

まで一. 川崎市産科婦人科医会研究会,
2003.11.27 川崎

12. 野口靖之, 岡本俊充, 野口昌良, 他:産
婦人科におけるクラミジア・淋菌同時検出試薬
の臨床的評価. 日本性感染症学会第 16 回学
術大会, 2003.12.6 長野

13. 藤田 将, 野口靖之, 野口昌良:抗菌ペ
プチドであるMMP16の *Chlamydia trachomatis*
に対する抗菌効果の研究. 日本性感染症学
会第 16 回学術大会, 2003.12.6 長野

14. 野口昌良:[ランチョンセミナー]激増する
若年女性のクラミジア感染症にどう対処す
るか? 日本性感染症学会第 16 回学術大会,
2003.12.7 長野

厚生労働科学研究

「性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究班」

主任研究者 小野寺昭一（東京慈恵会医科大学泌尿器科）

研究報告書

男子淋菌性尿道炎由来淋菌に対する各種抗菌薬の感受性

－1999年～2003年分離株の比較－

研究要旨

わが国において淋菌感染症は AIDS ショックの影響で、1992 年以降減少傾向が続いていたが、1996 年頃より増加傾向に転じ、現在著しく増加している。それに伴い、耐性淋菌の増加が問題となってきた。そこで我々は、1999 年より 2003 年までに東京慈恵会医科大学付属病院ならびに首都圏の関連病院にて検出された、男子淋菌性尿道炎患者由来の淋菌臨床分離株の各種薬剤に対する感受性を調査し、その動向を確認してきた。その結果、第一選択薬のうち SPCM の感受性には変化が認められなかったが、セフェム系薬では MIC90 に変化は認められなかったものの、分布が年々耐性側にシフトしており、耐性化が進行していることが示唆された。今後、淋菌感染症の治療の幅が狭まることが予想される。

研究協力者：

遠藤勝久 JR 東京総合病院泌尿器科部長

清田 浩 東京慈恵会医科大学泌尿器科助教授

A. 目的

1999 年より、東京慈恵会医科大学付属病院ならびに首都圏の関連病院にて検出された、男子淋菌性尿道炎患者由来の淋菌臨床分離株の各種薬剤に対する感受性を調査し、その動向を確認してきた。今回、さらに 2003 年に分離された臨床分離株を追加し、その感受性を調査して、1999 年からの動向を確認した。

B. 対象・方法

東京慈恵会医科大学付属病院ならびに首都圏の関連病院を受診した男子淋菌性尿道炎患者由来の *Neisseria gonorrhoeae* 計

180 株（1999 年：41 株、2000 年：57 株、2001 年：24 株、2003 年：58 株）を対象とした。

β -lactamase 活性はニトロセフィン法を用いて測定し、CFIX、CFTM、CTRX、CDZM、SPCM、LVFX、PCG に対する感受性を NCCLs (M100-S9) に準じて測定した。

各薬剤に対する感受性率では、それぞれの薬剤の break point を CFIX ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$)、CFTM ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$)、CTRX ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$)、CDZM ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$)、SPCM ($\leq 32 \mu\text{g/ml}$)、LVFX ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$) とした。

C. 結果

β -lactamase 産生菌は 1999 年に 1 株、2003 年に 3 株認められたのみで、増加傾向は認められなかった。

1999 年、2000 年、2001 年、2003 年の主な薬剤の MIC₉₀ 値は、CFIX がそれぞれ 0.03、0.25、0.25、0.25 μ g/ml、CTRX が 0.015、0.06、0.03、0.06 μ g/ml、CDZM が 0.06、0.06、0.06、0.12 μ g/ml、SPCM が 16、4、 >8 、16 μ g/ml、LVFX が 8、4、 >8 、8 μ g/ml であり、2000 年以降の大きな変化は認められなかった。

各薬剤に対する感受性率では、図 3、図 6 および図 9 に示すように、CFIX、CTRX、CDZM および SPCM では 2003 年も 95% 以上であり、変化は認められなかったが、CFTM および LVFX では有意に低下した。

感受性分布を見ると、図 1 に示すように CFIX では 2001 年、2003 年にそれぞれ 0.12、0.25 μ g/ml に新たなピークが出現し、累積分布でも 2001 年以降、右へのシフトが認められた。また図 4、図 5 に示すように、CTRX、CDZM の累積分布でも右へのシフトが認められた。図 8 に示すように LVFX の感受性分布では 1999 年に 0.008 と 0.5 μ g/ml に感受性のピークを認めたのに対し、2003 年は 0.008 と 4 μ g/ml 前後にピークを認め、累積分布でも右へのシフトがさらに進行していた。一方、図 7 に示すように SPCM の感受性分布では、2000 年以降大きな変化は認められなかった。

今回さらに計 180 株の臨床分離株の中で、CFIX に対する MIC が ≥ 0.5 の株が 10 株認められ、この遺伝子パターンを Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) により解析した。その結果、A~D の 4 パターンが認めら

れ、このうち 7 株 (1999 年: 2 株、2000 年: 3 株、2003 年: 2 株) がパターン A であった。

D. 考察

淋菌治療の第一選択薬である SPCM の感受性には変化は認められなかったが、セフェム系薬の感受性は MIC₉₀ に変化は認められないものの、分布が年々耐性側にシフトしていた。さらに経口セフェムである CFIX に対し、MIC が ≥ 0.5 の株も認められるようになり、第一選択薬としてのセフェム系薬の耐性化は今後さらに進むことが予想され、淋菌感染症に対する治療の幅が、今後さらに狭まっていく可能性が示唆された。CFIX に対する MIC が ≥ 0.5 の株の PFGE タイプには 4 パターンが認められた。このうち A パターンが 10 株中 7 株に認められ、東京 23 区および横浜地区の広範囲に分布していたが、タイプと薬剤感受性には相関性が認められなかった。今後は薬剤耐性淋菌の分布状況を把握する上で、薬剤耐性株の分布率と遺伝子パターンの解析を進めていくことが重要であると考えられる。

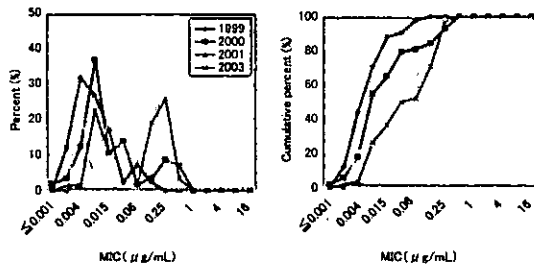
E. 結論

- ① 淋菌治療の第一選択薬であるセフェム系薬の感受性は、MIC₉₀ に変化は見られないものの、分布が耐性側にシフトしており、経口セフェム耐性菌も認められるようになった。
- ② SPCM の感受性には変化は認められなかった。
- ③ キノロン耐性はさらに進行していた。
- ④ 今後、淋菌感染症に対する治療の幅がさらに狭くなる可能性が示唆された。

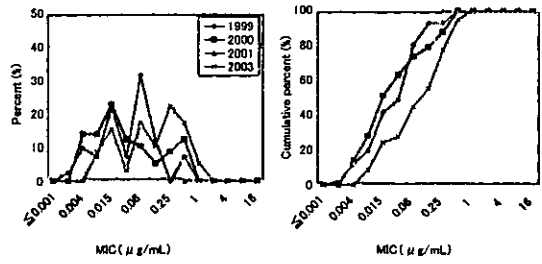
F. 発表

発表 [口頭]

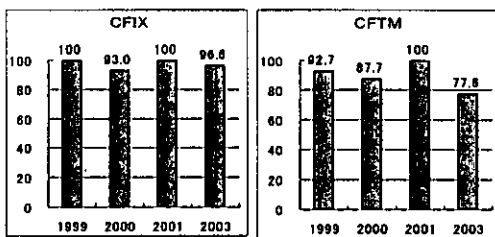
(図1) Distribution of MIC of CFIX



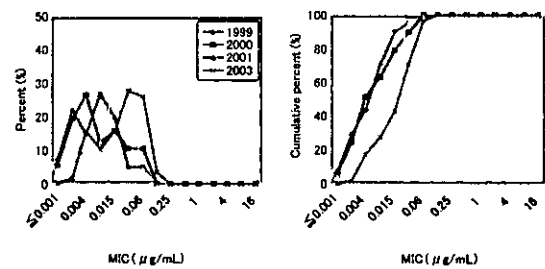
(図2) Distribution of MIC of CFTM



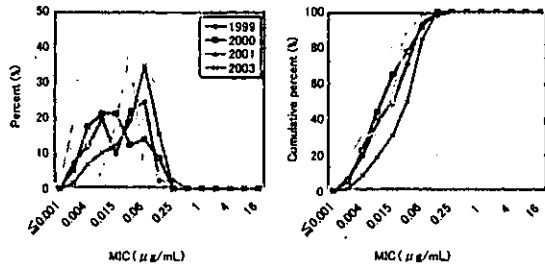
(図3) 各薬剤に対する感受性率
— 経ロセフェム —



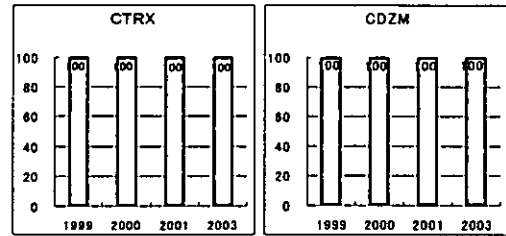
(図4) Distribution of MIC of CTRX



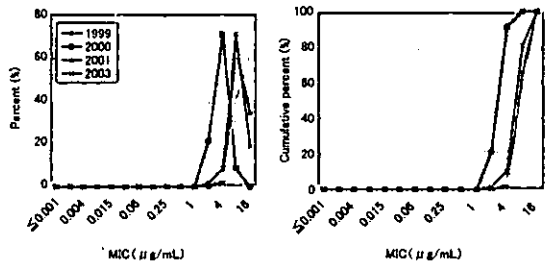
(図5) Distribution of MIC of CDZM



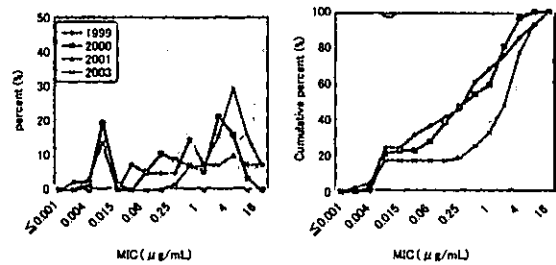
(図6) 各薬剤に対する感受性率
— 注射用セフェム —



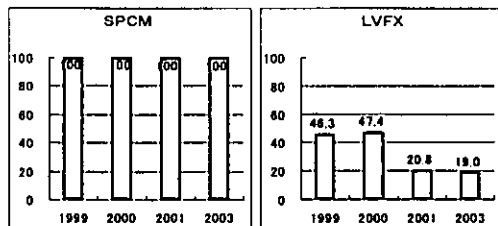
(図7) Distribution of MIC of SPCM



(図8) Distribution of MIC of LVFX



(図9) 各薬剤に対する感受性率
— キノロン、SPCM —



薬剤耐性淋菌のサーベイランス

— 各種薬剤耐性淋菌の年次推移と抗菌薬の治療時間の検討 —

福岡大学医学部泌尿器科学 田中 正利

A. 目的

福岡市における 2002 年の各種薬剤耐性淋菌の検出状況とその年次推移を検討した。また、耐性淋菌感染症に対する適切な抗菌化学療法を選択するため各種薬剤の治療時間を検討した。

B. 対象・方法

(1) 薬剤耐性淋菌の検出状況

対象は、2002 年 1 月から同年 12 月までの 1 年間に福岡市で分離された 211 株の淋菌であった。薬剤感受性測定は米国 NCCLS 法に準じた寒天平板希釈法で行った。使用薬剤は各系統の 11 薬剤であった。

また、1993 年から 2001 年までの 9 年間に分離された 1146 株(1993-1994 年; 151 株、1995-1996 年; 154 株、1997-1998 年; 197 株、1999 年; 246 株、2000 年; 190 株、2001 年; 208 株)に、今回の 2002 年分離 211 株を加えた 1357 株の淋菌を対象に、各種薬剤耐性淋菌の検出頻度における年次的推移を検討した。

(2) 各種抗菌薬の治療時間

各種注射用抗菌薬の 2002 年分離 100 株に対する therapeutic time (治療時間) を検討した。使用薬剤はセフェム系薬を中心とする 11 種類の注射薬であった。薬剤感受性測定は上記と

同様に行い、MIC90 値を算出した。薬動力学的パラメーターは医療薬日本医薬品集、および各薬剤のインタビューフォームから得た。計算式は下記の如く、Moran らが報告した方法に準じて、原則として各薬剤 1 回 1g 静脈内投与時の最高血中濃度(Cmax: $\mu\text{g/ml}$)、血中半減期 (T1/2: 時間)、および MIC90 値($\mu\text{g/ml}$)より算出した。なお、スペクチノマイシンは 2g 筋注時の値を用いた。

$$\text{治療時間} = \frac{T1/2}{\ln 2} \times \ln \frac{C_{\max}}{4 \times \text{MIC90}}$$

計算の結果、治療時間がマイナスの値を示すものは 0 とした。

C. 結果

(1) 薬剤耐性淋菌の検出状況

2002 年における各種薬剤耐性淋菌の検出頻度は、キノロン耐性淋菌(シプロフロキサシン MIC $\geq 1 \mu\text{g/ml}$) が 73.5%で最も高く、以下、ペニシリン耐性淋菌(ペニシリン G MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) 29.9%、テトラサイクリン耐性淋菌(MIC $\geq 2 \mu\text{g/ml}$) 22.3%、セフェム耐性淋菌(セフィキシム MIC $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$) 2.8%、およびスペクチノマイシン耐性淋菌(MIC $\geq 128 \mu\text{g/ml}$) 0%の順であっ

た。ペニシリン耐性淋菌のうち染色体耐性が 29.0%を占め、プラスミド耐性(PPNG)はわずか 0.9%を占めるに過ぎなかった。また、non-PPNG 209 株においてキノロン系、ペニシリン系、およびテトラサイクリン系の 3 系統のうち少なくとも 2 系統に耐性を示す株が 22.5%、3 系統に耐性を示す多剤耐性株が 11.0%存在し、淋菌の多剤耐性化が認められた。

1993 年から 2002 年までの 10 年間に分離された 1357 株の淋菌における各種薬剤耐性淋菌の検出頻度の年次の推移を検討した。キノロン耐性淋菌の検出頻度は 1993 年の 6.6%から急増し、2002 年では 73.5%であった。また、同年におけるキノロン中等度耐性淋菌(シプロフロキサシン MIC: 0.12~0.5 $\mu\text{g/ml}$)の検出頻度は 11.4%であり、両者を併せると 2002 年分離淋菌の実に約 85%がキノロン耐性または中等度耐性淋菌であった(図 1)。2002 年分離株に対する同薬の MIC₅₀ 値、MIC₉₀ 値もそれぞれ 4 $\mu\text{g/ml}$ 、32 $\mu\text{g/ml}$ と極めて高い値を示した。ペニシリン耐性淋菌の検出頻度は、1997 年から 2000 年にかけて年々上昇した。2001 年の検出頻度は 13.5%と前年に比べ低下したものの、2002 年の検出頻度は 29.9%と再上昇した(図 2)。また、テトラサイクリン耐性淋菌の検出頻度における年次推移もペニシリン耐性淋菌と同様な傾向を示し、2002 年の検出頻度は 22.3%と高値であった(図 3)。スペクチノマイシン耐性淋菌は 1357 株中 1 株も検出されなかった。1997~

2000 年まで徐々に増加傾向を示していたセフェム耐性淋菌は 2001 年には 1 株も検出されず、また 2002 年の検出頻度も 2.8%と高くはなかった。しかしながら、2002 年分離株の 38.4%に対するセフィキシムの MIC 値は 0.12~0.25 $\mu\text{g/ml}$ に分布しており、セフェム系薬に対する感受性の低下は明らかに進行していた。

(2) 各種抗菌薬の治療時間

2002 年分離株に対する各種注射用抗菌薬単回投与時の治療時間を図 4 に示した。治療時間はセフトリアキソン(76.9 時間)が最も長く、以下、セフォジジム(21.8 時間)、セフォペラゾン(16.7 時間)、セフチゾキシム(7.54 時間)、メロペネム(6.93 時間)、アズトレオナム(5.61 時間)、およびピペラシリン(5.06 時間)の順であった。このように、単回投与で 95%以上の有効率を得るのに必要とされる 10 時間以上の治療時間を示す薬剤は、セフトリアキソン、セフォジジム、およびセフォペラゾンの 3 薬剤のみであった。

D. 考察

福岡市ではキノロン耐性淋菌の検出頻度が極めて高く、またペニシリン耐性淋菌、テトラサイクリン耐性淋菌も増加傾向を示している。さらに、これらの耐性菌に有効であったセフェム系薬に対する耐性化や多剤耐性化もみられた。現在、淋菌感染症に単回投与で有効性が高い薬剤はセフトリアキソンやセフォジジムなどの一部のセフェム系薬やスペクチノマイシ

ンに限られ、本感染症に対する抗菌薬の選択肢が非常に少なくなっている。

E. 結論

わが国における全国レベルでの薬剤耐性淋菌のサーベイランスシステムの構築が必要である。また、耐性淋菌感染にも有効な注射薬による単回投与療法を普及させることが重要である。

F. 発表

【原著】

1) 雑賀 威, 伊与田貴子, 金山明子, 小林寅吉吉, 尾上泰彦, 中山宏, 田中正利, 内藤誠二: 川崎市および福岡市で分離された *Neisseria gonorrhoeae* の各種抗菌薬感受性および疫学的検討. 日性感染症会誌 14 (1):111-116, 2003

2) Kobayashi I, Kanayama A, Saika T, Nishida M, Nakayama H, Tanaka M, Naito S: Tendency toward increase in the frequency of isolation of beta-lactamase-nonproducing *Neisseria gonorrhoeae* exhibiting penicillin resistance, and recent emergence of Multidrug-resistant isolates in Japan. *J Infect Chemother* 9 (2):126-130, 2003

【総説】

1) 作間俊治, 田中正利: 抗生物質・抗菌療法の実際, 淋菌性・非淋菌性尿道炎. *Medical Practice* 20 臨時増刊 (2):

325-328, 2003

2) 作間俊治, 田中正利: 特集/多様化する性感染症, 性感染症-診断・治療-, 淋菌感染症. *臨床と研究* 80 : 843-846, 2003

3) 田中正利: シンポジウム 性感染症の初期診断と対応, 淋菌感染症. *日経メディカル* 427 (6):119-122, 2003

4) 作間俊治, 田中正利: 抗菌薬療法の最前線, 性感染症の抗菌薬療法. *臨床医* 29 (6): 1298-1299, 2003

5) 田中正利: 特集 海外生活と STD 対策, 淋菌感染症. *海外医療* 30(4): 24-29, 2003

【著書】

1) 田中正利: 淋疾, 非淋菌性尿道炎. 玉置邦彦 総編集: 最新皮膚科学体系 第15巻, ウイルス性疾患 性感染症 pp. 241-249, 中山書店, 東京, 2003

2) 田中正利: 淋菌核酸増幅同定精密検査. 櫻林郁郁之介、熊坂一成 監修: 臨床検査項辞典 pp. 974, 医歯薬出版, 東京, 2003

3) 田中正利: 薬剤耐性淋菌感染症. 吉田修、東間紘、村井勝 編集: 先端医療シリーズ24泌尿器疾患の最新医療 pp. 166-172, 先端医療技術研究所, 東京, 2003

4) 田中正利: 性感染症(尿道炎). 山口徹, 北原光夫総編集: 2004年今日の治療指針, 私はこう治療している. pp. 781-782, 医学書院, 東京, 2004

図1. 福岡市におけるキノロン耐性淋菌の推移

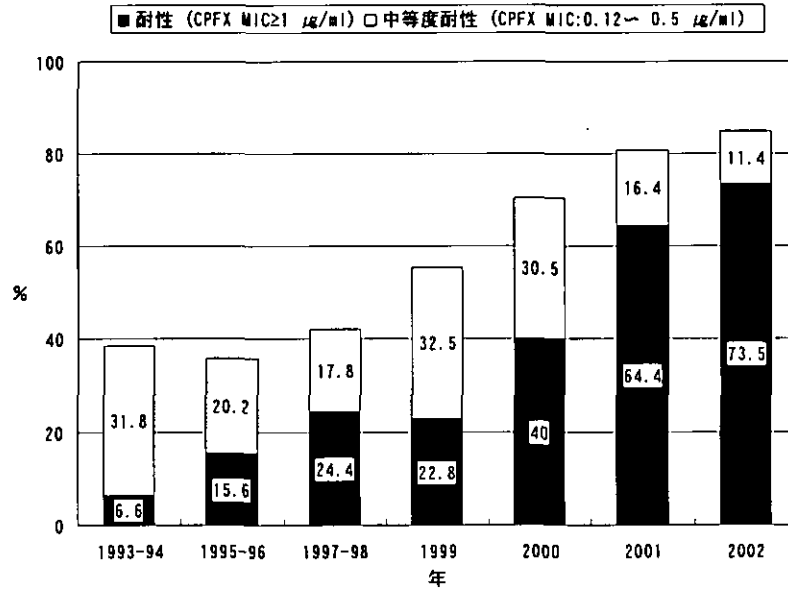


図2. 福岡市におけるペニシリン耐性淋菌の推移

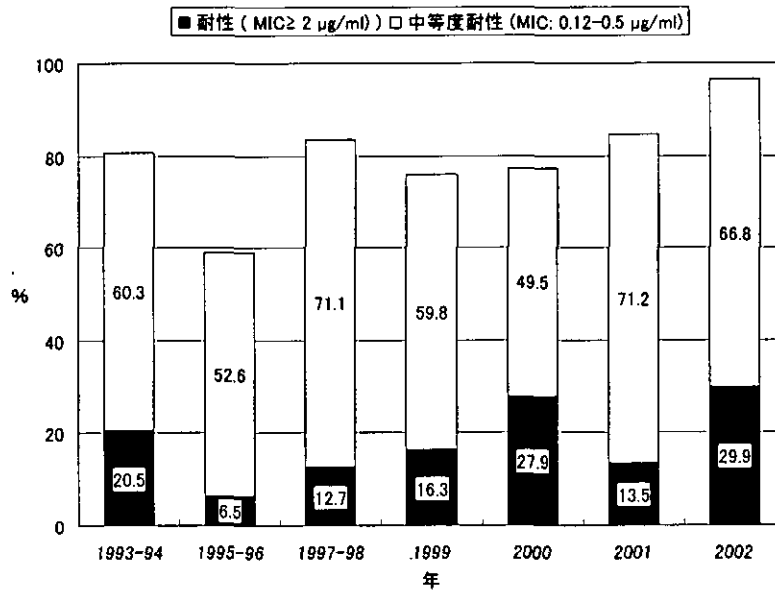


図3. 福岡市におけるテトラサイクリン耐性淋菌の推移

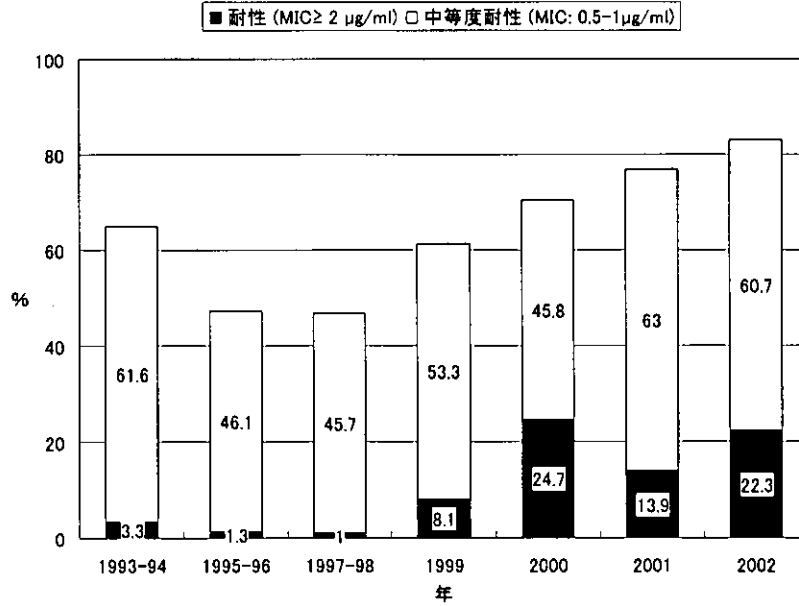
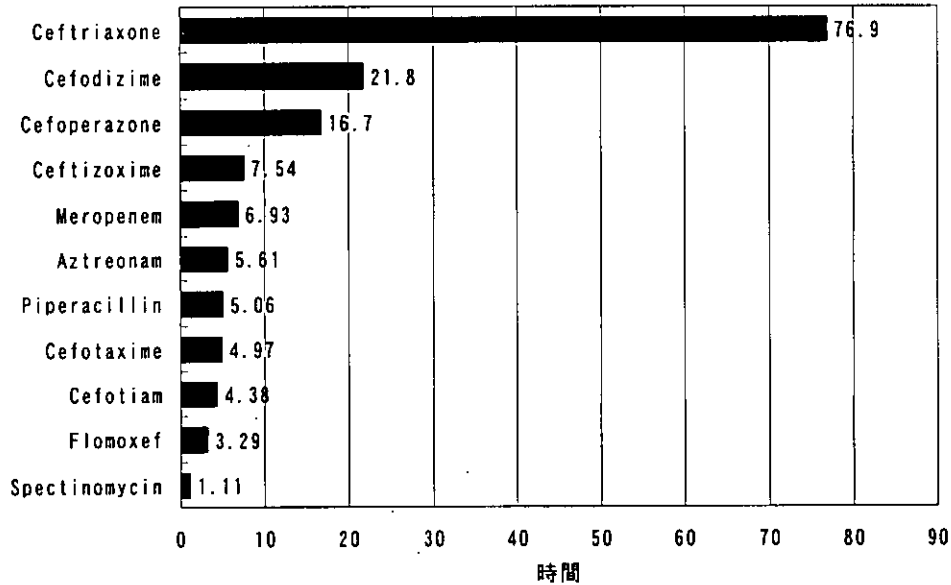


図4. 各種注射用抗菌薬の治療時間



厚生労働省科学研究費補助金

性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究（主任研究者 慈恵医大 小野寺昭一）

分担研究報告書

無症候性 STI に関する研究

淋菌性咽頭感染の実態と治療に関する研究

分担研究者 産業医科大学医学部泌尿器科 松本哲朗

研究協力者

村谷哲郎（産業医科大学医学部泌尿器科／助手）

高橋康一（産業医科大学医学部泌尿器科／助教授 現新水巻病院／泌尿器科部長）

安藤由起子（安藤ゆきこレディースクリニック／院長）

佐藤由美子（佐藤由美子産婦人科クリニック／院長）

倉島雅子（さとうレディースクリニック／院長）

横尾大輔（横尾クリニック／院長）

生山俊弘（芳野医院／医師）

下川 浩（エンゼル病院／院長）

柳井繁章（エンゼル病院／医師）

A. 目的

クラミジアや淋菌による感染は、男性では強い症状を伴って現れるが、女性では無症状で経過することがしばしば認められる。このことが STI の増加の一因である。また近年性行動の多様化により、これらの微生物が咽頭に感染している例が報告されている。多くの場合、無症候に経過し、咽頭を介してこれらの微生物が拡散している。男性淋菌性尿道炎患者の大半がコマーシャルセックスワーカー（CSW）によるオーラルセックスからの感染であることから明らかである。

また我々は、キノロン耐性株の増加の後、切り札的存在であった経口セフェムや Aztreonam に耐性を示す株の出現および増加を報告している。またこれらの耐性株は、cefazopran の感受性分布により、明確に分類可能であるため CZRNG (cefazopran-resistant *Neisseria gonorrhoeae*) として報告している。今回経口セフェムなどに耐性を示す淋菌に注目し、咽頭感染患者に対する治療薬および投与方法の検討を行った。

B. 対象および方法

北部九州地区を中心とした多施設共同研究として、2001年2月～2003年4月まで実施した。16歳以上の男女で、生殖器に淋菌が感染している患者または感染していることが疑われる患者を対象として、咽頭の淋菌の有無について検討を行った。治療は、cefodizime 1g 単回静注投与または、cefixime 400mg 3日間投与とし、投薬終了後3から14日後の淋菌の存在の有無を培養法により検討した。

C. 結果

期間中に生殖器または咽頭の淋菌陽性患者は、132例が登録されたが、そのうち咽頭の淋菌検査がなされた患者は、101例であった。101例のうち、生殖器淋菌陽性患者99例であり、そのうち咽頭淋菌陽性者32例(32.3%)で、女性29/82(35.4%)、男性3/17(17.6%)であった。また、生殖器淋菌陰性で、咽頭淋菌陽性者が2名(男女各1例)存在した。

Cefodizime 1g 単回静注投与がなされた87例中治療効果が判定可能であった77例の生殖器淋菌消失率は、100%(77/77)であった。Cefixime が投与された14例のうち治療効果が判定可能であった10例の生殖器淋菌消失率は、90%(9/10)であった。

Cefodizime 1g 単回静注投与の咽頭淋菌消失率は64%(16/25)であり、感受性により分類すると、経口セフェム感受性菌では、11/13(84.6%)、耐性菌(CZRNG)では、5/12(41.7%)であった。無効例9例の転帰は、以後来院せず3例、CDZM 1g追加投与にて消失3例、存続2例(CDZM 1gさらに追加投与により2例とも消失)、CDZM 2g追加投与にて消失1例であった。Cefixime 400mg 3日間投与の咽頭淋菌消失率は100%

(4/4)であり、感受性により分類すると、経口セフェム感受性菌では、3/3、耐性菌(CZRNG)では、1/1であった。

D. 考察

現在淋菌に保険適応を有する薬剤で、耐性菌が存在しないと考えられる薬剤は、注射薬である cefodizime と spectinomycin だけであり、経口剤のなかで最も抗菌力が強い薬剤は cefixime である。Spectinomycin は、生殖器淋菌感染に対する効果は認められるものの咽頭への移行が悪く、臨床効果が劣ることが報告されている。したがって、cefodizime と cefixime を用いて、咽頭の淋菌消失率について検討を行った。Cefodizime の in vitro 抗菌活性は強く、生殖器淋菌感染症においては、耐性菌は存在しないと考えられる。これまで、1g 単回静注後に淋菌が存続していた例を1例経験しているが、cefodizime 再投与により、消失しており、またこの症例に関しては、再感染であった可能性も否定できず、現在のところ cefodizime は生殖器淋菌感染症に対して、ほぼ100%有効な薬剤であると考えている。Cefixime の in vitro 抗菌活性は、経口剤の中ではもっとも強いが、CZRNG に対しては低感受性を示す。400mg 3日間投与については、CZRNG による生殖器淋菌感染症に対してこれまでも無効例を経験しており、今回 CZRNG による生殖器淋菌感染症において、無効例を1例経験した時点で、倫理的にふさわしくないと判断し、中止とした。

D. 結論

今回の結果より、cefodizime は、生殖器淋菌感染症に対しては、1g 単回静注投与で十分な治療効果を有するが、咽頭感染に対しては、投与量不足であると考え

られた。これらのデータを踏まえて、咽頭淋菌感染を
対象とした 2g 単回静注投与および 1g 静注投与 2-3 日
間という臨床試験を実施中である。

F. 発表

論文・学会発表とも作成準備中

厚生科学研究費補助金エイズ対策研究事業 分担研究報告書

性器ヘルペスに関する検査法の開発と評価

分担研究者 川名 尚 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科客員教授

A. 目的

単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染による性器ヘルペスは、STD の中で第 3 位を占める重要な疾患である。

性器ヘルペスの診断には臨床診断と実験室診断があるが、性器ヘルペスの症状は多彩であるため臨床症状による診断は難しい。また、子宮頸部では特徴的な所見に乏しいため臨床診断は不可能に近い。そこで実験室診断が必要となる。

実験室診断としては病原診断と血清診断があるが、血清診断は特別な場合を除いて困難である。性器ヘルペスの診断には病原診断が不可欠である。

病原診断としては分離・培養法が gold standard であるが、時間と費用がかかるため一般には用いられない。簡単で特異性が高く鋭敏な検査の開発を目的とする。

B. 対象・方法

(1) 性器ヘルペス患者：平成 15 年 4 月 1 日から平成 16 年 3 月 19 日までの間に外陰の症状を訴えて来院し、帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科を受診した患者を対象とした。外陰病変と子宮頸管から分離を行った。

(2) 単純ヘルペスウイルス分離：病変部より採取した検体を 5% 仔牛血清と抗生物質を含有する MEM 培地にてすすぎ、これを遠心し、その培養

上清を R-66 細胞に接種した。CPE が出現した時点で同定と型の決定を HSV-1 と HSV-2 に対するマウスモノクローナル抗体に蛍光標識した MicroTrak Herpes™ とデンカ生研キットを用いて行った。

(3) 我々が性器ヘルペス患者から分離した新鮮分離株 25 株 (HSV-1 8 株、HSV-2 17 株) を用いた。

(4) LAMP 法：藤田保健衛生大学小児科 吉川哲史氏の作成したプライマーによる LAMP 法を用いて予備実験を行った。

C. 結果

(1) 性器ヘルペス患者から 268 回の HSV 分離培養検査を行った。陽性検体は 49 例、陰性検体は 219 検体であった。49 検体のうち HSV-1 が 13 検体、HSV-2 が 36 検体であった。

(2) 新鮮分離株を用いて MicroTrak Herpes™ とデンカ生研キットの比較を行った。HSV-1 の 8 株については両キットの検出感度はほぼ同等であったが、HSV-2 についてみると 17 株中 15 株はデンカ生研キットの染色性が劣っていることが判明した。

(3) 新鮮分離株 HSV-1 10 株、HSV-2 10 株について LAMP 法による検出感度をみたところ、それぞれ正しく同定できた。

D. 考察

(1) 性器ヘルペスの実験室診断には感度と特異度が良いことが先ず挙げられる。その検討を行うための臨床検体（陽性と陰性）が必要となる。今回、ウイルス性疾患の gold standard である分離培養法により確認した陽性臨床検体 49 検体と陰性検体 219 検体は、今後の新しい検査法を開発する際の検体として用いることが出来る。

(2) 擦過細胞を用いた蛍光抗体法による診断キットの評価

現在、保険で採用されている性器ヘルペスの検査法は病変部から感染細胞を採取し無蛍光スライドに塗抹し、これを固定後 HSV-1 と HSV-2 に対するマウスモノクローナル抗体に蛍光が標識されているキットを反応させて同定と型の決定を行うものである（ダイレクトテスト）。したがって、このキットの感度と特異性が診断能力を決定する。そこで現在本邦で市販されているデンカ生研社製のキットについて、その診断精度を野生株を用いて米国で開発された MicroTrak Herpes キットと比較した。

HSV-1 8 株についてみるとこの両者はほぼ同等であったが、HSV-2 についてみると 17 株中 15 株はデンカ生研キットの染色性が劣っていることが判明した。このことはダイレクトテストでは HSV-2 を見逃す可能性がある。

(3) LAMP 法の性器ヘルペス診断のための基礎的検討

LAMP 法は短い時間で核酸を増幅できる、新しい診断法として登場してきた。

今回、藤田保健衛生大学 吉川哲史氏との共同研究により、当科で分離した野生株 HSV-1 型 10 株と HSV-2 型 10 株を用いて精度を検討したとこ

ろ、それぞれ正しく同定できた。このことから吉川氏の設計したプライマーが適切に働いたといえる。

今後、本法を臨床検体に応用したい。

E. 結論

現在保険で採用されている HSV 抗原検出法は感度が非常に悪いので、臨床の場で使いやすく、感度と特異度の高い検査法の開発が急務である。

F. 発表

原著論文

1. Umene K, Kawana T.
Divergence of reiterated sequences in a series of genital isolates of herpes simplex virus type 1 from individual patients.
J. General Virol 84; 917-923; 2003
2. 川名 尚
病状から見た治療法の選択 『性感染症』
産婦人科の実際 52(1): 61-69; 2003.
3. 川名 尚
女性診療科のための薬物療法マニュアル
産婦人科の薬物療法 『性器ヘルペスと尖形コンジローム』
産婦人科治療 86: 731-735; 2003.
4. 川名 尚
性器ヘルペスの治療
治療学 37(8): 813-816; 2003.
5. 川名 尚
蔓延する STD の現状と治療的戦略, 性器ヘルペス
『産婦人科の実際』52 巻 (臨時増刊号) 金原出版社; 2003.

学会発表

1. 川名 尚
「単純ヘルペスウイルス 2 型感染症について」

産婦人科感染症研究会 シンポジウム「性感染症」
2003年6月、宇都宮

2. 西澤美香 村田照夫 長谷部敏朗 柿沼三郎
川名 尚 綾部琢哉
「性器ヘルペス患者における型特異的細胞
性免疫能検出法の開発」
日本性感染症学会第16回学術大会
2003年12月、長野

厚生労働省科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
性感染症の効果的な蔓延防止に関する研究班
平成15年度研究報告

新規核酸増幅（LAMP）法によるVZV, HSV感染症の検討

主任研究者 小野寺昭一（東京慈恵医科大学医学部泌尿器科）
研究協力者 新村 真人（東京慈恵医科大学医学部皮膚科）

研究要旨 α ヘルペス亜科に属するヒトヘルペスウイルスには、単純ヘルペスウイルス1, 2型（herpes simplex virus, 以下HSV-1, 2）、水痘・帯状疱疹ウイルス（varicella-zoster virus, 以下VZV）がある。一般的に臨床像からヘルペスウイルス感染症と診断されることが多いが、皮膚科領域において陰部潰瘍での、ベーチェット病、免疫不全者では、非定型疹との鑑別が重要であり、また、迅速診断が必要となる。ヘルペスウイルス感染症の診断において従来の血清学的診断法では、時間を要し、特異性に問題があること、また、HSVではgG型特異的ELISAによる抗体測定が行われているものの、抗原性の弱さによる抗体出現が遅いなどの問題がある。モノクローナル抗体を用いた抗原検出法では、比較的短時間で施行できるが、蛍光顕微鏡を要し、検出率が40%前後と低い。また、PCR法は、サーマルサイクラーなどの特殊な機器、DNA抽出や増幅DNAの確認が必要であり、広く一般の検査室に普及するには至っていない。

今回、我々が用いたLAMP（loop-mediated isothermal amplification）法は、PCRに代わる安価、迅速、簡易な方法として栄研化学が独自に開発した遺伝子増幅法であり、従来のPCRと同等以上の増幅効率、感度を実現している。反応は等温で進行し、反応過程で出現する白濁を利用して増幅を検出すると、全工程が1時間以内の1ステップで終了する。VZV, HSV-1, 2感染症に対する特異性、感度については岡本、榎本らが報告しており（日本ウイルス学会 51回学術集会総会 2003）、これらの結果をもとに臨床検体での検出感度等を検討した。

同法は感度、特異性とも非常に優れており、プライマーの設計、検討を行えば、尖圭コンジローマ、その他の性感染症の診断、型判定等にも応用できるものと考えた。

A. 目的

性感染症における診断法は血清抗体価、抗原の検出、PCRなど様々な方法があるものの、その特異性、感度が問題となることが多い。臨床の場では時に迅速な診断が必要となるが、PCR法はサーマルサイクラーが必要なこと、電気泳動による判定など、結果がでるまである程度の時間を要するため、一般検査室レベルには広く普及していない。今回、われわれは新た

な核酸増幅法であるLAMP法による病原検出を試みたいと考えた。LAMP法は標的DNA（RNAでも可）6ヶ所の領域に対する4つのプライマーを用いるため、特異性が高く、その反応は65℃付近の等温で進行する。また、PCR法に比べ、増幅産物が多いため、30～60分で可視下でも増幅の有無が確認できるという特徴を有する。性感染症である尖圭コンジローマ、性器ヘルペスではその診断だけでなく、型も問

題となることがあるため、臨床の場で簡便、迅速に行える検査法が望まれる。LAMP 法を用いた VZV, HSV-1,2 に対する特異性、感度については 2003 年日本ウイルス学会において岡本、榎本らが報告しており、われわれは、これらの結果をもとに臨床検体での検出感度等を検討し、新たな検査法として応用できるか検討した。

B.方法

1) 対象, 検体

①帯状疱疹と診断された 20 名の水疱, 膿疱, 痂皮。水痘と診断された 2 名の水疱 (検体は蒸留水 1ml に保存)。

②HSV 感染と診断, もしくは疑われた 33 名の口唇, 外陰部の拭い液, 痂皮 (検体は蒸留水 1ml に保存)。

2) LAMP 法

プライマーは既に報告されている通り, VZV に対しては ORF62 領域に, HSV に対しては 1, 2 それぞれの gG 領域に設定した。また, DNA の抽出は, QIAampDNA Blood Mini Kit を用い, これらの検体を用いて LAMP 法を施行し (63°C, 60 分), その感度 (濁度, 電気泳動), 検出時間を評価した。さらに HSV-1 陽性検体を用いて DNA 抽出を省略した場合での感度, 検出時間の評価も加えて行った。

C.結果

①帯状疱疹, 水痘の検体を用い LAMP 法を施行し, 特異性, 高感度を実証した (20/21 検体で陽性)。痂皮においても, 7/8 病変, 最大 20 病日において濁度での検出が可能であった。また, LAMP 法の濁度による検定では陽性 21 検体中, 16 検体で 30 分以内に検出が可能であった。

②HSV 感染症もしくは疑いの検体を用い LAMP 法を施行し, 特異性, 高感度を実証し

た。HSV-1 感染症と診断された痂皮病変においても, 8/11 病変において濁度での検出が可能であった。

また, HSV-1 感染症と診断された 13 検体では, 30 分以内に検出されたものはなかったものの, HSV-2 を検出した検体では, HSV-1 検出例よりも短時間で確定できる症例が多くみられた。

DNA 抽出の過程を省略した場合でも LAMP 法で検出できることは既に報告されている通りであったが, 検出時間は DNA を抽出した場合よりも短縮される傾向にあった。

D.考察

1) ヘルペスウイルス感染症 (VZV, HSV-1,2) において, LAMP 法は特異性, 感度とも良好であり, 臨床での迅速診断に耐えうるものと考えた。

2) VZV, HSV-2 の臨床検体では比較的早期に検出される傾向にあったが, HSV-1 では DNA 抽出例で 30 分以内に検出できたものはなく, 検出時間を再考する必要があると考えた。

3) HSV-1 の検体で DNA 抽出を省略し, 検出時間が短縮されたことより, どのように処理した検体を用いるかについて, 今後も検討を重ねる必要があると思われた。

E.結論

今回, VZV, HSV 感染症の臨床検体を用い, その特異性, 感度が実証された。検出時間, どのように処理した検体を用いるかについては再考の余地があるが, その迅速性, 簡便性は充分評価され得るものである。今後, LAMP 法は性感染症のみならず, その他の感染症においても病原検出法として応用できるものと考えた。

F.発表

新規核酸増幅 (LAMP) 法による VZV, HSV 感

