

## 【研究課題 2】妊婦を対象とした無症候性の性感染症の実態把握

### 研究要旨

福岡市の産婦人科を定期検診のために受診した妊婦におけるクラミジア、淋菌の感染状況を検討した。636名中23名(3.6%)からクラミジアが検出された。年齢別検出率は、15～19歳が21.4%と極めて高く、以下、20～24歳が7.6%、25～29歳が3.1%、30～34歳が1.8%などの順であった。一方、淋菌は636名中1名(0.2%)のみから検出されたに過ぎなかった。未婚妊婦におけるクラミジア、淋菌の検出率はそれぞれ11.4%、2.9%であり、既婚妊婦における両微生物の検出率はそれぞれ3.2%、0%であった。このように10歳代後半の妊婦、未婚妊婦においてクラミジアの検出率が高かった。

### A. 目的

福岡市の妊婦における無症候性のクラミジア、および淋菌感染症の蔓延状況を検討した。

### B. 対象・方法

福岡市の産婦人科5施設の外来を定期検診のために受診した妊婦のうち、クラミジア、および淋菌検査を希望する者を対象とした。検査を希望した妊婦から担当の産婦人科医が子宮頸管または膣スミアを綿棒で採取し検体とした。採取された検体からPCR法(アンプリコアSTD-1 クラミジアトラコマチス・ナイセリアゴノレアキット、日本ロシュ)を使用し、クラミジアと淋菌の検出を行った。妊婦の年齢別、および婚姻形態別に両微生物の感染状況を検討した。

### C. 結果・考察

検体が採取された妊婦は636名であった。636名中23名からクラミジアが検出され、検出率は3.6%であった。年齢別検出率は、15～19歳が21.4%と最も高く、以下、20～24歳が7.6%、25～29歳が3.1%、30～34歳が1.8%、35～39

歳が1.7%、40歳以上が0%の順であった。このように年齢が若い程クラミジアの検出率が高かった。一方、淋菌は636名中1名のみから検出されたに過ぎず、検出率は0.2%であった(図1)。なお、淋菌が検出された1例は17歳の未婚妊婦であった。

婚姻形態別では未婚妊婦におけるクラミジア、淋菌の検出率はそれぞれ11.4%、2.9%であった。一方、既婚妊婦における両微生物の検出率はそれぞれ3.2%、0%であった(図2)。

このように福岡市においても10歳代後半の妊婦、および未婚妊婦においてクラミジアの検出率が極めて高かった。なお、今回の調査では淋菌の検出率はクラミジアに比べ低かった。しかしながら、福岡県は全国でも淋菌の感染率が高い地域であり、今後とも注意が必要である。

### D. 結論

福岡市の妊婦においても無症候性のクラミジア感染率が高く、特に、10歳代後半の若い妊婦や未婚妊婦においてその感染率が高かった。また、これら妊婦においては淋菌の感染にも十分注意す

る必要があると考えられた。

#### E. 発表

##### 【原著論文】

1. 熊本悦明, 塚本泰司, 杉山徹, 赤座英之, 野口昌良, 納谷敦夫, 守殿貞夫, 碓井亜, 香川征, 田中正利, 簗輪眞澄, 谷畑建生, 澤畑一樹: 日本における性感染症サーベイランス-2002 年度調査報告-. 日性感染症会誌:15:17-45, 2004
2. 松田静治, 佐藤郁夫, 山田哲夫, 菅生元康, 野口昌良, 岡本俊充, 野口靖之, 保條説彦, 保田仁介, 塚本泰司, 高橋聡, 清水利明, 小六幹夫, 石井延, 原啓, 高波真佐治, 鈴木九里, 出口隆, 石原哲, 藤本佳則, 公文裕巳, 津川昌也, 門田晃一, 近藤捷嘉, 赤澤信幸, 内藤誠二, 田中正利, 中山宏: Transcription-mediated amplification 法を用いた RNA 増幅による Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae の同時検出-産婦人科および泌尿器科における臨床評価-. 日性感染症会誌: 15:116-126, 2004
3. Tanaka M, Nakayama H, Notomi T, Irie S, Tsunoda Y, Okadome A, Saika T, Kobayashi I: Antimicrobial Resistance of Neisseria gonorrhoeae in Japan, 1993 to 2002:Continuous Increasing of Ciprofloxacin-Resistant Isolates. Intern J Antimicrob Agents 24S: S15-S22, 2004
4. 田中正利, 江頭稔久, 内藤誠二, 村谷哲郎松, 本哲朗, 金武洋, 木谷公亮, ほか 33 名:九州地域における薬剤耐性

淋菌の分離状況に関する研究. 臨床と研究 81:2030-2036, 2004

##### 【著書】

5. 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
6. 田中正利:病原体からみた STD-淋菌感染症, 男子淋菌性尿道炎を中心に. 熊澤浄一, 田中正利 編:性感染症 STD. pp. 115-127, 南山堂, 東京, 2004
7. 田中正利:Urology 最前線 淋菌感染症, 感染の現状と耐性化のメカニズム. アプローチ春号, 1-5, 2004
8. 田中正利:新興・再興感染症 耳鼻科領域における性感染症-淋菌の咽頭感染について-. 日耳鼻 107:760-763, 2004

##### 【学会報告】

1. 田中正利:教育セミナー「STD における最近の話題 特別講演 I 淋菌性尿道炎」, 第 92 回日本泌尿器科学会総会, 2004.4.13. 大阪
2. 田中正利:特別講演「泌尿器科領域における淋菌・クラミジア感染症」, 第 261 回日本泌尿器科学会岡山地方会, 2004.9.16. 岡山
3. 田中正利:教育セミナー「淋菌感染症の増加と薬剤耐性化」, 第 53 回日本感染症学会東日本地方会総会, 第 51 回日本化学療法学会東日本支部総会, 2004.10.2. 新潟

図1. 妊婦の年齢別クラミジア、淋菌感染状況

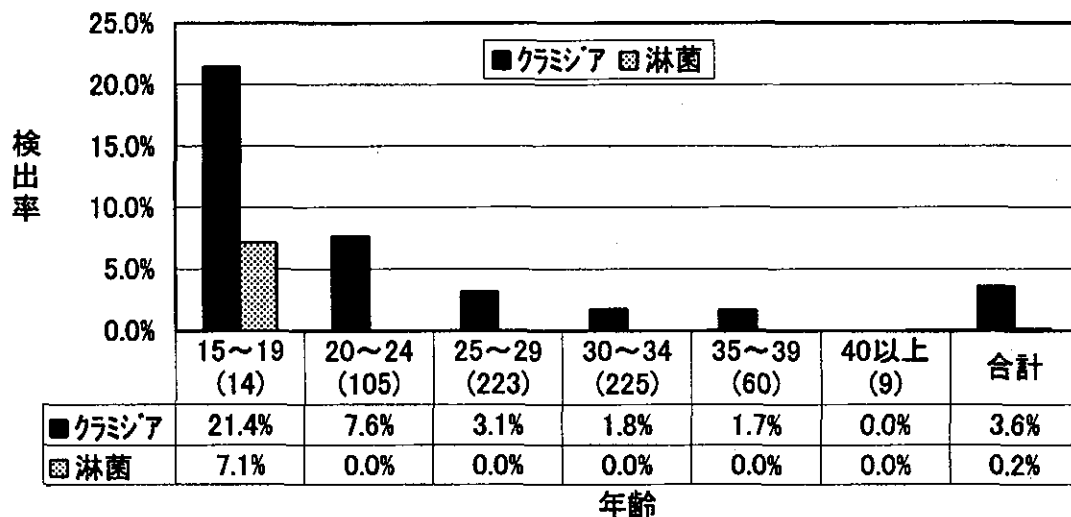
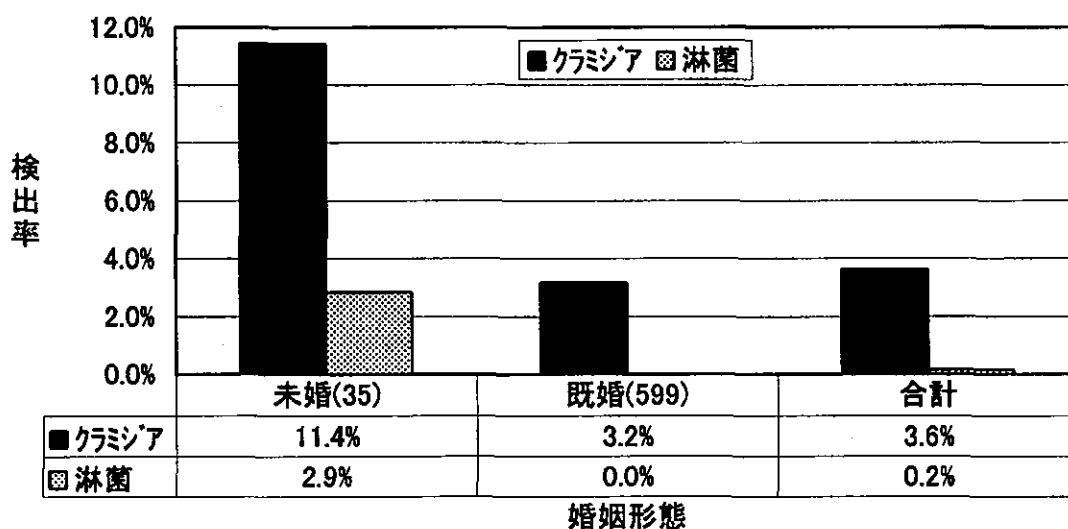


図2. 妊婦の婚姻形態別クラミジア、淋菌感染状況



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～2004年分離株の比較—

研究要旨

わが国において、淋菌感染症は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、現在でも増加がみられている。それに伴い、薬剤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附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2004年に検出された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検討した。その結果、ガイドラインなどで第一選択薬とされている注射剤のCTR<sub>X</sub>、CDZ<sub>M</sub>、SPC<sub>M</sub>の感受性には変化が認められなかった。一方、経口セフェム系薬のCFIXではMIC<sub>90</sub>に変化は認められなかったものの、2003年と同様に96%の感受性率であった。また今回、4症例で咽頭から淋菌が検出された（4症例のうち1症例は咽頭のみからの検出）が、性器由来株と比べてMIC値が高い傾向が認められた。今後、耐性淋菌の動向について引き続き検討することが重要であるが、とくに口腔内淋菌の検出、治療にも注意が必要であることが示唆された。

研究協力者：

遠藤勝久 JR 東京総合病院泌尿器科

清田 浩 東京慈恵会医科大学泌尿器科

各務 裕 東京慈恵会医科大学泌尿器科

A. 目的

1999年より、東京慈恵会医科大学附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2004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年からの動向について検討した。

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281株（1999年：41株、2000年：57株、2001年：24株、2003年：58株、2004年：101株）を対象とした。

$\beta$ -lactamase 活性はニトロセフィン法を用いて測定し、CFIX、CFT<sub>M</sub>、CTR<sub>X</sub>、CDZ<sub>M</sub>、

SPCM、LVFX、PCG、CVA/AMPC、AZM、TC、AZT 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 ( $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ )、PCG ( $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ )、CVA/AMPC ( $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ )、TC ( $\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$ ) とした。

### C. 結果

$\beta$ -lactamase 産生菌は 1999 年に 1 株、2003 年に 3 株そして今回 5 株認められたが、増加傾向は認められなかった。

1999 年、2000 年、2001 年、2003 年、2004 年の主な薬剤の MIC90 値は、CFIX がそれぞれ 0.03、0.25、0.25、0.25、0.25  $\mu\text{g/ml}$ 、CTRX が 0.015、0.06、0.03、0.06、0.06  $\mu\text{g/ml}$ 、CDZM が 0.06、0.06、0.06、0.12、0.12  $\mu\text{g/ml}$ 、SPCM が 16、4、>8、16、8  $\mu\text{g/ml}$ 、LVFX が 8、4、>8、8、8  $\mu\text{g/ml}$  であり、2000 年以降の大きな変化は認められなかった。

2004 年の各薬剤に対する感受性率では、図 1 に示すように、注射剤である CTRX、CDZM および SPCM は 100% であったが、経口薬である CFIX、CFTM はそれぞれ 94.1%、79.2% であり、LVFX は 23.8% であった。

各薬剤の感受性率の推移を見ると、図 2、図 3 に示すように経口セフェム剤である CFIX、CFTM の感受性はそれぞれ 2003 年 96.3%、77.6%、2004 年 94.1%、79.2% と有意な低下は認められなかったものの、低い値を示していた。一方、図 4、図 5、図 6 に示すように、注射剤である CTRX、CDZM および SPCM は 1999 年以降 100% の感受性率が保たれており、今回も感受性率の低下は認められなかった。また図 7 に示すように

経口ニューキノロン剤である LVFX は、1999 年以降年々低下し、今回では 23.8% まで低下していることが認められた。

図 9 に示すように、今回 2004 年の分離株 101 株のうち 4 株が咽頭より分離され、このうち 3 症例は尿道からも淋菌が分離された。この 3 症例について尿道分離株と咽頭分離株の MIC を比べてみると、ほとんど同等であったが、症例により咽頭分離株の方が数種類の薬剤に対し 1 管程度高い MIC 値を示した。

### D. 考察

今回、淋菌治療の第一選択薬であり注射剤である SPCM、CTRX、CDZM の感受性率には変化は認められず 100% であった。一方、経口セフェム剤である CFIX では、MIC90 に変化は認められないものの、感受性率は 95% 程度であった。以上より淋菌治療の第一選択薬としては、SPCM、CTRX、CDZM の注射剤 3 薬剤を選択せざるを得ない状況に変わりはないことが確認された。

一方、今回 4 症例で咽頭より淋菌が分離され、このうち 3 症例で尿道からも同時に淋菌が分離された。今後は淋菌性尿道炎と診断された症例では、咽頭内淋菌の検索も同時に行うべきであることが示唆された。

### E. 結論

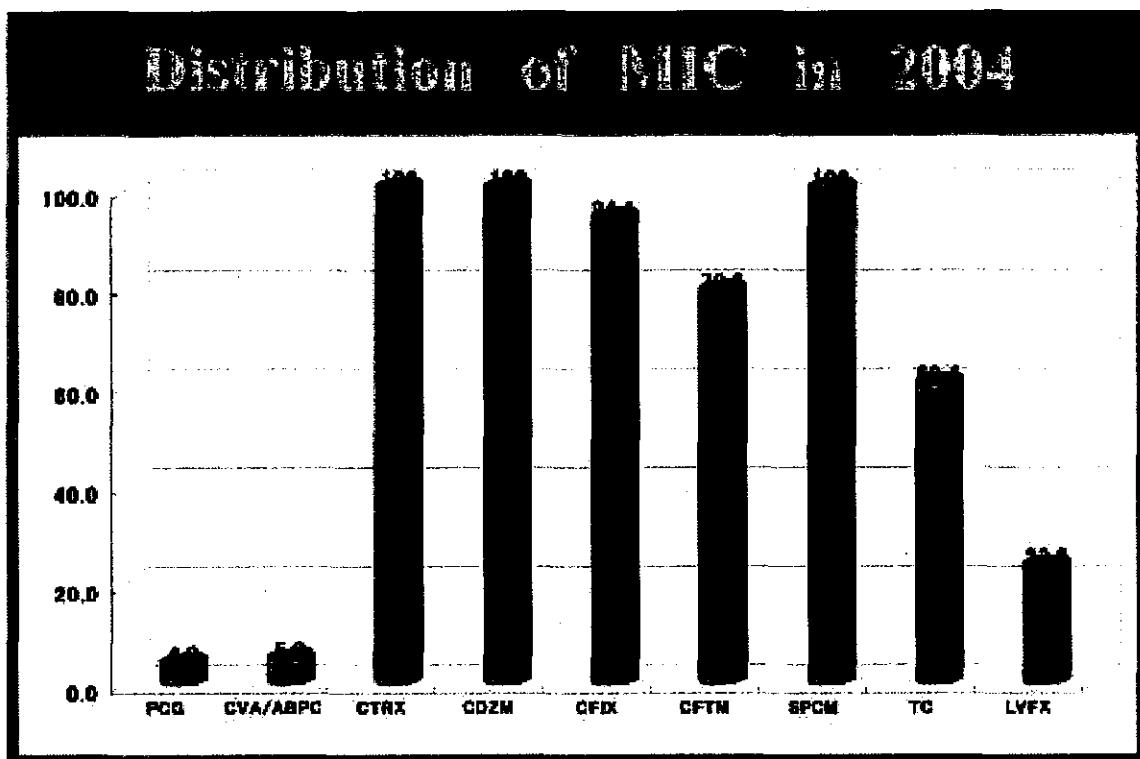
- ① 2004 年度株の MIC90 は、2003 年と比較して大きな変化はなかった。
- ② 2004 年でも注射剤の CTRX、CDZM、SPCM の感受性率は 100% であった。
- ③ 経口セフェムの耐性は進んでいなかったが、2003 年と同様 95% 程度の感受性率であった。
- ④ LVFX の耐性化は若干進行していた。
- ⑤ 咽頭由来株が 4 株認められ、MIC 値では

尿道由来株とほとんど同等であったが、  
薬剤により MIC 値が 1 管ほど高かった。

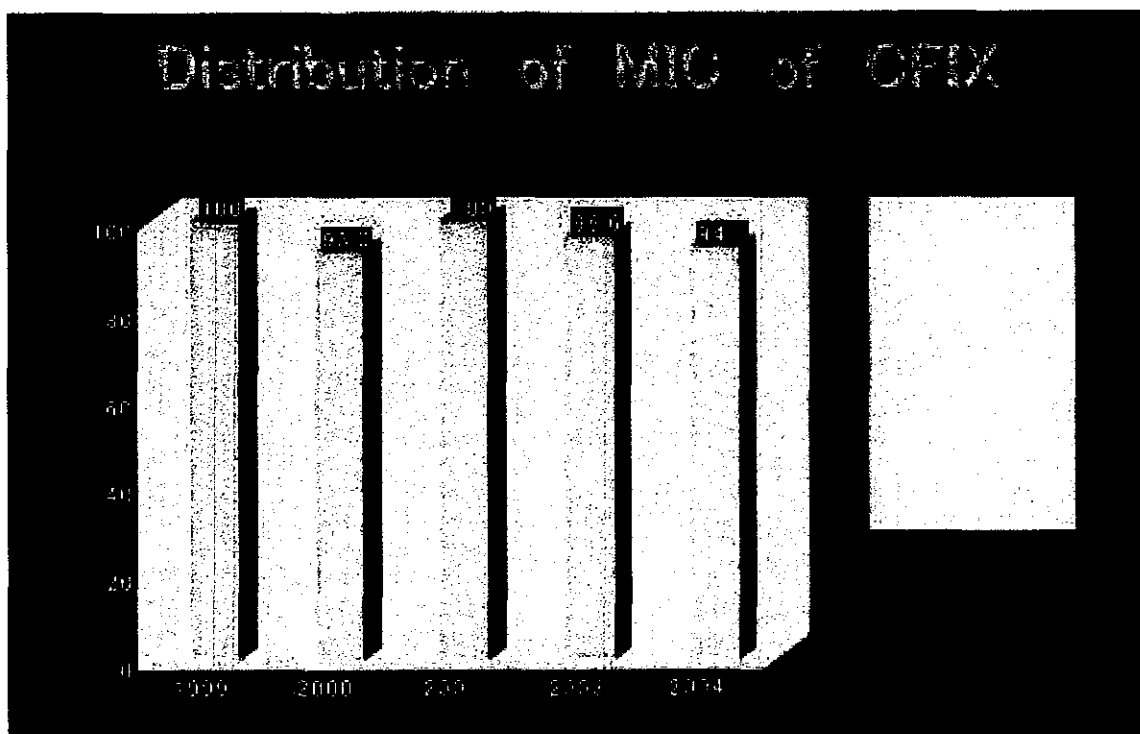
**F. 学会発表**

各務 裕、遠藤勝久、清田 浩、小野寺  
昭一ほか、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—1999~2004 年分  
離株の比較—：日本性感染症学会第 17 回  
学術大会、2005 年 12 月 5 日、東京

(图 1)



(图 2)



(图3)

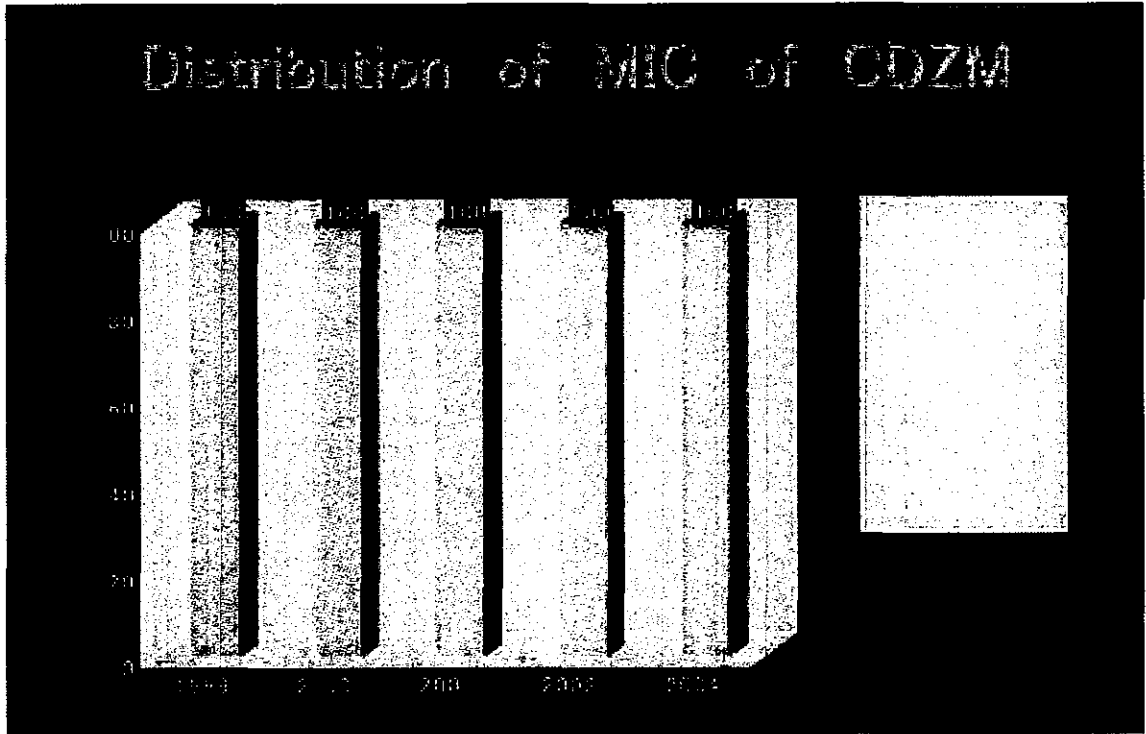


(图4)





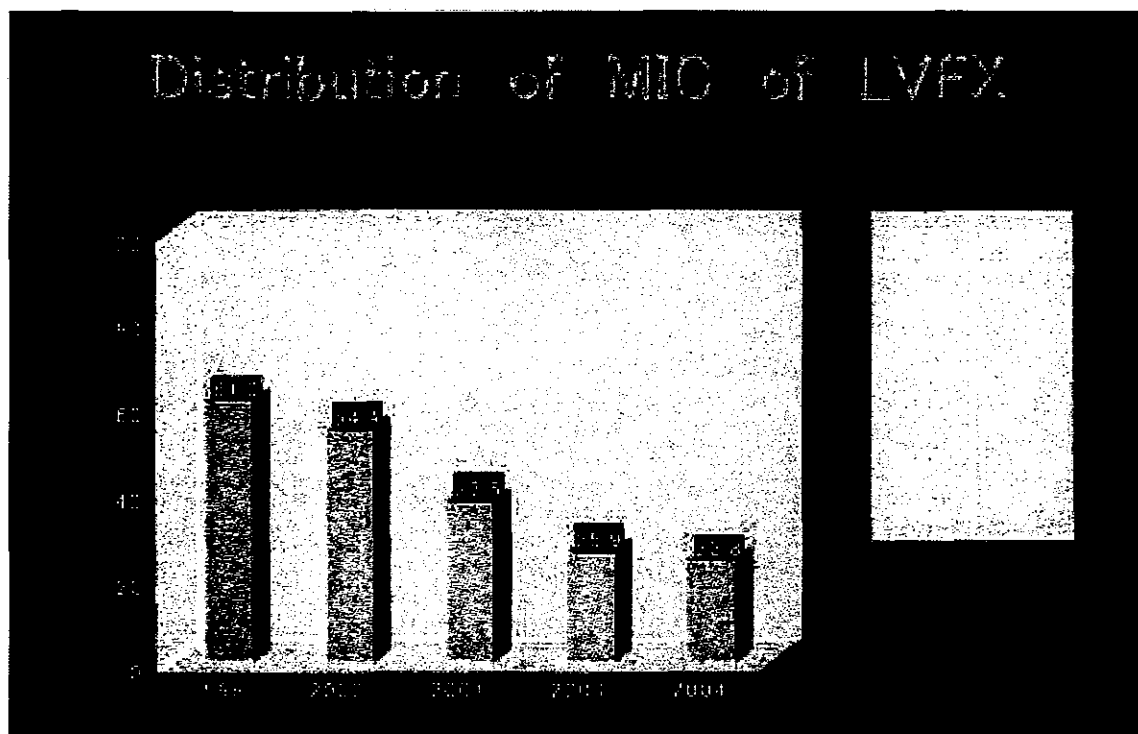
(图 5)



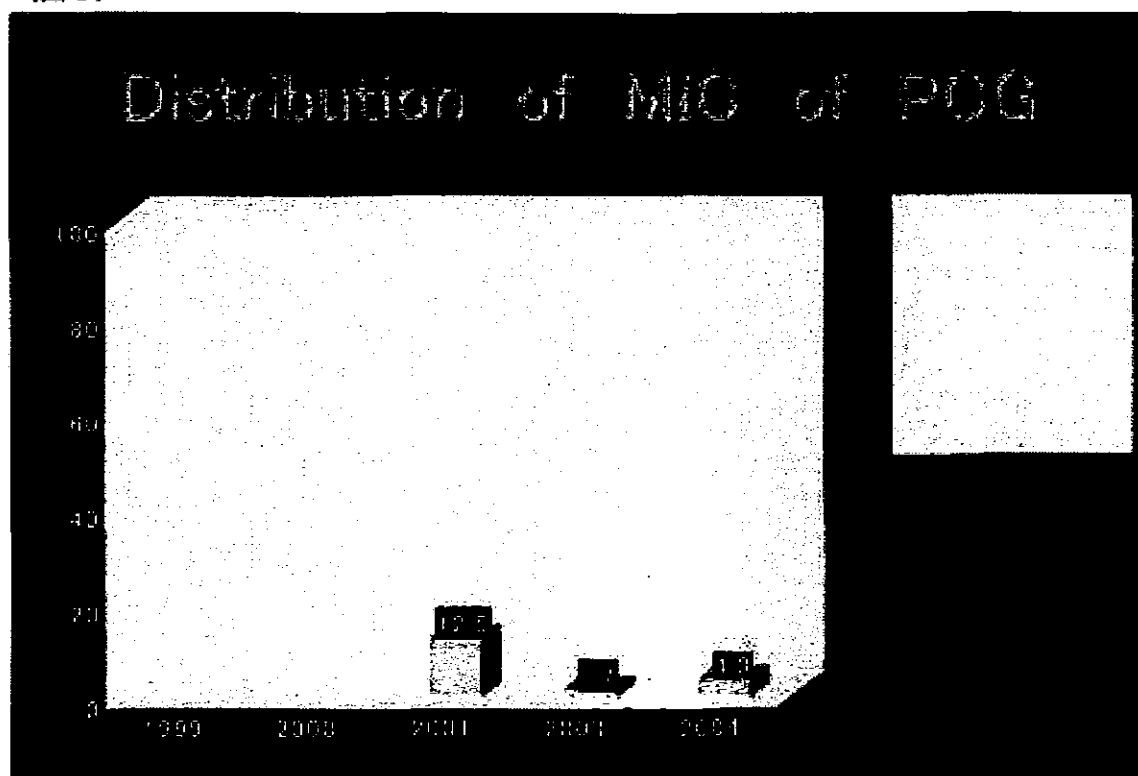
(图 6)



(图7)



(图8)



(図9)

No	MIC (μg/mL)											
	Penicillin G	Clavulanic acid Amoxicillin	Ceftazoxime	Cefixime	Cefotaxime	Ceftazidime	Erythromycin	Spectinomycin	Tetracycline	Levofloxacin	Aztreonam	β-lactamase
9	1	0.5	0.015	0.015	0.03	0.06	0.12	8	1	4	0.06	-
17	2	0.5	0.03	0.015	0.06	0.12	0.12	16	1	4	0.25	-
29	1	0.25	0.015	0.008	0.03	0.06	0.25	16	1	2	0.25	-
35	2	0.5	0.06	0.25	0.06	0.5	0.25	8	1	4	4	-

## 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

#### 研究要旨

近年性行動の多様化により、淋菌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、無治療となる場合が多く、咽頭を介して拡散している。また、生殖器淋菌感染症に対して、治療を受けた場合でも、咽頭の淋菌は除菌されにくく、生殖器感染と同様の治療法では咽頭から確実に消失させることは出来ない。前回 cefodizime 1g 単回投与による治療効果を検討したが、cefodizime は、生殖器淋菌感染症に対して、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、除菌率 64% (16/25) となり、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した。咽頭の淋菌に対しては、cefodizime を 2g に増量した場合でも、単回投与では臨床効果は 55% (6/11) にとどまった。患者は初回治療では、全員単回投与を希望したため、連日投与に関する検討を行うことは出来なかった。来院しなくなった 1 名を除いて、cefodizime の再投与により淋菌は消失したため、連日投与を行えば、咽頭の淋菌は除菌可能である。しかし、咽頭に淋菌が感染している場合でも、自覚症状がないため、連日の来院に対して同意が得られないことが問題点である。淋菌咽頭感染は、自覚症状の有無に関わらず、パートナーへ感染させる可能性が高いため、除菌は必須であり、確実な治療法の確立が望まれる。

分担研究者 産業医科大学医学部泌尿器科 教授 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)

赤坂聡一郎 (産業医科大学医学部泌尿器科/助手)

安藤由起子 (安藤ゆきこレディースクリニック/院長)

伊東健治 (いとう泌尿器科クリニック/院長)

川井修一 (かわい泌尿器科/院長)

倉島雅子 (さとうレディースクリニック/院長)

#### A. 研究目的

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。この耐性株の出現により、淋菌感染症の経口薬による治療は、困難となり、日本性感染症学会の治療ガイドラインの推奨薬からも、経口薬は削除された。前年度は、淋菌が咽頭に感染している患者を対象に cefodizime 1g 単回投与による除菌効果を

検討したが、除菌率 64% であった。今回、淋菌咽頭感染患者の除菌方法を確立するため、cefodizime を増量し、臨床試験を実施した。

#### B. 対象・方法

北部九州地区を中心とした多施設共同研究として、2004年1月～2004年8月に、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16歳以上の患者を対象として、咽頭の淋菌の有無について検討を行った。治療は、cefodizime 2g 単回投与または、1g 2-3日間投与とした。投薬終了3から14日後の淋菌培養検査を指標に評価を行った。

#### C. 結果

期間中に咽頭の淋菌陽性患者は、11例登録された。11例のうち3例は他院にて spectinomycin を1または2回投与された患者であり、生殖器の淋菌は消失していた。患者の希望により、11例とも cefodizime 2g 単回投与がなされ、6例で消失が認められたが、5例では淋菌が再度検出された。無効例5例のうち3例は cefodizime 2g 再投与により、消失した。5例のうち1例は、cefodizime 2g 3日間投与によ

り、消失した。残りの1例は、1週間間隔で4回投与したが、淋菌は消失せず、以後再来しなかった。

#### 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 だけである。また、2004年6月には、ceftriaxone も保険適応となった。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。今回咽頭より淋菌が検出された11例中3例も他院にて spectinomycin による治療後の患者であった。そこで、前回 cefodizime 1g 単回投与による治療効果を検討したが、cefodizime は、生殖器淋菌感染症に対して、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、除菌率64%ととなり、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した。咽頭の淋菌に対しては、cefodizime を2g に増量した場合でも、単回投与では臨床効果は55%にと

どまった。患者は初回治療では、全員単回投与を希望したため、連日投与に関する検討を行うことは出来なかった。1名を除いて、cefodizime の再投与により淋菌は消失したため、連日投与を行えば、淋菌は除菌可能である。

#### E. 結論

現在のところ、cefodizime 複数回投与により、淋菌を消失させることは可能であるが、咽頭に淋菌が感染している場合でも、自覚症状がない場合には、連日の来院に対して同意が得られないことが問題点である。淋菌咽頭感染は、自覚症状の有無に関わらず、パートナーへ感染させる可能性が高いため、除菌は必須であり、確実な治療法の確立が望まれる。

#### F. 発表

安藤由起子、村谷哲郎、小林とも子、松本哲朗。淋菌性咽頭感染に対する cefodizime 単回投与の除菌効果。日本性感染症学会第17回学術大会、2004東京

厚生科学研究費補助金[新興・再興感染症研究事業]  
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  
共同研究者 吉川哲史 藤田保健衛生大学小児科  
西井 修 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科  
西澤美香 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科

A. 目的

性器ヘルペスの臨床症状は多彩であり外陰に広汎な病変を作る急性型から極めて小さい病変しか作らないものまである。更に外陰には病変を作らない場合もある。その上、臨床症状が性器ヘルペスと酷似している他の疾患もあり実験室診断は必須である。特に著効を示す抗ウイルス剤が存在するので正しい診断が求められる。

ウイルス感染には病原診断と血清診断があるが、臨床的には前者の方が意義が高い。疫学的調査には血清診断が用いられる。性器ヘルペスの原因となる単純ヘルペスウイルスには1型と2型があり、実験室診断ではこれらを分けて診断できる必要がある。

病原診断としては分離培養法が gold standard であるが、費用と時間がかかることから遺伝子診断法が開発されつつある。今年度は最近開発された遺伝子診断法である LAMP 法と型特異的血清診断法の精度を検討した。

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1月7日までに外陰の症状を訴え、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。診断のために外陰、子宮頸部、

肛門より分離培養を行った検体を用いた。

この研究期間に分離培養を行った例数は555検体である。

検体は細い綿棒で病変部を擦過しこれを5%仔牛血清と抗生物質を含む培養液にすぎ検体とした。その半分をウイルス分離に残りをLAMP法に供した。

(2) 単純ヘルペスウイルス分離と同定：検体を採取した日又は1~2日後に検体を遠心したのち上清をR-66細胞に接種し7~10日間観察しCPEの出現したものについて蛍光抗体法(MicroTrak Herpesまたはデンカ生研製キット)により同定と型の決定を行った。

(3) LAMP法：藤田保健衛生大学小児科吉川哲史氏との共同研究によった。

①今回LAMP法に供した検体を得た症例は25例で平均年齢は35±12才であった。HSV-1によるもの12例、HSV-2によるもの13例であった。HSV-1感染例のうち8例は急性型又は初感染で病変があるが4例は既往の感染例であった。HSV-2感染例のうち2例は初感染で9例は再発例、1例は非初感染初発でいずれも病変があり、1例は既往の感染例であった。これらの症例について外陰と子宮頸管より検体を採取したので計50検体について検討した。

②分離に用いた検体の残りについて DNA 抽出を行いこれを LAMP 法と Real-time PCR にて測定した。LAMP 法では HSV-1、HSV-2 の gG 領域に型特異的なプライマーを設定した。(Enomoto Y et al in press) その感度は HSV-1 が濁度判定により 1000copies/tube、HSV-2 が 10000 copies/tube である。Real-time PCR 法では HSV-1、HSV-2 の gG 領域に型特異的なプライマーを用いてプローブを設定した。その感度は、HSV-1、HSV-2 とも 10 copies/tube であった。

(4) 型別血清診断：初感染性器ヘルペス患者より初診時と 3 週間以降の 2 回採血し血清抗体の陽転率による血清診断の可能性を検討した。HSV-1 分離 19 例、HSV-2 分離 7 例の計 26 例を用いた。非型特異的診断として HSV-1 の lysate を抗原としたデンカ生研キット (IgM、IgG) を用い、型特異的診断として gG-1 又は gG-2 を抗原とする Herpesselect (Focus 社) を用いた。

### C. 結果

【1】性器ヘルペス患者から得た 555 検体のうち陽性検体は 101 検体、陰性検体は 454 検体であった。このうち HSV-1 が 31 検体、HSV-2 が 70 検体であった。

#### 【2】LAMP 法の結果 (表 1)

(1) 50 検体のうち分離法では 22 検体が陽性であったが、LAMP 法では 20 検体が陽性であった。Real-time PCR 法では 30 検体 (1.36 倍) 陽性となった。

(2) HSV-1 による 12 症例のうち外陰から得た 12 検体のうち 7 例が 3 法で陽性であった。子宮頸管から得た 12 検体のうち分離では 3 例が陽性であったが LAMP 法では 2 検体、Real-time PCR 法で

は 5 検体が陽性であった。

(3) HSV-2 による 13 症例のうち外陰より得た 13 検体のうち、分離法では 12 検体、LAMP 法では 11 検体、Real-time PCR 法では 12 検体がそれぞれ陽性であった。

子宮頸管から得た 13 検体では分離法と LAMP 法では陽性検体はなかったが、Real-time PCR 法で 6 検体も陽性となった。

表1 LAMP法、Real-time PCR法の感度

分離した HSV の型	症例数	部位別検体	分離	LAMP	Real-time PCR	
HSV-1	12	外陰	12	7	7	7
		子宮頸管	12	3	2	5
		計	24	10	9	12
HSV-2	13	外陰	13	12	11	12
		子宮頸管	13	0	0	6
		計	26	12	11	18
HSV	25	外陰	25	19	18	19
		子宮頸管	25	3	2	11
		計	50	22	20	30
			(1.0)	(0.67)	(3.67)	
			(1.0)	(0.91)	(1.36)	

(4) LAMP 法の感度と特異度 (表 2) : 分離法との比較では HSV-1 感染例では感度 90%、特異度 100%であり、HSV-2 感染例では感度 92%、特異度 100%であった。しかし Real-time PCR 法と比較すると、感度は HSV-1 感染例で 75%、HSV-2 感染例では 61%と低下したが、特異度はいずれも 100%であった。

表2 LAMP法の精度(分離法との比較)

		<HSV-1>				<HSV-2>	
		分離				分離	
LAMP	+	9	0	LAMP	+	11	0
	-	1	40		-	1	38

感度	90%	92%
特異度	100%	100%
陽性予測値	100%	100%
陰性予測値	98%	82%



### 【3】性器ヘルペス患者の型特異的血清診断(表3)

初感染における型特異的な血清診断効率について検討した。HSV-1 を分離した 19 例では型特異的には 9 例 (47.4%) しか診断できなかったが非型特異的には全例診断できた。HSV-2 を分離した 7 例では型特異的には 7 例全例、非型特異的には 6 例 (85.7%) に診断できた。

表3 初感染における3週間後の血清診の抗体陽転率

分離ウイルス	ヘルペスIgG EIA「生研」	HerpeSelect ELISA IgG
HSV-1	(19/19) 100%	(9/19) 47.4%
HSV-2	(6/7) 85.7%	(7/7) 100%

#### D. 考察

今回の gG 領域に設定したプライマーを用いた LAMP 法では分離法に比べると全体では 91% (20/22) であり、HSV-1 感染例 90% (9/10)、HSV-2 感染例 92% (11/12) であった。この結果は感度としてはかなり分離法に近いものと考えられる。また型別診断は全例において正しく特異度もよいと云える。従って臨床的に十分用いることが可能である。しかし、Real-time PCR 法に比べると LAMP 法の感度はかなり低くなった。これは検出感度が Real-time PCR 法は HSV-1 では 100 倍、HSV-2 では 1000 倍も優れているので当然の結果である。

それでは Real-time PCR 法を臨床の場に応用すればよいのかと云うと、今回のデータで子宮頸管から 3 例しか分離できなかったのに Real-time PCR 法では 11 例も陽性となり 3.67 倍であった。

分離陰性で PCR 法陽性の症例についてどのように管理するのか改めて検討する必要がある。

血清抗体を用いて診断する場合には急性期と回復期のペア血清で行うが、今回デンカ生研キットでは、HSV-1 分離例では 100%診断できたが、HSV-2 分離例では 85.7%であった。これはデンカ生研キットが HSV-1 抗原を用いているためと考えられる。しかし、HSV-1 感染例では 47.4%しか診断できなかった。これは HSV-1 の感染により産生される gG-1 抗原の産生がおくれるか、量的に少ないか、キットの感度が悪いかの理由が考えられる。

#### E. 結論

LAMP 法は感度・特異度とも分離培養法に劣らず臨床検査として用いることができる。

血清診断は急性期では難しく、回復期の血清との比較によって可能である。但し、型特異的診断では、HSV-1 の gG-1 抗体の出現が悪いので困難な場合があるが gG-2 抗体の出現はよく、感染後 21 日目以降では 100%可能であった。

#### F. 発表

##### 原著論文

1. Enomoto Y, Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Miyake F, Usui C, Suga S, Suzuki K, Kawana T, Nishiyama Y, Asano Y. Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol 2005;43:951-5.
2. Sugiyama H, Yoshikawa T, Ihira M, Enomoto Y, Kawana T, Asano Y. Comparison of loop-mediated isothermal amplification, real-time PCR, and virus isolation for the detection of herpes simplex virus in genital lesions. J Med Virol 2005;75:583-587.
3. Yoshida Y, Li Z, Kurokawa M, Kawana T, Imakita M, Shiraki K. Growth of herpes simplex virus in epidermal

keratinocytes determines cutaneous pathogenicity in mice.

J Med Virol 2005;75(3):421-6.

4. Kawana T.

29 years' experience of clinical and virological studies on female genital herpes in Japan

HERPES 11 (1) 2004;21-22.

5. 川名 尚.

ウイルス性感染症－性器ヘルペスと尖圭コンジローマ－

東京都医師会雑誌 2004-5 (4.5月合併号)

6. 西澤美香、村田照夫、長谷部敏朗、柿沼三郎、綾部琢哉、西井 修、川名 尚.

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、

日本性感染症学会誌 2004;15:144-148.

7. 川名 尚.

性器ヘルペスの血清診断、

ENTONI 2004;43:50-55.

#### 学会発表

1. 川名 尚：

「性器ヘルペスの実験室診断の問題点」

第45回日本臨床ウイルス学会、大阪、2004

2. 杉山博子、吉川哲史、榎本喜彦、秋元史帆、鈴木竜太、臼井千絵、三宅 史、須賀定雄、浅野喜造、井平 勝、川名 尚：

「性器ヘルペス迅速診断法としての HSV 型特異的 LAMP 法の有用性」

第45回日本臨床ウイルス学会、大阪、2004

3. 西澤美香、川名 尚、村井照夫、西井 修：

「性器ヘルペスの血清診断法における ELISA 法の評価」

第17回日本性感染症学会、東京、2004

## Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による HPV DNA 検出の試み

萩原正則, 佐々木一, 松尾光馬, 本田まりこ (慈恵医大青戸病院 皮膚科)

### <背景>

ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus; 以下 HPV) はパポバウイルス科に属する小型の DNA ウィルスであり, ゲノム DNA の塩基配列の違いにより 100 型以上の遺伝子型に分類される。

尖圭コンジローマは, HPV6 型や 11 型などの low risk ローリスク/粘膜型 HPV が外陰部や肛門部など皮膚粘膜移行部に感染して生じる良性腫瘍である。診断は臨床像からつくことが多いが, 皮膚や粘膜に生じる腫瘍は多種存在し, 臨床像のみの診断では不完全であり, 組織診断とウイルス学的検査を行う必要がある。また子宮頸癌との関連が強い high risk 型 HPV が検出される例や組織学的に表皮内癌である bowenoid papulosis などがあり, 遺伝子型の同定が望まれる。

ウイルス学的検査には組織切片上で DNA を検出する in situ hybridization 法 (以下 ISH 法) や, サンプルから DNA を抽出して行う Southern blot hybridization 法, PCR 法などがある。ISH 法は検出感度が低いという欠点があり, 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。

### <目的>

LAMP (Loop-mediated Isothermal

Amplification) 法は, PCR 法に代わる安価, 迅速, 簡易な増幅法として, 2000 年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 法と同等以上の増幅効率, 感度を実現している。反応は等温 (65°C 付近) 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, 全行程が約 1 時間の 1 ステップで終了する。

今回, 我々は HPV - 6, 11, 16, 18 型各々のプライマーを設計し, 特異性, 感度, PCR 法との比較について検討した。

### <材料と方法>

#### ①検体の採取

尖圭コンジローマと診断された 8 名及び尋常性疣贅 1 名の病変部 (男 7 名女 1 名, 23~48 歳, 平均 35.9 歳) よりデルマパンチ<sup>®</sup>3mm を使用し組織検体を採取した。検体を半割し, 二つのマイクロチューブ (一方は 1ml 蒸留水入り) に分注した。尖圭コンジローマ 8 名のうち 3 名に対しては 27G 針による穿刺検体と綿棒による擦過検体をそれぞれ採取した。検体は蒸留水 1ml に保存した。

#### ②DNA 抽出

尖圭コンジローマ 8 名と尋常性疣贅 1 名を合わせた組織検体 8 検体 (蒸留水のないマイクロチューブ) に対して, QIAampDNA Mini Kit を用いてプロトコールに従い DNA の抽出を行った。

穿刺検体3検体と擦過検体3検体に対しては、QIAampDNA Blood Mini Kitを用いてDNAを抽出した。

### ③DNA非抽出

蒸留水入りマイクロチューブに分注した組織検体8検体及び穿刺検体3検体、擦過検体3検体を、DNA抽出を省略した迅速診断としての材料とした。

### ④LAMPプライマーのデザイン

プライマーセットは、GC含量、二次構造の形成に注意し、プライマーの安定性を重視し作製した。HPV6型、HPV11型、及びHPV16型は、E1領域に、HPV18型はL2領域に設計した。

### ④LAMP法

基質と反応 Buffer, 鎖置換型 DNA Polymerase と HPV-6, 11, 16, 18 型の各々のプライマーを含む反応溶液 23  $\mu$ l に、前記の検体 2  $\mu$ l を添加して 63°C の等温で 120 分間行った。濁度測定装置 (LA200: TERAMECS 社) で濁度判定し、更に 2%アガロースゲル電気泳動で確認した。

### ⑤PCR法

LAMP法の結果の比較として、吉川らに従いPCR法によるHPVのタイピングを行った。基質と反応 Buffer, 鎖置換型 DNA Polymerase と L1C1, L1L2, L1C2M プライマーを含む反応溶液 98  $\mu$ l に、前記の DNA 抽出検体 2  $\mu$ l を添加した。95°C 1.5m, 48°C 1.5m, 70°C 2.0m, 40 サイクルで増幅した。Dde I, Rsa I にて制限酵素処理し、4%アガロースゲルで電気泳動し、泳動パターンで型判定を行った。

### <結果>

PCR法では14検体中11例HPV6型

を、1例16型を検出した。いずれも組織による検体であり、擦過、針検体は検出されなかった。

一方LAMP法では、HPV6プライマーにて、全14検体中PCR法で検出できなかった擦過、組織検体を含む11例で濁度の上昇を認めた。0.1以上になる増幅時間は40分54秒~71分36秒(平均51分9秒)であった。しかしcontrolであるHPV11型もクロスし陽性となった(表1)。これを電気泳動で確認すると、検体12,13,14,尋常性疣贅,精製水,controlのHPV16,HPV18を除いてラダー状にバンドが見られた。

HPV11プライマーではPCR法でHPV6型とタイピングした症例のうち1例を除く6例(51分30秒~96分6秒,平均76分8秒)で陽性であった(表2)。

HPV16プライマーではPCR法の結果と一致し14例中1例でDNA抽出(56分36秒),非抽出(70分48秒)ともLAMP法で陽性であった(表3)。

HPV18プライマーでは陽性例はなかったが、ポジティブコントロールのみ陽性となった(表4)。

DNA抽出を省略した場合でも、HPV6プライマーで、14検体中8例(40分24秒~70分12秒,平均57分25秒),HPV16プライマーで、14検体中1例(70分48秒)において濁度での検出が可能であった。

針穿刺検体、擦過検体とも、それぞれ3検体中2例においてHPV6プライマーで検出された。

HPV6プライマーでの組織検体DNA抽出群において、PCR法と比較したLAMP法の感度は100%、特異度も100%であった。