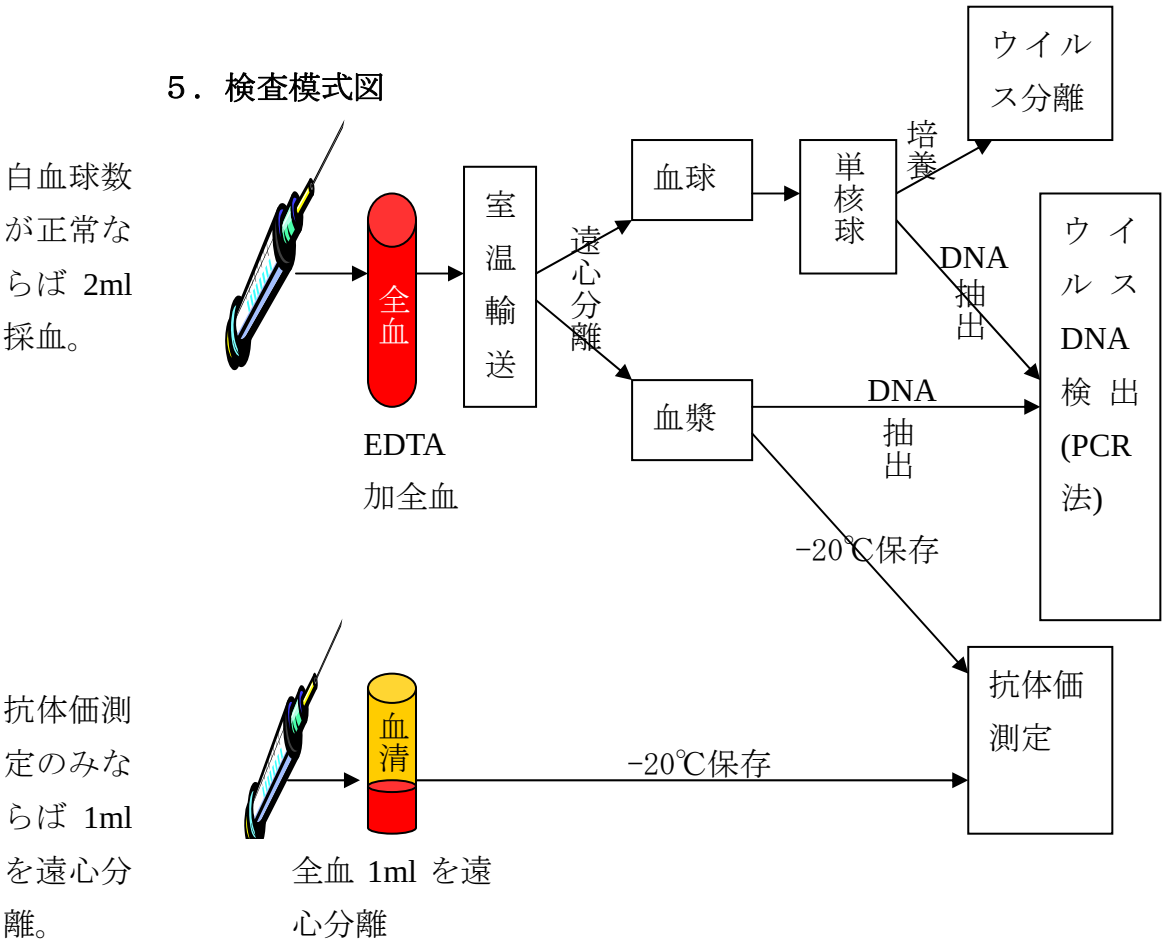
イ　感染症死亡者の死体

指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、（２）の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、突発性発しんが疑われ、かつ、（４）により、突発性発しんにより死亡したと判断した場合には、法第１４条第２項の規定による届出を週単位で、翌週の月曜日に届け出なければならない。

（４）　届出のために必要な臨床症状（２つすべてを満たすもの）

ア　突然に発熱し、２～４日間持続
イ　解熱に前後して体幹部、四肢、顔面の発疹が出現

５．検査模式図


白血球数が正常ならば 2ml 採血。
全血
EDTA 加全血
室温輸送
遠心分離
血球
単核球
培養
ウイルス分離
DNA 抽出
血漿
DNA 抽出
ウイルス DNA 検出 (PCR 法)
−20℃保存
抗体価測定
抗体価測定のみならば 1ml を遠心分離。
血清
全血 1ml を遠心分離
−20℃保存

Ⅲ.　確定診断法

１．病原体分離および抗原検出

ウイルス分離は、通常患児の末梢血単核球を検体とし、末梢血単核球単独あるいは臍帯血単核球との共培養により、IL-2、PHA などリンパ球を活性化する試薬を培養液中に加えて培養する。一般的には、臍帯血単核球との混合培養の方がウイルス分離の効率は高いが、患児末梢血単核球の単独培養でもウイルスは分離可能である。細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)が出現したところで抗 HHV-6 あるいは 7 単クローン抗体を用いて染色し、ウイルスの判別を行う。臍帯血単核球を用いることによって継代可能である。また、HHV-6 variant B は MT-4 細胞、HHV-7 は SUP-T1 細胞により継代可能である。

HHV-6 に特徴的な CPE は、風船状でやや透明な大型細胞である。一方 HHV-7 の CPE は HHV-6 より小型の円形細胞である。突発性発疹急性期の血液の場合は 7～10 日前後で CPE が出現する。CPE が出現しない場合でも 2 週間前後で培養細胞を一部採取し、単クローン抗体を用いて染色し、染色陽性の場合は、臍帯血単核球で継代する事によって高率に CPE の出現が認められる。染色陰性の場合でも、臍帯血単核球を用いて継代し、さらに 2 週間観察を続ける。この時点でも染色陰性の場合はウイルス分離陰性と判定している。

培養液は 3～4 日に一度培養容器の 1/3 程度の培養液を上から取って捨て、新しい培養液を加える方法で行っている。突発性発疹の発熱期に検査が行われればほぼ 100%分離可能であるが、発疹期に至ると分離率は 40%程度に下降し、発疹が消失すると分離されることはほとんどない。発熱期に突発性発疹を疑えば分離は比較的容易である。しかし、発熱のみの時期に突発性発疹を確信できない場合もあり、発疹期での採血が多い。発疹期でもなるべく早い時期の採血が望ましい。

突発性発疹以外にも臓器移植患者やエイズ患者を含む免疫抑制状態下にある患者の末梢血単核球からも HHV-6 あるいは 7 が再活性化時に分離可能である。既感染者の唾液から HHV-7 は高率に分離されるが、HHV-6 は一般的に唾液からのウイルス分離は困難である。このことから 唾液からの HHV-7 の分離に病的意義はない。

～方法～

1. 全血を室温 1,500rpm で 10 分遠心し血漿成分と血球成分を分離する。

2. 血球成分を3倍量のPBS(-)でsuspendし、Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB)上にゆっくり重層し、遠心機をslow accelおよびbrake offにして室温2,000rpmで15分遠心する。
3. 単核球の成分を採取し、PBS(-)10mlにsuspendし、室温1,500rpmで10分遠心する。
4. 上清を除去し、pellet（単核球）をRPMI1640, 10%FBS, PHA(5・g/ml), IL-2(0.1unit)で培養開始。約10^6個/1ml培養液 を目安にする。
5. 培養液は3〜4日に一度培養容器の1/3程度の培養液を上から取って捨て、新しい培養液を加える。
6. 上記に示したHHV-6あるいは7に特異的なCPEを観察する。(HHV-6は風船状でやや透明な大型細胞。HHV-7は6より小型の円形細胞。)
7. 突発性発疹の急性期なら7〜10日でCPEが出現する。
8. CPE の有無にかかわらず約 2 週間で培養細胞の一部を採取し、冷アセトン（-20℃）で15分間固定。
9. 抗HHV-6あるいは7単クローン抗体を用いて蛍光抗体法により抗原の有無を検索する。
10. 染色陽性の場合は、臍帯血単核球で継代する事によって高率にCPEの出現が認められる。この際、培養液はIL-2, PHA共に含まないRPMI1640 with 10%FBSに変えた方が早くCPEが出現する。
11. 染色陰性の場合でも、臍帯血単核球を用いて継代し、更に2週間観察を続ける。
12. 培養開始 4 週間後にウイルス特異的単クローン抗体を用いて再度染色し染色陰性の場合はウイルス分離陰性と判定。

注１）臍帯血単核球が利用できる場合は最初から共培養した方がウイルス分離の効率はよいが臍帯血を手に入れることは困難な場合が多い。
注２）CPEが確認されなくても、臍帯血単核球で盲継代することにより分離されることもある。

２．抗体検出

抗体価の測定は、体内でのウイルスの動態を見るためには不可欠な検査方法である。まず間接蛍光抗体(IFA)法により抗体価を測定し、必要に応じて中和法

を併用している。IFA 法の方が簡便で迅速に結果が得られる点で勝っているが、特異性という点においては中和法の方が勝っている。

IFA 法に用いる 24 穴抗原スポットスライドはあらかじめ大量に作成し、シリカゲル入り容器に入れ、密閉して-20℃ に保存しておく。スライドガラスを１枚ずつハイブリバッグ等に入れシーラーで封じて-20℃に保存する方法もある。

IgM 抗体価を測定する場合は、あらかじめ Protein G sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB)で血清を処理し、IgG を吸着除去した血清を使用しなければならない。2 次抗体として FITC(fluorescein isothiocyanate)ラベルウサギ由来抗ヒト IgM 抗体(Dako, Denmark)を用いることによって測定する。しかし、IgM 抗体検出可能期間は限定されており、初感染の場合は感染後 5～20 日前後での検体が必要である。

診断は急性期のウイルス特異的 IgM 抗体の存在あるいは急性期と回復期のペア血清でウイルス特異的 IgG 抗体の陽転あるいは 4 倍以上の有意上昇を検出する。採血後血清を遠心分離し、検査まで-20℃に凍結保存する。急性期、回復期共に血漿でも検査可能である。

急性期は少なくとも発症後１週間以内、回復期は少なくとも発症後 10 日以上経過してからの検体でないと診断を誤る場合がある。また、抗体価測定の場合 HHV-6 既感染のヒトに HHV-7 が感染した場合 HHV-6 も同時に体内で再活性化しているため HHV-6 の抗体価も有意上昇を示す。必ず抗体価の測定は両者を同時に行わなければ病態の把握を誤る。

～方法～

１）間接蛍光抗体(IFA)法：HHV-6 variant B 抗原スライドの作成方法

1. 臍帯血単核球を分離し、RPMI1640, 10%FBS, PHA(5・g/ml)を約 10^6 個/1ml 培養液を目安に約 5×10^6～1×10^7 個をフィルタートップフラスコで 3 日間 CO_2incubater 内で培養する。
2. 培養した臍帯血単核球を PBS(-)10ml で１回洗浄する（室温 1,500rpm で 10 分遠心)。
3. 上清を除去しこの中に HHV-6 variant B (HST 株)を入れ suspend した後全量をアシストチューブに入れかえる。
4. アシストチューブを 37℃* 2,500rpm で 45 分遠心する。(*我々は 37℃で遠心しているが、室温での検討を実施していないため比較検討のデータ

はない。)

5. 遠心した細胞をRPMI1640, 10%FBSで培養する。
6. CPEが出てきたら抗HHV-6単クローン抗体で染色し確認する。
7. 染色陽性が確認できたら臍帯血単核球に感染させた時と同様の方法（遠心法）でMT-4細胞に感染させる。
8. 感染細胞が約 60～70%程度になったところで細胞を PBS(-)で洗浄し、1・1ずつ24穴スポットスライドにのせる。
9. 充分に風乾させた後、冷アセトン（-20℃）で15分間固定する。
10. 24 穴抗原スポットスライドはあらかじめ大量に作成し、シリカゲル入り容器にスライドガラス保存容器を入れその中に抗原プレートを入れ、密閉して-20℃ に保存。
11. あるいは、スライドガラスをハイブリバッグ等に入れ熱シーラーで1枚ずつ封じて、-20℃に保存する。

注１）感染細胞が100%になると判定がむしろ困難になる。

注２）感染MT-4細胞100%に非感染MT-4細胞を混じる方法でもよい。

注３）細胞の密度に気をつける。少なすぎても多すぎても判定が困難になるため単層一面になるくらいがベストである。

２）間接蛍光抗体(IFA)法：HHV-7抗原スライドの作成方法

1. HHV-7(7-KHR株)はHHV-6と同様に遠心法でSUP-T1細胞に感染させる。
2. 同じく感染細胞が約 60～70%程度になったところで細胞を 1・1 ずつ 24 穴スポットスライドにのせる。
3. 充分に風乾後冷アセトン（-20℃）で 15 分間固定し、抗原プレートとする。

注４）感染SUP-T1細胞100%に非感染SUP-T1細胞を混じる方法でもよい。

4. 24穴抗原スポットスライドはあらかじめ大量に作成し、シリカゲル入り容器にスライドガラス保存容器を入れその中に抗原プレートを入れ、密閉して-20℃ に保存。あるいは、スライドガラスをハイブリバッグ等に

入れ熱シーラーで１枚ずつ封じて、-20℃に保存する。

３）IgG 抗体価測定方法（IFA 法）

1. 2%BSA＋0.02%NaN_3入り PBS(-)で 2 倍段階希釈した患者血清を 12・l ずつ抗原スポットスライド上にのせる。(患者血清 10 倍希釈から始める。)
2. 37℃で 1 時間モイスチャーチャンバーにて反応させる。
3. スライドガラスを PBS(-)で 15 分間洗浄する。途中で一度 PBS(-)を新しいものに交換する。
4. スライドガラスをドライヤーの冷風で充分に乾燥させる。
5. 同じスポットに FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgG 抗体(DAKO, Denmark) 12・l を 2 次抗体としてのせ遮光の上 37℃1 時間モイスチャーチャンバーで反応させる。
6. スライドガラスを PBS(-)で 15 分間洗浄し乾燥させる。1 次抗体の時と同様、洗浄途中で一度新しい PBS(-)に交換する。
7. 無蛍光グリセリン液をスライドガラス上に 2, 3 滴滴下し、空気が入らないようにカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で鏡検する。
8. 蛍光の認められる最大希釈倍数を持って抗体価とする。

注１）IgG 抗体価に関しては必ず抗体価既知の血清をコントロールとして同時に検査し、結果を補正する。結果が１管以内に収まらない場合は再検査する。

４）IgM 抗体価測定方法（IFA 法）

1. 1.5ml の tube に 30・g の Protein G sepharose (Amersham Pharmacia Biotech AB)を良く懸濁させてから入れ、5,000rpm で 30 秒遠心。
2. 上清が残らないように吸引し捨てる。
3. そこに患者血清 10・l と diluent (PBS(-)＋0.1% BSA, 0.02%NaH_3, 0.02% Tween 20) 40・l を混ぜ合わせた計 50・l を入れ良く攪拌したのち、4℃で 1 時間振とう攪拌する。
4. 遠心後上清をサンプルとして使用する（この段階で 5 倍希釈)。
5. IgG 抗体価測定方法と同様に２倍段階希釈し 12・l ずつ抗原スポットスライド上にのせ､37℃で 1 時間モイスチャーチャンバーにて反応させる。

6. スライドガラスをPBS(-)で15分間洗浄する。途中で一度PBS(-)を新しいものに交換する。
7. スライドガラスをドライヤーの冷風で充分に乾燥させる。
8. 同じスポットにFITCラベルウサギ由来抗ヒトIgM抗体(DAKO, Denmark)12・1を2次抗体としてのせ遮光の上37℃1時間モイスチャーチャンバーで反応させる。
9. スライドガラスをPBS(-)で15分間洗浄し乾燥させる。
10. 1次抗体の時と同様、洗浄途中で一度新しいPBS(-)に交換する。
11. 無蛍光グリセリン液をスライドガラス上に2, 3滴滴下し、空気が入らないようにカバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で鏡検する。
12. 蛍光の認められる最大希釈倍数を持って抗体価とする。

５)中和(NT)法

1. 2倍段階希釈した血清を等量のHHV-6あるいは7感染細胞(約200TCID$_{50}$)と混合する。
2. 37℃で1時間CO_2インキュベーターにて反応させる。
3. 2×10^5 個の臍帯血単核球を加えて、5日間RPMI1640, 10%FBSでCO_2インキュベーターにて培養する。
4. 細胞を冷アセトン(-20℃)で固定する。
5. HHV-6あるいは7特異的単クローン抗体を1次抗体とし、2次抗体にFITCラベルヤギ由来抗マウス IgG 抗体を用いて上記の間接蛍光抗体法と同様の方法で染色する。
6. ウイルスが中和された最大希釈倍数を持って抗体価とする。

３．DNAの検出

PCR法によるウイルスDNAの検出は両ウイルスともに初感染後に潜伏感染することから、陽性結果の解釈には注意が必要である。また、迅速にかつ簡便に臨床材料からウイルス DNA を検出する最も有用な方法であるが、感度が優れているが故に、常にコンタミネーションには注意しなければならない。特に、HHV-6、7は普遍的に存在するウイルスであるために、PCR用の材料、試薬類を取り扱うときは必ずマスクを着用し、唾液からのコンタミネーションを防ぐ。また、PCR用の器具材料はすべてディスポーザブルのものを用い、PCR用の材料の取り扱い

と、PCR 後の検体を扱う場所は別々にする。

次に末梢血単核球を材料として PCR を行うときは template に赤血球が混じらないようにすることも重要である。細胞を遠心後沈渣が少しでも赤い場合は必ず溶血操作を行う。その他、唾液・咽頭ぬぐい液や、脳脊髄液などは、凍結融解を繰り返すと偽陰性となることがあるため検査を行う直前に融解する。

潜伏感染部位は単球/マクロファージ、唾液腺などが考えられているため、血液細胞や唾液・咽頭ぬぐい液から DNA が検出されても病的意義は低い。HHV-6 あるいは 7 を当該疾患の原因ウイルスとして考える場合は、細胞中ではなく血漿中にウイルス DNA が検出されるか、当該臓器からウイルスが検出される必要がある。また、血液細胞中から検査する場合、病的意義を論じるためには必ず定量することが必要である。検査に関する一般的注意にも述べたが、HHV-6 の場合、単核球から DNA を検出する場合は単核球 10^5 個相当(約 1・g DNA)中 100 個以上のウイルス DNA が検出されないと病的意義はない。少なくとも 1st PCR で検出されなければならない。通常突発性発疹の急性期では 10^5 個の単核球を template として PCR を行うと DNA は通常 100～1,000copy 以上検出される。回復期ではウイルス量は減少し、同量の単核球中に約 10～100copy のウイルスが検出され、その後数年間検出可能である。HHV-7 に関しては元々健康成人の末梢血単核球から初めて分離されたウイルスであり、単核球から DNA が検出されても全く病的意義はない。

～方法～

１）サンプルの取り扱い

①血漿

1. 血漿 200・l から市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出する。
2. 1/10 量を template DNA として PCR を行った場合、突発性発疹の急性期ならば確実に陽性となる。
3. 初感染時の急性期のみならず免疫抑制状態下などで再活性化した場合でも、血漿から HHV-6 あるいは 7 の DNA が検出可能である。

②血球

1. ウイルス分離の時と同様、末梢血単核球を分離する。
2. 遠心して pellet が少しでも赤い場合は（赤血球が混じている場合は)、溶血 buffer（155mM NH_4Cl-1mM EDTA 10ml を加え 4℃数分間処

理後 1,500rpm, 10 分遠心あるいは 0.2%NaCl 5ml で suspend 後すぐに 1.6%NaCl 5ml を加え 1,500rpm, 10 分遠心）で必ず溶血してから PBS 1ml に suspend し template とする。

3. 細胞数を Burker-Turk 血球計算盤で数える。
4. 1,500rpm 10 分間遠心後、pellet に K buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 3mM $MgCl_2$, 0.45% NP40, 0.45% Tween 20, 100・g/ml proteinase K)を 10^4 個/1・l になるように加え、56℃で 3 時間あるいは 65℃で over night 処理する。
5. 10・l を template DNA としている。あるいは直接市販の DNA 抽出キットを用いて DNA を抽出し、1・g DNA を template として PCR を行う。
6. 必要に応じて、多形核白血球を採取したり、細胞表面マーカーに応じて細胞を選別して採取する。目的に応じた細胞を集め細胞数を数えて 10^4 個/1・l になるように K buffer を入れ、うち 10・l を template DNA としている。

注１） ２）PCR に示した系で PCR を行うと突発性発疹の急性期ならば 1st PCR で band が検出される（copy 数は 100copy 以上)。

注２）HHV-7 は血球から検出されても病的意義はない。

③髄液

1. 市販の DNA 抽出キットを用いて髄液 400・l から DNA を抽出する。
2. 1/10 量を template DNA として PCR を行う。

④咽頭ぬぐい液

1. 咽頭を充分にぬぐった綿棒を医療機関で 1.5ml の生理食塩水（これならば常に医療現場に置いてあるため）につけ保冷して送付してもらう。
2. 綿棒をよく生理食塩水の中で suspend する（ここで綿花がほぐれてくるような柔らかさのものが良い。)。
3. suspend した液を 1.5ml の tube に入れ替え、4℃ 12,000rpm で 10 分間遠心。
4. 沈渣から DNA を抽出する方法もあるが、沈渣に 100・l の生理食塩水を残して上清を捨て、よく攪拌した後 10・l を採取し、98℃10 分間処理のみでも PCR の template として用いることができる。

注１）綿棒はウイルス培養用を用いる。細菌培養用のコーティングされたものや硬い素材のものは適さない。

⑤母乳

1. 母乳を 2,000rpm で 10 分間遠心し、細胞と乳清にわける。
2. 乳清は血漿と同様に 200・l から DNA を抽出し、1/10 量を template DNA とする。
3. 母乳細胞は PBS(-)で 1 回洗浄し、3ml の PBS(-)に混合する。
4. 血球と同様に Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB)を用いた比重遠心法で分離し、血球と同様の処理を行う。

⑥肝臓、腸などの組織材料

1. 組織から市販のキットを用いて DNA を抽出し 0.5～1・g DNA を template として PCR を行う。

２） PCR

1. template DNA を PCR 用の tube に採取し、98℃10 分処理の後、すぐ氷上に置く。
2. 温度が下がったら必ず spin down する。
   注）これをしないとコンタミネーションの原因となる。
3. 反応液を作成し、template DNA を入れた tube に入れる。(ただし、ここでの量は系の総量に応じて変わる。)

反応液（量は表２）

10×buffer (100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$)
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mixture
primers (forward と reverse) (表１)
Taq DNA polymerase
DW

表１

No.	1	2	3	4	5
Virus	HHV-6A & 6B	HHV-7	HHV-6A	HHV-6B	HHV-7
F1	6A	7F3	HHV-F		
F2	6B	7F4	6A-F2	6B-F2	7-F2

R2	6E	7R4	HHV-R
R1	6C	7R3	HHV-R

F1/R1; forward and reverse primer pair for 1st PCR

F2/R2; forward and reverse primer pair for 2nd PCR

primer と probe のシークエンスは表３

表２

HHV-6(表１ No.1)：

10×buffer	4.5・l
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix	0.4・l
primers (各 20・M)	各 2.5・l
Taq DNA polymerase	0.25・l(1.25units)
DW	up to 40・l(1st), 45・l(2nd)

HHV-7(表１ No.2)：

10×buffer	5 ・l
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix	0.4 ・l
primers(各 20・M)	各 1・l
Taq DNA polymerase	0.25・l(1.25units)
DW	up to 40・l(1st), 45・l(2nd)

HHV-6A, 6B, 7(表１ No.3,4,5)：

10×buffer	5 ・l
dNTPs (各 25mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mix	0.4 ・l
primers(各 20・M)	各 1 ・l
Taq DNA polymerase	0.25・l(1.25units)
DW	up to 45・l(1st), 48・l(2nd)

注）表１ No.1 のセットを用いると band の大きさで variant A か

variant B かの判別が可能である。この領域の variant A には deletion が存在するため band の大きさが variant B に比較して短い。

4. tapping で軽く混合し、4℃で spin down し、必要ならばミネラルオイルを重層する。以下の条件で PCR を行う。

表３

No.	Virus	標的遺伝子	用途*	配列（5'→3'） DP; detection probe,CP; capturing probe	増幅産物長 1st PCR(bp)	増幅産物長 2nd PCR(bp)
1	HHV-6	immediate early	6A	TTC TCC AGA TGT GCC AGG GAA ATC C	variant A:325 variant B:553	variant A:195 variant B:423
			6C	CAT CAT TGT TAT CGC TTT CAC TCT C		
			6B	AGT GAC AGA TCT GGG CGG CCC TAA TAA CTT		
			6E	AGG TGC TGA GTG ATC AGT TTC ATA ACC AAA		
			6A-DP	GAA CTC CAT CAG CGG CCT CCA G		
			6B-DP	TAA ATC CAT TAC TGG CCT TGA A		
2	HHV-7	major capsid protein	7F3	AGT TCC AGC ACT GCA ATC G	408	264
			7R3	CAC AAA AGC GTC GCT ATC AA		
			7F4	CGC ATA CAC CAA CCC TAC TG		
			7R4	GAC TCA TTA TGG GGA TCG AC		
			7-DP	CAT TAC TCC AGT GAC TTC CGA TAT TAA TTT		
3	HHV-6A	major capsid protein	HHV-F	ATA ATT GGC AAT GAA CAC CGT T	762	579
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6A-F2	GTG CCT ATT ATA CAG TTC CAG A		
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6A-CP	CCC CCG GTT AGG ACA AAC TTA A		
			6A-DP	AAA TCG CCC CAC ACC CAA GAG		
4	HHV-6B	major capsid protein	HHV-F	ATA ATT GGC AAT GAA CAC CGT T	762	214
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6B-F2	GTC AAC AAG CTA TCT GCG AAG TCG		
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			6B-CP	CTC CGG TCA CGA CAA TAT AC		
			6B-DP	AAA TTG CCC CAT AAC CCC AGA G		
5	HHV-7	major capsid protein	HHV-F	ATA ATT GGC AAT GAA CAC CGT T	762	350
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			7-F2	TAC ACC AAC CCT ACT GTA AAT AGT		
			HHV-R	GAT CCT TTT TGA GAT GCC CAA GG		
			7-CP	CTT TCG GTA AGA TAA ATA AGC AAT CAC AAT		
			7-DP	CAT TAC TCC AGT GAC TTC CGA TAT TAA TTT		

HHV-6(表１ No.1)；

denaturation step	94℃ 1分	10サイクル
annealing step	62℃ 2分	
extension step	72℃ 3 分	
denaturation step	94℃ 1分	10サイクル
annealing step	62℃ 2分	
extension step	72℃ 4 分	
denaturation step	94℃ 1分	10サイクル
annealing step	62℃ 2分	
extension step	72℃ 5 分	

HHV-7(表１ No.2)；

denaturation step	94℃ 1分	30サイクル
annealing step	55℃ 1分	
extension step	72℃ 1分	
extension step	72℃ 10分	1サイクル

HHV-6A, 6B, 7(表１ No.3, 4, 5)；

denaturation step	94℃ 1分	30サイクル
annealing step	55℃ 2分	
extension step	75℃ 1.5分	

5. 2nd PCR を行う場合は、反応液(10×buffer(100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl, 15mM $MgCl_2$)、dNTPs(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) mixture、primers、Taq DNA polymerase、DW (up to 45・l (No.1,2)あるいは 48・l(No.3,4,5))を作成し、そこに 1st PCR 産物を 5・・l(No.1,2)あるいは 2・l(No.3,4,5)入れ、single PCR と同じ温度条件で PCR を行う。
6. Single PCR 産物をとる時は必ず一回 spin down してから tube の蓋を開ける。
7. 2nd PCR 産物 5・・l を 1・・l の 6×loading dye (下記) とともに

2%アガロースゲル（下記）で電気泳動する。

6×loading buffer

0.25% bromophenol blue	in water 室温保存
0.25% xylene cyanol	
15% Ficoll	

注）water で BPB と XC を別々にとかしてから混合する。その後に Ficoll を入れる。

アガロースゲル

アガロース	10g	オートクレーブで溶解する。
TBE	500ml	
エチジウムブロマイド(10mg/ml)	50・l	

注）エチジウムブロマイドはゲルが人肌になってから入れる。

8. UV 照射で band の位置を確認する。
9. band が確認された場合は、1st PCR 産物も同様に電気泳動する。

３）Southern blot hybridization (non RI probe)

1. ゲルを 0.4M の NaOH でナイロンメンブレン(Hybond N+, Amersham)に最低 4 時間アルカリブロッティングする。
2. ゲル穴の位置に鉛筆で印を付け、メンブレンを 4×SSC(0.6M NaCl, 0.06M sodium citrate) 中に約 15 分間入れアルカリ液を取り除いた上で乾燥させる。

   注）この状態でサザンブロットハイブリダイゼーションを行うまでしばらく室温で保管できる。
3. ハイブリバッグにプレハイブリダイゼーションバッファー（下記）をメンブレンの面積約 10cm^2 に対して 1ml 入れ、熱シーラーでシールした後、50℃で 15 分振とうする。

プレハイブリダイゼーションバッファー

SCC	5×
BSA fraction-V	0.5%
ポリビニルピロリドン	0.5%

SDS	1%

4. メンブレンの面積約 10cm^2 に対して 1ml のハイブリダイゼーションバッファー(下記)に ALP ラベルしたインナープローブ（100ng/ml シークエンスは後述）を入れて混合する。

ハイブリダイゼーションバッファー　（プレハイブリダイゼーションバッファーに以下の試薬を加える。）

$MgCl_2$	10mM
$ZnCl_2$	1mM
NaH_3	0.1%

5. プレハイブリダイゼーションバッファーを捨て、プローブを入れたハイブリダイゼーションバッファーを入れ、気泡が入らないように熱シーラーでシールした後、50℃で 15 分振とうする。
6. メンブレンを洗浄液 1（下記）に入れ、50℃で 10 分間ゆっくり振とうしながら洗浄する。

洗浄液 1

2×SCC
1%SDS

7. 洗浄液 2（下記）にメンブレンをうつし、室温で 10 分間ゆっくり振とうしながら洗浄する。

洗浄液２

1×SCC
0.5% Triton-X

8. 洗浄液 2 を捨て、再びメンブレンをハイブリバッグに入れ発色液(下記)を入れ熱シーラーでシールした後、遮光して室温で 30 分反応させる。

発色液

Tris-HCl	0.3M	pH 9.8
NaCl	0.1M	
$MgCl_2$	50mM	
NBT (nitroblue tetrazolium：70% ジメチルホルムアミドで溶解)	0.33mg/ml	
BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate：100% ジメチルホルムアミドで溶解)	0.17mg/ml	

9. 30 分で発色液を捨てメンブレンを H_2O で洗浄する。

４） リアルタイム PCR

反応液組成は HHV6 及び HHV7 で共通

① 反応液(全量 25μl/well)

H_2O	6.175μl
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied)	12.5μl
Sonicated salmon sperm DNA(100μg/ml)	0.5μl
プライマー(25μM each)	0.2μl
プローブ (10μM)	0.625μl
DNA サンプルもしくは定量標準	5.0μl

② コピー数スタンダード: 精製ゲノム DNA もしくは標的となる遺伝子領域を含んだプラスミド (感染研ウイルス 1 部より供給可能)

<u>HHV6 用プライマー・プローブ［文献 14］</u>

下記のプライマー・プローブセットは、HHV-6 UL67 遺伝子領域を標的とし、HHV-6A 及び 6B の両型に用いることができるが、標準としている HHV6 のプラスミドは B 型のものである。なお、かっこ内に記したプライマー・プローブの位置情報は、Genbank AF157706 に基づく。

③ HHV6 用プライマー

TAQ6E 5’-CAAAGCCAAATTATCCAGAGCG-3’ (104040.. 104019)

TAQ6B 5’-CGCTAGGTTGAGAATGATCGA-3’ (103908.. 103928)

④ HHV6 用プローブ

FAM-TTGGCGAAGAGCTAAC-MGB-3’　　(103990.. 103966)

⑤ サイクル条件

50℃ 2 分、95℃　10 分　　1 回

95℃　30 秒、58℃　1 分　　40～45 サイクル

HHV7 用プライマー・プローブ［文献 15］

下記のプライマー・プローブセットは、HHV-7 UL100 遺伝子領域を標的とする。かっこ内に記したプライマー・プローブの位置情報は、Genbank AF037218 に基づく。

⑥ HHV７用プライマー

TAQ7F　5’- ATGTACCAATACGGTCCCACTTG-3’　(142953.. 142931)

TAQ7R 5’- AGAGCTTGCGTTGTGCATGTT-3’　　(148254.. 148274)

⑦ HHV７用プローブ

FAM-CACGGCAATAACTCTAG-MGB-3’　　(142920.. 142904)

⑧ サイクル条件

50℃ 2 分、95℃　10 分　　1 回

95℃　30 秒、60℃　1 分　　40～45 サイクル

５）必要な器具・試薬（試薬の型番等は各自でお調べ下さい。）

試薬：

１）Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB)

２）PBS(-)

３）0.4%トリパンブルー液 (GIBCO Invitrogen Corporation)

４）RPMI 1640 (ニッスイ)

５）7.5%Sodium Bicarbonate solution (大日本製薬)

６）FBS(fetal bovine serum) (SANKO JUNYAKU CO., LTD.,TOKYO)

７）IL-2 (GIBCO BRL)

８）PHA-M (Boehrringer Mannheim Biochemica)

９）アセトン(Wako)

１０)抗 HHV-6 および 7 単クローン抗体(OHV-1:文献 11、KR-4)

１１）FITC(fluorescein isothiocyanate)ラベルヤギ由来抗

マウス

IgG 抗体（TAGO）

１２）無蛍光グリセリン液（Molecular Probes, Inc.）

１３）シリカゲル(Wako)

１４）Protein G sepharose（Amersham Pharmacia Biotech AB）

１５）FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgM 抗体(Dako, TAGO)

１６）FITC ラベルウサギ由来抗ヒト IgG 抗体(Dako, TAGO)

１７）BSA（Bovine serum albumin fraction-V）（Sigma）

１８）Tween 20（WAKO）

１９）血漿からおよび組織材料からの DNA 抽出キット

(Wako,Quiagen)

２０）精製水

２１）溶血 buffer(155mM NH_4Cl-1mM EDTA あるいは 0.2%

NaCl と 1.6%NaCl)

２２）K buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH8.3, 3mM $MgCl_2$,

0.45% NP40,0.45% Tween 20, 100・g/ml proteinase K)

２３）生理食塩水

２４）PCR 用 10×buffer（100mM Tris-HCl(pH8.3), 500mM KCl,

15mM $MgCl_2$）（TAKARA）

２５）dNTPs(各 25mM)（各 dATP, dTTP, dCTP, dGTP）（TOYOBO）

２６）PCR 用 primers（表１、表３）

２７）Taq DNA polymerase（TAKARA）

２８）ミネラルオイル(Sigma)

２９）loading dye（6×buffer: 0.25% bromophenol blue, 0.25%

xylene cyanol , 15% Ficoll in water; water で BPB と XC を

別々にとかしてから混合する。その後に Ficoll を入れる。

室温保存)

３０）アガロース(「LO3」TAKARA)

３１）エチジウムブロマイド(10mg/ml)（ニッポンジーン）

３２）0.4M NaOH

３３）4×SSC(0.6M NaCl, 0.06M sodium citrate)

３４）プレハイブリダイゼーションバッファー（5×SSC, 0.5% BSA fraction-V, 0.5%ポリビニルピロリドン、1% SDS)

３５）ハイブリダイゼーションバッファー(プレハイブリダイゼーションバッファー＋10mM $MgCl_2$, 1mM $ZnCl_2$, 0.1% NaH_3)

３６）ALP ラベルしたインナープローブ（100ng/ml シークエンスは表３）

３７）洗浄液１（2×SCC, 1%SDS)

３８）洗浄液２（1×SCC、0.5% Triton-X)

３９）発色液(0.3M Tris-HCl, 0.1M NaCl, 50mM $MgCl_2$)
【pH9.8 】

４０）NBT（nitroblue tetrazolium：70% ジメチルホルムアミド
で溶解）(Promega)

４１)BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate:100% ジメ
チルホルムアミドで溶解）（Promega)

４２）TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied)

４３）Sonicated salmon sperm DNA

４４）TaqMan プローブ

細胞：　１）臍帯血単核球
２）MT-4 細胞
３）SUP-T1 細胞

virus：　１）HHV-6 variant B(HST 株)
２）HHV-7(7-KHR 株)

器具、設備：　１）P2 実験室
２）クリーンベンチ（HITACHI, SHOWA, SANYO)
３）オートクレーブ（TOMY)
４）遠心機（slow accel ,brake off, 37℃が使用可能な機械；15ml、

50ml およびアシストチューブ(SARSTEDT)（感染、継代用）遠心用）(TOMY)

５）卓上冷却遠心機（swing rotor；1.5ml の tube 遠心用）(SAKUMA)

６）吸引器、吸引瓶

７）37℃ CO_2インキュベーター(TABAI ESPEC CORP.)

８）倒立顕微鏡（OLYMPUS)

９）蛍光顕微鏡(OLYMPUS)

１０）thermal cycler（Applied Biosystems)

１１）shaker（室温用および恒温装置付き）（レノバサイエンス株)

１２）shaker 付き water bath（TAITEC, YAMATO)

１３）ドライヤー

１４）-20℃冷凍庫、-80℃冷凍庫(SANYO)

１５）ポリシーラー（富士インパルス)

１６）15ml, 50ml(Corning), 1.5ml(Treff), 0.5ml(Robbins), アシスト tube（SARSTEDT)

１７）ピペット（パスツール、2ml, 5ml, 10ml, 20ml）(PCR 用はプラスチックのディスポーザブルを使用)

１８）ピペッターあるいはゴム球

１９）Burker-Turk 血球計算盤（Erma 販売)

２０）細胞カウンター

２１）Burker-Turk 血球計算盤用カバーガラス(0.4mm)

２２）25cm^2、75cm^{2}フラスコ(FALCON)

２３）96 穴平底滅菌プレート,96 穴 U 底プレート(NUNC)

２４）ピペットマン(P-2, P-20, P-200, P-1000)

２５）２４穴スポットスライド(24 WELL 4MM HTCSUPER CURED(R) AUTOCLAVABLE BLUE)（CEL-LINE/ERIE SCIENTIFIC CO.)

２６）スポットスライド用無蛍光カバーガラス(MATSUNAMI

24×60mm)

２７）スライドガラスホルダー

２８）ガラスつぼ（アセトン用およびPBS用）

２９）モイスチャーチャンバー

３０）スライド保存箱

３１）プラスチックタッパー

３２）ハイブリバッグ(コスモバイオ)

３３）マスク、手袋(SAFESKIN Corporation)

３４）吸光度計

３５）UV照射撮影装置(ULTRA LUM Inc.)

３６）voltex mixer(Scientific Industries, Inc.)

３７）ウイルス培養用綿棒

３８）電気泳動装置(Mupid)

３９）ゲル板、コーム

４０）ブロッティング台

４１）ベノジェクトII真空採血管　EDTA-2Na入り

４２）スターラー（アサヒ理化製作所）

４３）血清保存用チューブ（住友ベークライト株）

４４）Whatman 3MM Paper

４５）リアルタイムPCR装置

Ⅳ.　引用文献

1. Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, et al. Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. Science. 31; 234(4776): 596-601,1986
2. Frenkel N, Schirmer EC, Wyatt LS, et al. Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells. Proc.Natl. Acad. Sci. USA. 87: 748-752, 1990
3. Yamanishi K, Okuno T, Shiraki, et al. Identification of human herpesvirus 6 as a causal agent for exanthem subitum. Lancet i: 1065-7, 1988
4. Tanaka K, Kondo T, Torigoe S, et al. Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthem subitum). J pediatr. 125: 1-5, 1994

5. Yamamoto T, Mukai T, Kondo K, Yamanishi K. Variation of DNA sequence in immediate-early gene of human herpesvirus 6 and variant identification by PCR. J Clin Microbiol. 32:473-6, 1994
6. Miyoshi H, Tanaka-Taya K, Hara J, et al. Inverse relationship between human herpesvirus-6 and -7 detection after allogeneic and autologous stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant. 27:1065-70, 2001
7. Ozaki Y, Tajiri H, Tanaka-Taya K, Mushiake S, Kimoto A, Yamanishi K, Okada S. Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. J Clin Microbiol. 39:2173-7, 2001
8. Tanaka-Taya K, Kondo T, Nakagawa N, et al. Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. J Med Virol. 60:284-9, 2000
9. Fujisaki H, Tanaka-Taya K, Tanabe H, Hara T, Miyoshi H, Okada S, Yamanishi K. Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children. J Med Virol. 56:275-9, 1998
10. Tanaka-Taya K, Kondo T, Mukai T, et al. Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. J Med Virol. 48: 88-94, 1996
11. Okuno T, Shao H, Asada H, Shiraki K, Takahashi M, Yamanishi K. Analysis of human herpesvirus 6 glycoproteins recognized by monoclonal antibody OHV1. J Gen Virol. 73: 443-7, 1992
12. Torigoe S, Kumamoto T, Koide W, et al. Clinical manifestations associated with human herpesvirus 7 infection. Arch Dis Child. 72: 518-519, 1995
13. Kondo K, Nagafuji H, Hata A, et al. Association of human herpesvirus 6 infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions. J Infect Dis. 167: 1197-1200, 1993
14. Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N, Ishibashi K, Fujieda K, Inoue N, Omori K. Etiology of severe sensorineural hearing loss in

children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. J Infect Dis 195: 782-788, 2007.
15. Fernandez C, Boutolleau D, Manichanh C, Mangeney N, Agut H, Gautheret-Dejean A. Quantitation of HHV-7 genome by real-time polymerase chain reaction assay using MGB probe technology. J Virol Methods 106: 11-16, 2002.

V. 本マニュアルに関する連絡先

国立感染症研究所　感染症情報センター　　多屋　馨子
〒162-8640　東京都新宿区戸山 1-23-1
Tel ： 03-5285-1111(内線 2536)
FAX ： 03-5285-1129
e-mail ： ktaya@nih.go.jp

VI. 執筆者一覧

国立感染症研究所　感染症情報センター　　多屋　馨子
国立感染症研究所　ウイルス第一部　　井上　直樹