

Patel R et al. : *Genitourin Med* 73 : 105-109, 1997.

図3 再発抑制療法による再発回数の改善

れていることもある。しかし、いずれにせよ無症候のHSV排泄はHSV感染の疫学を考える時、重要な因子と考えてよい。

筆者はHSV感染のスペクトラムを図2のように考えている。ここには宿主の免疫能とHSVの量という2つの因子を考えに入れた。初感染により発症した後、HSVは潜伏感染状態に入るが、これがしばしば再活性化され、もし免疫で抑制できないと再発という形をとる。免疫が上がってくると症状は次第に出にくくなる。しかし、少量のHSVは何らかの原因による広い意味での局所的、時には全身的な免疫力の低下とともに再活性化されHSVが排泄されることになる。この無症候でHSVを排泄する期間はかなり長いであろう。そして恐らく最終的にはHSVの排泄はなくなることもあるであろう。

ただ、個人差が大きく、人によっては臨床的に再発をくり返す頻度が高く、またその時期が長く続くこともある。以上のようにHSV感染では潜伏しているHSVが再活性化される頻度は高いと思われるが、症状がなければ治療の対象にする必要はないであろう。また現在のところ、潜伏感染しているHSVを排除できる手段もない。

006 ● 006 — 臨床と微生物 Vol.32 No.1 2005.1.

■再発の治療と抑制療法

性器ヘルペスの再発をくり返すと患者は肉体的・精神的に多大のストレスとなる。再発により外性器の不快感・違和感・疼痛があり、それだけでQOLが損なわれる。このような肉体的な障害以上に精神的なストレスが大きい。いつ再発するかという不安。他人に感染させてしまうのではないかという心配。特に子どもなどの家族への感染の心配。若い女性の場合、将来結婚できないのではないかという気持ちになり自殺まで考えたという例もあった。

再発に対して、現在以下のような3つの治療法が考えられている。

- ①症状が出現した時に抗ヘルペスウイルス薬を用いて治療する(episodic treatment).
- ②症状が出現する前の前兆のある時に抗ウイルス薬を服用して発症を抑える(patient initiated treatment).
- ③継続的に抗ウイルス薬を服用することにより発症を抑える抑制療法(suppressive treatment)である。

現在本邦において保険で治療できるのは①のみ

である。

年6回以上頻りに再発をくり返す場合は、世界的に抑制療法が推奨されている。CDCのガイドラインや、ハリソンの内科書などにすでに記載されて確立された治療法であるが、本邦では残念なことに保険適用にはなっていない。具体的には、acyclovir 400 mgを1日2回、またはvalacyclovir 500 mgを1日1回、毎日継続的に服用する。図3にはvalacyclovirを用いた抑制療法の効果を示した。プラセボに比べて再発率は70%抑制されている⁹⁾。長期に服用するのでその副作用が心配されるが、6年にわたって服用した例では、副作用はなかったと報告しているため、それほど心配はいらないようである。

Valacyclovirによる抑制療法には、もう一つ大きな効用が認められた。それは、本薬を服用するとHSVに感染していない性交の相手に感染させる率が有意に減ったということである¹⁰⁾。このことは、くり返し再発する患者では再発を抑えるだけでなく、もう一つの心配事、すなわち他人への感染の心配もなくすることができるのである。

これらの利点を考えると、日本でも早く本療法が行えるようになってほしいものである。現在、日本感染症学会と日本化学療法学会から厚生労働省に保険で本療法が行えるように要望書を提出している。

潜伏感染と再活性化という巧みな作戦により、人類に広く感染してきた単純ヘルペスウイルスは誠に賢いといわざるを得ない。このようなウイルスに対して私達はどのように対処すればよいのであろうか。

その根絶は不可能であるので、障害を与える部

分をいかに乗り切るかが当座の戦略といえるかも知れない。ただ、HSVの再活性化には角膜の疾患や髄膜炎、脳炎など中枢神経の疾患とも関連しているもので、再活性化の感染病理と、それによる障害をいかに予防するかは、今後解決しなければならない課題である。

- 1) 鳥羽和憲：血清疫学の面から。ヘルペスウイルス感染症，pp161-172，森 良一，川名 尚編，メディカルトリビューン，東京，1986。
- 2) Smith JS, Robinson NJ: Age-specific prevalence of infection with herpes simplex virus types 2 and 1: a global review. *J Infect Dis* 186 (suppl 1): S3-28, 2002.
- 3) 川名 尚：性器ヘルペスウイルス感染症。産婦人科の実際 49: 1365-1373, 2000.
- 4) 川口 寧：遺伝子発現制御機構。日本臨床 58: 779-786, 2000.
- 5) Feldman LT, Ellison AR, Voytek CC *et al.*: Spontaneous molecular reactivation of herpes simplex virus type 1 latency in mice. *PNAS* 99: 978-983, 2002.
- 6) Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti JV *et al.*: Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection. Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med* 316: 1444-1449, 1987.
- 7) Umene K, Kawana T: Molecular epidemiology of herpes simplex virus type 1 genital infection in association with clinical manifestations. *Arch Virol* 145: 505-522, 2000.
- 8) Corey L: The current trend in genital herpes. Progress in prevention. *Sex Transm Dis* 21: S38-S44, 1994.
- 9) Patel R, Bodsworth NJ, Wolley P *et al.*: Valaciclovir for the suppression of recurrent genital HSV infection: a placebo controlled study of once daily therapy. *Genitourin Med* 73: 105-109, 1997.
- 10) Corey L, Wald A, Patel R *et al.*: Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of Genital Herpes. *N Engl J Med* 350: 11-20, 2004.

* * *

性器ヘルペスの診断と治療

—最近の動向—

川名 尚* 塚越 静香* 西井 修*

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) 1型 (HSV-1) または2型 (HSV-2) によって発症するウイルス性感染症である。最近の厚生労働省感染症サーベイランスによると、特に若い女性を中心にこの10年間に漸増の傾向にあり、年間約5万例の発生があり、性感染症の中では性器クラミジア感染症に次いで第2位を占めている。

本稿では診断と治療の最近の動向について述べたい。

1. 感染病理と臨床症状

単純ヘルペスウイルスはヘルペスウイルス科に属するDNAウイルスで、大きさは直径約150～200 nmである。抗原性の差異と生物学的特徴か

Kawana Takashi

* 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科
(〒213-8507 神奈川県川崎市高津区溝口3-8-3)

らHSV-1・HSV-2とに分類される。HSVは性器の粘膜や皮膚から感染すると局所で増殖し、速やかに知覚神経を上行し仙髄神経節(知覚神経節)に到達する。仙髄神経節で増殖した後に知覚神経を下降し、再び外陰の皮膚・粘膜に現れ、ここで増殖して水疱性または潰瘍性の病変を形成する。潜伏しているHSVは時々再活性化し外陰に現れるが、多くの場合、宿主の免疫により増殖が抑えられる。しかし、局所的・全身的な免疫が低下すると増殖することになり、病変を形成する。

性器ヘルペスは臨床的に初発と再発に分けられる。初発は初めて症状が出現した場合を言い、再発はすでに発症した既往のある場合を言う。

初発には初めてHSVに感染した場合(これを初感染初発と呼ぶ)と、すでに無症候で感染していたHSVの再活性化により初めて症状が現れる場合(これを非初感染初発と呼ぶ)がある。前者は発症時に抗体は陰性であるが、後者ではIgG抗体が陽性なので区別ができる。

性器にはHSV-1とHSV-2ともに感染するので感染病態から性器ヘルペスを分類すると表1のようになる。

性器のHSV感染の臨床症状のスペクトラムは大変広く、外陰部全体に潰瘍性病変が多発し、発熱・全身倦怠感を伴う急性症状からごく小さな水疱、さらにはまったく無症状でHSVを排泄する

ものまである。このような状況を考慮して表2のような臨床分類を考えている。HSVは性器だけでなく神経節にも感染するため神経症状も出現し、多彩な症状を呈する。

2. 性器ヘルペスの診断

日常臨床においては、性器に出現した症状または病変がHSVの感染によるか否かということを決めることがまず求められる。一方では、ある病変が一見性器ヘルペス様に見えるが、別の疾患であることの判断も求められる。正しい診断をつけることはHSVに著効を示す抗ウイルス剤がある

ので特に重要である。

典型的な性器ヘルペスにおいては臨床症状や問診のみにて診断が可能ではあるが、実際は外陰に潰瘍性病変が対称性に多発する典型例はむしろ少なく、単発のことがあったり、潰瘍が線状のものもある。中にはピンホール程度のごく小さいものまである。多彩な症状を示すので、他の疾患と区別することも大切で、症状だけで確定診断することはかなり危険である。外陰に潰瘍性・水疱性病変を形成する疾患やヘルペス様に見誤る疾患には表3のような疾患があり、これらと鑑別する必要がある。特に急性外陰潰瘍(Lipschütz潰瘍)が性器ヘルペス急性型と誤診されることが多いので注意を要する。鑑別診断の要点は成書に譲るが、かなり紛らわしいことも多く、実験室診断が必須

表1 感染病態からみた性器ヘルペスの分類

臨床分類	感染病態
初 発	初感染 HSV-1 初感染
	初感染 HSV-2 初感染
	非初感染 HSV-1 非初感染初発
	非初感染 HSV-2 非初感染初発
	非初感染 HSV-2 初感染 (HSV-1 既感染)
再 発	HSV-1 再発
	HSV-2 再発

表2 性器ヘルペスの臨床分類 (川名)

〈外陰型〉	
(1) 分類	a) 初発 b) 再発
(2) 亜分類	a) 病変の広さ (i) 汎発型 (10個以上) (ii) 中間型 (5~9個) (iii) 限局型 (1~4個) b) 発熱 (i) 有 (ii) 無 c) 鼠径リンパ節腫脹・圧痛 (i) 有 (ii) 無
〈特殊型〉 外陰病変がなく、以下の症状がある	
(1)	子宮頸管炎
(2)	膀胱・尿道炎
(3)	神経症状 (Elsberg症候群・髄膜炎) のみ

となる。

3. 性器ヘルペスの実験室診断 (検査)

一般にウイルス感染の診断には、ウイルスを直接証明する病原診断と血清抗体による血清診断が用いられる。

性器ヘルペスの実験室診断には病原診断が圧倒的に有意義である。その理由は、初感染においては急性期には抗体は検出されず、回復期(第7～10病日)になって初めて陽転し診断できるようになるが、この間の症状の強い時期は診断ができない。また非初感染初発や再発例では血清抗体の上昇はほとんどないので、これまた血清診断は難しい。そこで病原診断が必須となる。

1 病原診断 (表4)

病原診断は、①ウイルスの分離同定、②ウイルス特異抗原の検出、③ウイルスの核酸検出法(PCR法等)などが用いられる。

①ウイルスの分離同定

病変部より採取した検体を培養細胞(Vero細胞など)に接種し、培養する。翌日より細胞を観察し、細胞が円形化する細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)が見られれば何らかのウイルスの感染が疑われる(写真1)。そこでHSV特異的なマウスモノクローナル抗体を用いて同定と型の決定を行う。もっとも確実な方法であるが検出までに2～7日とかかり、人手と設備があるので

一般の施設で行えるわけではないのが難点である。また保険適応外で高価である。

②抗原検出法

病変部を擦過し、これを無蛍光スライドに塗沫、HSV-1またはHSV-2に対する蛍光標識モノクローナル抗体を用いてスミア中のHSV感染細胞を検出・同定する方法で、HSV-1感染かHSV-2感染かも判別できる¹⁾。保険適応もあり、1時間くらいで結果が出るので、蛍光顕微鏡のある施設では迅速に検査ができる。水疱性病変では陽性率が高いが、小さい潰瘍性病変や痂皮では陽性率がかなり低く30%程度の診断率である。

この方法は感度が非常に悪いため、感度と特異度の良い、日常診療で容易に使える新しい方法の出現が待たれてきた。それに応える方法として核酸検出法が登場してきた。

③核酸検出法

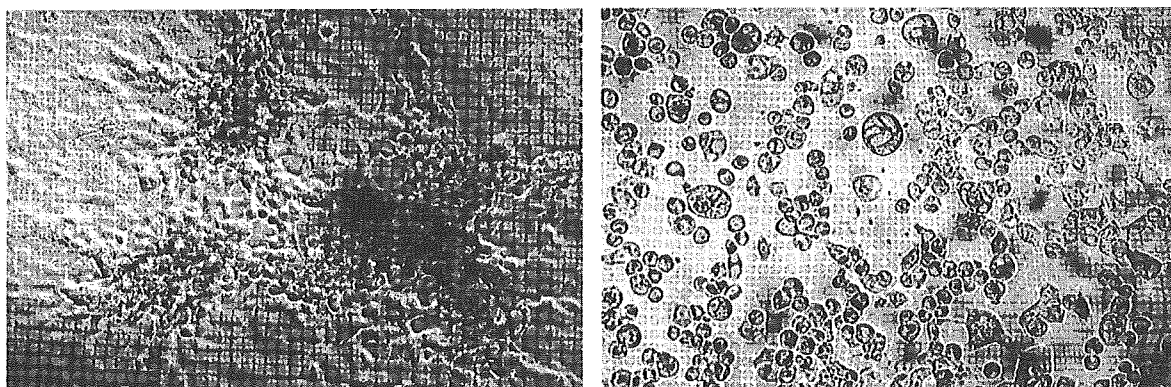
HSV特異的な塩基配列をプライマーとして設定し、その間のDNAをPCR(polymerase chain reaction)法などで増幅して判定する方法で、き

表3 性器ヘルペスと間違えやすい疾患

1	急性外陰潰瘍(Lipschütz)またはBehçet病
2	性器カンジダ症
3	梅毒
4	外陰癌
5	Paget病
6	細菌性外陰炎
7	接触性皮膚炎
8	硬化性苔癬
9	湿疹
10	その他

表4 性器ヘルペスの病原診断法

	ウイルス分離	蛍光抗体法	PCR法	LAMP法
感度	高	低	高	高
特異度	高	高	高	高
所要時間	2～7日	1時間	1～2時間	15分～1時間
長所	感染性の証明 ウイルス採取可能	安価	超高感度	超高感度 (安価)
短所	時間と設備がかかる	低感度	DNAの一部のみ コンタミネーション	DNAの一部のみ コンタミネーション



HSV-1

HSV-2

写真1 HSV-1またはHSV-2による細胞変化

わめて微量な検体からも検出できる²⁾。この方法は非常に鋭敏であり、特異性も高く、しかも検体の搬送も容易であり、要する時間も短く、病原診断として大いに期待される。ただ、あまりに鋭敏であるため検体採取時や実験室内のコンタミネーションに由来する偽陽性が出やすいこと、また検出しているのは感染性病原体そのものでなく、核酸のごく一部を増幅・検出しているだけなので、臨床的意義に関して慎重に検討する必要があることなどの問題がある。

以前はプライマーで増幅し、制限酵素切断パターンで同定・型別が行われていたが、最近では生成される増幅産物の増加に応じて蛍光を発するように設計し、PCR中に増加していく蛍光シグナルをリアルタイムにモニタリング検出する“real time PCR”法も用いられている。この方法は定量性があるためその用途は広くなり、期待も大きい。また最近、新しい核酸増幅法として、PCRのように温度変化を必要とせず、60～65°Cの一定温度で増幅させる“LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法”が開発されてきた³⁻⁵⁾。現在のところLAMP法は定性反応であるが、定量性も期待できるので診断だけでなく、治療効果の判定や予後判定にも利用されいくと考えられている。

2 血清診断

血清診断法として通常用いられるものには、補体結合反応 (complement fixation : CF) ・中和反応 (neutralization test : NT) ・ELISA 法 (enzyme linked immunosorbent assay) 等がある。血清診断の利点は病変が治癒傾向にあるため、病巣から直接ウイルス検出することが困難な場合にも可能という点である。

ELISA 法がもっとも感度が高く、IgG ・ IgM クラス別の抗体測定も可能である。

前述のように血清診断の臨床的な意義は低く、さらに、HSV 抗体が陽性である (不顕性感染) 成人は人口の約 50 % もいるので、抗体が陽性であることだけで直ちに当該病変や症状が HSV 感染によるものとは診断はできない。しかし、IgM 分画の特異抗体は一般人口中の保有率は低く、初感染では第 11～15 病日以降 HSV-1 ・ HSV-2 感染例ともほぼ 100 % 近く検出できるので、時に診断の補助となる⁶⁾。

近年ウイルスの最外側にあるエンベロープの糖タンパク質の中の gG は型特異性が見られることが明らかとなり、この抗原を用いて抗体を測定することで、患者の感染している HSV の型判定ができるようになった^{7,8)}。それにより表 1 に示したような性器ヘルペスの感染病態の詳細を解析することが可能になった。現在本邦ではまだ認可さ

表5 性器ヘルペスの薬物治療

〈初発〉	
アシクロビル 200 mg/錠	1日5回 経口 5～10日間
または	
バラシクロビル 500 mg/錠	1日2回 経口 5～10日間
重症例	
静注用アシクロビル 5 mg/kg/回	1日3回点滴静注 5日間
その後、経口剤に変える	
〈再発〉	
アシクロビル 200 mg/錠	1日5回 経口 5日間
または	
バラシクロビル 500 mg/錠	1日2回 経口 5日間
軽症例	
3%ピタラビン軟膏	1日3～5回塗布 5～10日間
または	
5%アシクロビル軟膏	1日3～5回塗布 5～10日間

れていないが、将来は表1のような分類によって臨床的な管理が行えるようになるであろう。

型特異的抗体の検出により感染しているHSV-2とわかることは臨床的に次のような意義がある。

① HSV-2による感染はHSV-1よりも再発しやすく、患者に予後を話す時の参考になる⁹⁾。

② HSV-2はより神経向性が強く、髄膜炎、膀胱・直腸麻痺を伴うElsberg症候群になりやすい。

4. 性器ヘルペスの治療 (表5)

性器ヘルペスはHSVの増殖を宿主の免疫が抑制するので自然治癒する疾患である。しかし、HSVの増殖を薬剤によって抑制すればより早く治癒に導くことができる。

HSVの増殖を特異的に抑制する抗ヘルペスウイルス剤であるアシクロビル(ゾピラックス[®])が著効を示す。また、バラシクロビル(パルトレックス[®])はアシクロビルの腸管吸収性を改善したプロドラッグであるが、2002年9月の適応追加により性器ヘルペスにも使用可能となった。服

薬回数を減らしても血中濃度を保つことができるのでコンプライアンスが良く、その使用が広がりつつある。

抗ウイルス薬自体の副作用は、頭痛・嘔気・下痢などの軽い副作用が少数報告されている。今までは、重大な副作用や他の医薬品との相互作用も報告されていない。ただ腎より排泄されるので、腎機能の悪い場合には使用量を減らす必要がある。以下に、日本性感染症学会ガイドライン2004に提言された治療について述べる¹⁰⁾。

①初 発

アシクロビル錠200 mgを1回1錠、1日5回、またはバラシクロビル錠500 mgを1回1錠、1日2回を5日間投与するのが一般的である。もし治らない時にはさらに数日間延長する。重症例では点滴静注用アシクロビルを用いる。

治療はできるだけ速やかに開始することが望まれる。治療開始が遅れると効果が減弱し、病変が出現して7日以上経過している場合、有効性は確認されていない¹¹⁾。抗ウイルス療法を行うことで、ウイルス増殖を抑制し、症状の持続時間を短縮することができ、また、病変の速やかな治癒・痛みなどの消失をもたらす。米国のCDCの最新ガイドライン¹²⁾では、仙髄神経節でのHSVの増殖を極力抑えておくことが将来の再発の頻度を減

らすのに役立つ可能性があるとき、7～10日間の投与を勧めている。

②再発型

再発型では症状が軽いこともあり、投与期間は5日間である。ただし、この場合もなるべく早く治療を開始することが大切で、発症してから1日以内に服用開始しないと有意な効果が得られないと言われている。

再発する前の前兆がある時に服用すると再発させないで済むことが多く、予め患者に薬剤を渡しおき、前兆が見られたら直ちに服用させる先制療法はQOLの改善に役立つ。早川らによると、予めバラシクロビルを前もって患者に渡しおき、前駆症状が発現したら24時間以内に服用を開始するように指示したところ、前駆症状発現後6時間以内に服用開始した群では12～24時間後内服群と比べ治癒までの日数が1日短縮可能であった¹³⁾。

軽症例に対してはアシクロビル含有軟膏(ゾビラックス®)・ピダラビン含有軟膏(アラセナーA®)を用いてもよい。

③再発対策

性器ヘルペスの最大の課題が再発である。再発は肉体的のみならず、精神的な大きなストレスとなり、QOLを低下させている¹⁴⁾。再発に対する対策として抑制療法が行われるようになった^{10,12)}。

抑制療法は抗ヘルペスウイルス薬を継続的に服用するもので、年6回以上の頻繁に再発を繰り返す重症例や患者が再発により精神的・心理的にダメージを受けている場合に用いる。CDCはアシクロビル400mgを1日2回か、バラシクロビル500mgを1日1回服用する方法を勧めている¹²⁾。もし治療期間中に再発した場合には、発症時治療量に増量して治療を行い、治癒とともに抑制療法用量に戻す。

Coreyらは、1日1回バラシクロビル500mgを8カ月間内服することで、性器に排泄されるHSV-DNAの検出率はプラセボが10.8%であ

ったのに対し、2.9%まで減少したと報告している。その結果、パートナーへの感染率もプラセボの3.6%から1.9%に減少したとしている¹⁵⁾。

抑制療法は再発の頻度を減らし、また、無症候性のウイルス排泄を減少させると考えられ、すでに53カ国で日常臨床に用いられているが、現在、日本では保険の適用にはなっていない。そこで日本性感染症学会と日本化学療法学会が中心となって本法が保険適応となるよう要請している。

おわりに

本疾患は性感染症の一つであることと、性器に慢性的に再発を繰り返すことから、患者にもたらす身体的・精神的苦痛は非常に大きいと思われる。しかし、現時点では診断のための良い方法がないので、今後、簡便で有用な検査法が開発され、一般的に使用されるようになり、正確な診断・予後を判定できるようになることが望まれる。これらを基にして患者に情報提示ができるようになることが肝要である。また、再発の予兆を把握し早めに薬剤を服用して再発を防ぐ先制療法や、さらに、QOLの改善や感染のリスクを下げられる抑制療法という選択肢があることなどの情報提供を行うべきであろう。

文献

- 1) 川名 尚, 他: 蛍光標識モノクローナル抗体 (MicroTrak Herpes) による単純ヘルペスウイルス感染症の診断. 感染症会誌 61: 1030-7, 1987.
- 2) Stellrecht KA: Nucleic acid amplification technology for the diagnosis of genital herpes infection. Expert Rev Mol Diagn 4 (4): 485-493, 2004.
- 3) Enomoto Y, et al: Rapid diagnosis of herpes simplex virus infection by a loop-mediated isothermal amplification method. J Clin Microbiol 43 (2): 951-955, 2005.
- 4) Kaneko H, et al: Sensitive and rapid detection of herpes simplex and varicella-zoster

- virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 43 (7): 3290-3296, 2005.
- 5) 塚越 静香, 他: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による性器ヘルペス迅速診断 (婦人科感染症学会誌投稿中).
 - 6) 小泉佳男, 他: 女性性器の単純ヘルペスウイルス初感染における抗体推移に関する研究. *日産婦誌* 51 (2): 65-72, 1999.
 - 7) Lee F, et al: Detection of herpes simplex type 2-specific antibody with glycoprotein G. *J Clin Microbiol* 22: 641-644, 1985.
 - 8) Ashley R, et al: Comparison of Western blot and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting HSV-1 and HSV-2 antibodies in human sera. *J Clin Microbiol* 26: 662-667, 1988.
 - 9) Kawana T, et al: Clinical and virologic studies on female genital herpes. *Obstet Gynecol* 60: 456-461, 1982.
 - 10) 性感染症・診断・治療ガイドライン2004. 日本感染症学会誌 15 (1): 17-20, 2004.
 - 11) Barton S: A guide to the diagnosis and management of genital herpes. Mosby-Wolfe medical communications, London, 1988.
 - 12) CDC: Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2002. *MMWR* 51 (RR 06): 1-78, 2002.
 - 13) 早川謙一, 他: バルトレックス (塩酸バラシクロビル) を用いた再発型性器ヘルペスの発症時治療における早期服用開始の有用性検討. *臨床医薬* 21 (2): 205-213, 2005.
 - 14) Patel R, et al: Impact of suppressive antiviral therapy on the health related quality of life of patients with recurrent genital herpes infection. *Sex Transm Infect* 75: 398-402, 1999.
 - 15) Corey L, et al: Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med* 350: 11-20, 2004.

母子感染の立場からみた本学学生の抗体保有率の評価

川 名 尚・宮 本 智 子・加 藤 真 子
曲 山 さち子・西 澤 美 香・冲 永 荘 一

帝京平成短期大学紀要 第15号 抜 刷

平成 17 年 3 月

母子感染の立場からみた本学学生の抗体保有率の評価

川名 尚¹⁾・宮本 智子¹⁾・加藤 真子¹⁾
曲山 さち子¹⁾・西澤 美香²⁾・沖永 莊一¹⁾

1) 帝京平成短期大学 2) 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科

妊娠中に感染すると異常児が出生することがある感染症が多く知られるようになった。中でも代表的なものが風疹、トキソプラズマ、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトパルボウイルスB19などである¹⁾。

妊娠する前に既に免疫(抗体)を有していればこのような感染症に妊娠中に罹患することはない。つまり、抗体陰性者がハイリスクということになる。

将来妊娠することになる若い女性のこれらの感染症に罹患するリスクを知っておくことは、公衆衛生的及び母子衛生的な立場から重要なことである。

今回、本学の看護学科の女子学生の抗体陽性率、または陰性率を調査する機会を得たのでその結果を報告し考察を加えたい。

対象と方法

(1) 血清検体

a) 説明と同意

看護学生は実習に入る前に院内感染を予防するため小児伝染病(風疹、水痘、麻疹、流行性耳下腺炎)並びに結核に対して免疫があるか否かを調べ免疫のない者には実習前にワクチンを接種しておくように指導している。この検査に際し上記の抗体を測定した後の残った血清を用いて公衆衛生的な立場から母子感染のリスクについての検討を行いたい旨の説明会を平成15年11月12日に行った。

説明の内容としては「検体はプライバシー保護のためにすべて血清抗体を第三者がコード化して用いること。血清抗体の測定は、トキソプラズマ、風疹、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、パルボウイルスB19について行うこと」であった。この時にこの研究のために血液を利用することに同意が得られるか否かの意志を表わす同意書をわたした。

平成15年12月3日、並びに8日に看護学科2年の合計200名より採血したがその時に同意書を提出して貰った。前述の実習前の検査を行った後、同意の得られなかった27

名の血液を廃棄し、残りの173名(86.5%)の血清をコード化して抗体測定に供した。

(2) 抗体測定法

抗体測定は、ELISA法を用い手技は添付文書に従って行った。いずれもIgG抗体を測定した。測定は帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科において行った。

1) トキソプラズマ抗体

プラテリアトキソ IgG (TMB) (Bio-Rod) を用いた。

抗体価 9 IU/ml 以上を陽性とした。

2) 風疹ウイルス抗体

デンカ生研 “ルベラ IgG (II)-EIA 「生研」” を用いた。

抗体価4以上を陽性とした。なお、風疹については、HI抗体をSRL社で測定したのもも参考にした。

3) サイトメガロウイルス抗体

デンカ生研 “サイトメガロ IgG(II)-EIA 「生研」” を用いた。

抗体価 4 以上を陽性とした。

4) 単純ヘルペスウイルス抗体

デンカ生研 “ヘルペス IgG(II)-EIA 「生研」” を用いた。

抗体価4以上を陽性とした。

5) パルボウイルスB19抗体

デンカ生研 “パルボ IgG(II)-EIA 「生研」” を用いた。

COI : 1.0以上を陽性とした。

結果

病原体	方法	陽性者 (%)	陰性者 (%)
トキソプラズマ	ELISA	3 (1.7%)	170 (98.3%)
風疹ウイルス	HI	165 (95.4%)	8 (4.6%)
	ELISA	164 (94.8%)	9 (5.2%)
サイトメガロウイルス	ELISA	110 (63.6%)	63 (36.4%)
単純ヘルペスウイルス	ELISA	60 (34.7%)	113 (65.3%)
パルボウイルスB19	ELISA	107 (61.8%)	66 (38.2%)

1) トキソプラズマ抗体

抗体価9以上の陽性者は3名(1.7%)で陰性者は170名(98.3%)であった。抗体価6~9の判定保留者は2名で、若しこれらも陽性とするとも5名(2.9%)が陽性ということになった。

2) 風疹ウイルス抗体

抗体価4以上の陽性者は164名(94.8%)で、陰性者は9名(5.2%)であった。抗体価10以下のワクチン接種候補者は20名(11.6%)であった。HI抗体でみると8未満の陰性者は8名(4.6%)であった。

3) サイトメガロウイルス抗体

抗体価4以上の陽性者は110名(63.6%)で、陰性者は63名(36.4%)であった。

4) 単純ヘルペスウイルス抗体

抗体価4以上の陽性者は60名(34.7%)、判定保留が4名(2.3%)、陰性者が109名(63.0%)であった。

5) パルボウイルスB19抗体

抗体陽性者が107名(61.8%)で、陰性者が66名(38.2%)であった。

考察

今回5つの病原体の抗体保有率を173名の看護学生の血清を用いて調べたがその評価を母子感染という立場から考察する。血清を得た看護学生は、年齢が19~20才であり妊娠するまでにはなお数年~10年の期間はあるがその間に感染する可能性もあるがそのようなことは少ないという前提で考察する。

これらの病原体は妊娠中に初感染することにより胎児に感染する可能性があるため、妊娠前に免疫があれば、即ち抗体を有していれば胎児に感染することはほとんどないと考えられている。従って、母子感染の立場から考えると抗体陰性者が問題となり、その頻度が母子保健対

策における重要度を表わすことになる。

1) トキソプラズマ

仔猫を最終宿主とする原虫であるトキソプラズマは、妊娠中に初感染することにより初期では約10%に胎児に感染し、水頭症、脳内石灰化、網膜炎などの異常をもたらす。今回の検査では1.7%の陽性率であり大部分の学生は感染していないことが判った。逆にこれらの女性は妊娠した時に感染することがあり得るので感染予防に気をつける必要がある。約30年前は、この年代の抗体保有率は約15%と云われていた²⁾。このことは最近感染する機会が減少していることを意味している。しかし抗体陰性者は妊娠したら生肉を食べないこと、生野菜をよく洗うこと、仔猫の糞に触れたりしないようにするなどの注意が必要である。

2) 風疹ウイルス

妊娠初期に風疹に感染すると高率に奇形児(先天性風疹症候群, CRS)を発症する。2004年の1年間に全国で10例のCRS児が報告され、2000年~2002年の3年間に僅かに3例であったことから考えると急増している。その背景に若い女性の抗体保有者の減少が考えられている。風疹ワクチンは1977年から1994年までは中学2年女子にのみ集団接種してきたが、1995年の予防接種法改正以後、生後12~90ヶ月の男女と経過措置として中学生の男女に接種することになった。その結果、子供を中心に起きていた風疹の5~6年毎の大流行がなくなったために成人の自然感染によるブースター効果がなくなった上に中学生のワクチン接種が集団接種から個人接種に変わったため接種率が大幅に減少したことがその理由としてあげられる。実際、寺田らはCRS児の報告が相次いでいる岡山県の看護学生の抗体陰性者が14.2%と法改正以前の3.4%に比べて有意に増加していることを報告している³⁾。従って、本学の19~20才の学生でも抗体保有率はかなり低いと予想していた。

しかし予想に反して陰性者は8名(4.6%)と少なかった。このことは、風疹の蔓延には地域差があることを示唆している。ELISA法では陰性者が5.2%でHI法とはほぼ同じであった。また、免疫が低いと再感染のおそれがあるがそのELISAによる基準を10とすると11.6%がその候補になることが判明した。

3) サイトメガロウイルス(CMV)

妊娠初期の胎児に本ウイルスが感染すると中枢神経系の異常による身心発達障害、難聴、網膜炎、肝障害などを発症することが知られ、最近、このような児の出生の増加がみられている。本学学生の抗体保有者は

63.6%、陰性者が36.4%であった。30年前は20～30才代の女性の抗体保有率は96%と高率で妊娠中の初感染例が極稀でそのため本ウイルスによる異常児の出生も極稀でしかなかった。しかしCMV抗体の陽性者が次第に減少していることが報告され、最近では抗体保有率が約80%にまで減少してきていると云われている⁴⁾。今回の学生のデータは63.6%の陽性者しかいないということは抗体陰性者の増加に拍車がかけられていることになる。従って今後欧米のようにサイトメガロウイルスの母子感染による異常児の出生の増加が憂慮される。

4) 単純ヘルペスウイルス

妊娠末期に本ウイルスに初感染すると分娩時に胎児が感染して新生児ヘルペスを発症することが知られている。その致命率は30%と高い。本学学生における抗体保有率は34.7%であったがこの値は20～30年前はこの年代では80%以上であったことを考えると抗体陰性者が急増しており、妊娠中の初感染予備軍が増加していることを示唆している。

5) パルボウイルスB19

伝染性紅斑（リンゴ病）の原因である本ウイルスは妊娠中期に感染するその10%に胎児水腫や死産を招来することが知られている。

本学学生の抗体保有率が61.8%であったがこの年代のデータは非常に少ないので今回得られた結果は貴重なものである。

妊娠中の母子感染を予防するための戦略としては、①妊娠する前に若い女性に免疫を賦与する。②感染経路を遮断する。③感染源をなくす。ことが考えられる。①はワクチンの開発されているもの（例えば風疹）についてはワクチン接種による戦略が可能である。しかしワクチンのないその他の感染症については②、③によって母子感染を防ぐことになる。今回の研究により、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルスに対する抗体保有者の減少が判明したことは、母子感染の疫学的な立場から重要な情報をもたらしたと思う。

文 献

- 1) 川名 尚 (1998) : 21世紀にむけての母子感染の課題と提案
臨床とウイルス 26 : 121-123
- 2) 小林昭夫 (1989) : トキソプラズマ症
最新医学 44 : 744-751
- 3) 寺田喜平、新妻隆弘、荻田聡子 (2004) :

風疹ワクチンの暫定定期接種化による効果 —接種者の少ない現実—

感染症学雑誌 77 : 465-466

- 4) 矢吹朗彦 他 (1994) : 妊婦のサイトメガロウイルス感染に関する研究

石川県中央病院誌 15 : 29-31

- 5) 鳥羽和憲 (1986) : 血清疫学の面から

森 良一、川名 尚編「ヘルペスウイルス感染症」
メディカルトリビューン PP161-172

Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method

Yoshihiko Enomoto,¹ Tetsushi Yoshikawa,^{1*} Masaru Ihira,² Shiho Akimoto,¹
Fumi Miyake,¹ Chie Usui,¹ Sadao Suga,¹ Kayoko Suzuki,³
Takashi Kawana,⁴ Yukihiro Nishiyama,⁵
and Yoshizo Asano¹

Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine,¹ and Department of Medical Information Technology, Fujita Health University College,² Toyoake, and Department of Dermatology, Central Hospital of Tokai Medical Institute, Tokai,³ and Department of Virology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya,⁵ Aichi, and Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Mizonokuchi, Teikyo University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa,⁴ Japan

Received 1 March 2004/Returned for modification 3 May 2004/Accepted 12 October 2004

Primers for herpes simplex virus type 1 (HSV 1)-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method amplified HSV-1 DNA, while HSV-2-specific primers amplified only HSV-2 DNA; no LAMP products were produced by reactions performed with other viral DNAs. The sensitivities of the HSV-1- and HSV-2-specific LAMP methods, determined by agarose gel electrophoresis, reached 500 and 1,000 copies/tube, respectively. The turbidity assay, however, determined the sensitivity of the HSV-1- and HSV-2-specific LAMP methods to be 1,000 and 10,000 copies/tube, respectively. After initial validation studies, 18 swab samples (in sterilized water) collected from patients with either gingivostomatitis or vesicular skin eruptions were examined. HSV-1 LAMP products were detected by agarose gel electrophoresis in the 10 samples that also demonstrated viral DNA detection by real-time PCR. Nine of these 10 samples exhibited HSV-1 LAMP products by turbidity assay. Furthermore, both the agarose gel electrophoresis and the turbidity assay directly detected HSV-1 LAMP products in 9 of the 10 swab samples collected in sterilized water. Next, we examined the reliability of HSV type-specific LAMP for the detection of viral DNA in clinical specimens (culture medium) collected from genital lesions. HSV-2 was isolated from all of the samples and visualized by either agarose gel electrophoresis or turbidity assay.

Viral isolation and serological assays are standard methods of herpes simplex virus (HSV) diagnosis. Both viral isolation and serological testing, however, require substantial time to obtain accurate final results. More rapid detection has been achieved by modification of cell culture techniques by centrifugation of inocula on cell monolayers and the use of immunofluorescence techniques (6). Recent studies have suggested that detection of HSV DNA by PCR increases the sensitivity of viral infection detection compared to antigenic detection or cell culture methods (3, 4, 11, 13, 14). While quantitative analysis of viral DNA by real-time PCR may become a valuable tool for bedside monitoring of HSV infection and progression (1, 2, 7, 10, 17, 21, 22), it has not yet become a common procedure in hospital laboratories due to the requirement of specific expensive equipment (a thermal cycler).

Recently, Notomi et al. (18) reported a novel nucleic acid amplification method, termed loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which is used to amplify DNA under isothermal conditions with high specificity, efficiency, and speed. The most significant advantage of LAMP is the ability to amplify specific sequences of DNA between 63 and 65°C without

thermocycling. Thus, the technique requires only simple and cost-effective equipment amenable to use in hospital laboratories. The LAMP method also exhibits both high specificity and high amplification efficiency. As the LAMP method uses four primers which recognize six distinct target DNA sequences, the specificity is extremely high. This method also exhibits extremely high amplification efficiency, due in part to its isothermal nature; as there is no time lost due to changes in temperature and the reaction can be conducted at the optimal temperature for enzyme function, the inhibition reactions that often occur at later stages of typical PCR amplifications are less likely to occur. Thus, this method could potentially be a valuable tool for the rapid diagnosis of infectious diseases (5, 8, 9, 12, 19, 23) in both commercial and hospital laboratories. In this study, we sought to establish a LAMP-based HSV type-specific DNA amplification method and examine its reliability for the detection of HSV DNA from clinical specimens.

HSV-1 (KOS) DNA and HSV-2 (186) DNA were used as positive controls to determine the appropriate conditions for HSV type-specific LAMP and to establish the baseline sensitivity and specificity levels. HSV-1 (KOS), HSV-2 (186), varicella-zoster virus (VZV) (Oka), human cytomegalovirus (HCMV) (AD-169), human herpesvirus type 6B (HHV-6B) (Z29), and HHV-7 (RK) DNA were used to determine the specificity of HSV type-specific LAMP. Plasmids containing

* Corresponding author. Mailing address: Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan 4701192. Phone: 81-562-939251. Fax: 81-562-95-2216. E-mail: tetsushi@fujita-hu.ac.jp.

TABLE 1. Primers targeting the HSV-1 and HSV-2 gG genes^a

Virus	Locations of target sequences ^b	Name of primer	Sequence of primer ^c
HSV-1	136741 ATCATGTCCAGGGCCGATCGTCCCGUUGHCACCAITATCCCATCTCTTTGGHCTTT	HS1F3	5'-GCCGTGTGCCAATTATCCC-3' (F3)
	116801 GTCCGT GTATCCGGGGTITCCACCAA CTTCTCTCCACACCCCAACCCCAATCCAGACC	HS1B3	5'-TACTTGGCATGGGGGTG-3' (B3c)
	136861 ACCGGTCTCTCTCTGTGCAAGAGCCCAACATGACAGCCCGGCGAGCCAGCCGACTCTCCC	HS1F1P	5'-GTTGGTGGTAGAGACAGCTTTGGTCTTGTTCGGT-3' (F1c-F2)
	136921 ACCGGCAATCAAGCTTACACAGCCCGGACCAACACACCCCGCCAGTGGCAAGLA TTGGACTGGAG	HS1B1P	5'-GTTGGTGGTTCGCATGAAGCGGCGTGGTAAGGCTGATG-3' (B1-B2c)
		HS1LPB	5'-TTGGTGGAAACCCCGATAC-3' (LPFc)
		HS1LPF	5'-AACATGACCCAGACCGGCAC-3' (LPB)
		HS2F3	5'-GGCCTTGACCGAGGACAC-3' (F3)
		HS2B3	5'-CGACTCCACGGATGCACT-3' (B3c)
		HS2F1P	5'-TCGACTGAGGTGCCATGGCGTCCCTCCGATTCGCCCTACG-3' (F1c-F2)
		HS2B1P	5'-GCAAACCACTACTCCCCCGACCGTTCTCCCGCGTAA-3' (B1-B2c)
HSV-2	138901 CCGCTATGGCTTGACCGAGGAGAG GTCCTCGATGGCTTAGCTGCTCCGAGAG	HS2LPB	5'-GATGGCCACACAGCCGCAA-3' (LPB)
	138961 ACCGGCTCTCTCTGTGCAAGAGCCCAACATGACAGCCCGGCGAGCCAGCCGACTCTCCC	HS2LPF	5'-GCCGACACAGGAGGGGCCG-3' (LPFc)
	139021 ACCGGCTCTCTCTGTGCAAGAGCCCAACATGACAGCCCGGCGAGCCAGCCGACTCTCCC	HS2LPB	5'-GATGGCCACACAGCCGCAA-3' (LPB)
	139081 GTTACGGCGAGGAAAGCGCAGTGGCTTCCCGCCCGCAGCTGCAATCTGTGGAGTGTGG		

^a Names and sequences of each primer used for HSV type-specific LAMP are shown, as are locations of target sequences within the gG genes of HSV-1 and HSV-2. B2c, sequence complementary to B2; F1c, sequence complementary to F1; LPFc, sequence complementary to LPF; B3c, sequence complementary to B3.

^b Numbers at left of sequences are nucleotide positions. GenBank accession numbers are as follows: NC001806 (HSV-1 complete genome) and NC001798 (HSV-2 complete genome).

^c Designations in parentheses correspond to definitions and sequences described in footnote a.

the HSV-1 and HSV-2 target sequences were used to determine the assay sensitivity.

To determine the reliability of HSV type-specific LAMP for detection of viral DNA from clinical samples, 18 swab samples (sample numbers 1 to 18) were collected from patients with either gingivostomatitis or vesicular skin eruptions. Swabs were collected from patients at the outpatient clinic of the Fujita Health University hospital and the Central Hospital of the Tokai Medical Institute and placed into 1 ml of sterilized water. Five swab samples (sample numbers 19 to 23) were also collected from patients with genital herpes at Teikyo University Mizonokuchi Hospital outpatient clinic. Swabs were collected from the lesions and placed into culture medium. HSV-2 was isolated from all of these samples. We attempted detection of HSV-1 and HSV-2 DNA from either post-DNA extraction or without DNA extraction by using HSV-1-specific and HSV-2-specific LAMP. The results of HSV type-specific LAMP were compared with results obtained by the previously established technique of HSV type-specific real-time PCR to assess the reliability of the methods for the rapid diagnosis of HSV infection.

LAMP reactions were conducted as described previously by Notomi et al. (18) and Nagamine et al. (16). The LAMP method requires a set of four primers (B3, F3, BIP, and FIP) that recognize a total of six distinct sequences (B1 to B3 and F1 to F3) within the target DNA. Primers for HSV-1 and HSV-2 LAMP were designed against the HSV-1 glycoprotein G (gG) and HSV-2 gG genes, respectively, by using Primer Explorer V software (FUJITSU, Tokyo, Japan), the locations and sequences of which are shown in Table 1. Primer BIP for the gG genes of HSV-1 (HS1BIP) and HSV-2 (HS2BIP) contained the B1 direct sequence and B2 complementary sequence, each specific for the respective strains. Primer FIP for the gG genes of HSV-1 (HS1FIP) and HSV-2 (HS2FIP) contained the F1 complementary sequence and the F2 direct sequence. Primers B3 (HS1B3 and HS2B3) and F3 (HS1F3 and HS2F3) for the HSV-1 and HSV-2 gG genes were located outside the F2-B2 regions. As additional loop primers increase the amplification efficiency (16), loop primers specific for the HSV-1 gG (HS1LPB and HS1LPF) and HSV-2 gG (HS2LPB and HS2LPF) genes were also synthesized. HS1LPB and HS2LPB contained the LPB sequence, while HS1LPF and HS2LPF contained the LPF complementary sequence. The LAMP reaction was performed by using a Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical, Tochigi, Japan). Reaction mixtures (25 µl) contained 1.6 µM each FIP and BIP primer, 0.8 µM each outer primer (F3 primer and B3 primer), 0.8 µM each loop primer (LPF primer and LPB primer), 2× reaction mix (12.5 µl), *Bst* DNA polymerase (1 µl), and 5 µl of each sample. The mixture was incubated at 63°C for 30 min. Next, a TERAMECS LA200 (Teramecs, Kyoto, Japan) was used to measure turbidity after 30 min of LAMP (15). After turbidity measurement, LAMP products were subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gels. Gels were visualized under UV light after ethidium bromide staining. To avoid contamination between samples, different rooms were used for DNA extraction, LAMP setup, and gel analysis using filter-containing pipette tips for aerosol protection. As the turbidities of five negative samples were demonstrated to be 0.01 ± 0.02, we

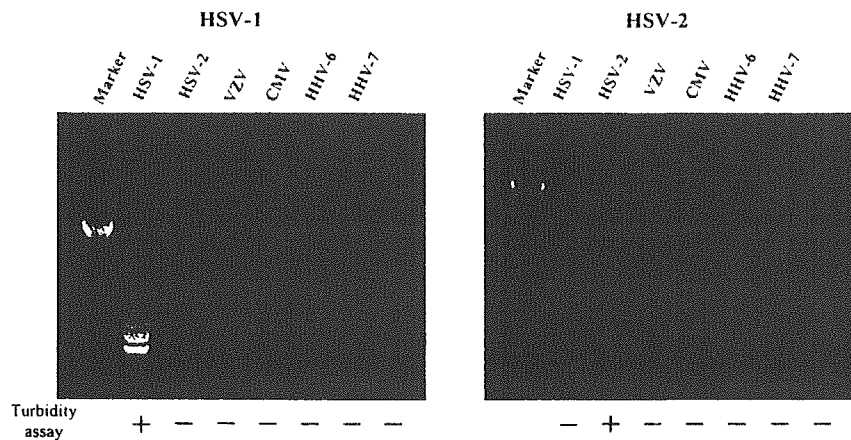


FIG. 1. DNA extracted from HSV-1 (KOS)-, HSV-2 (186)-, VZV (Oka)-, HCMV (AD-169)-, HHV-6 B (Z29)-, and HHV-7 (RK)-infected cells was amplified by using HSV-1- and HSV-2-specific LAMP to determine method specificity. The detection of LAMP products was assessed by agarose gel electrophoresis and turbidity assay using an LA-200. Marker, 123-bp DNA ladder marker.

defined 0.1 as the cutoff value for discrimination between positive and negative samples.

Real-time PCR quantitated the amount of either HSV-1 or HSV-2 DNA in each sample. The genes encoding HSV-1 and HSV-2 glycoprotein G were selected for HSV type-specific real-time PCR. The sequences of the primers and probes used for these experiments were described previously by Pevenstein et al. (20).

To develop an effective assay for rapid measurement of HSV DNA content, we first evaluated the specificity of our HSV type-specific primers. HSV type-specific LAMP was performed on DNA extracted from HSV-1 (KOS)-, HSV-2 (186)-, VZV (Oka)-, HCMV (AD-169)-, HHV-6B (Z29)-, and HHV-7 (RK)-infected cells. As the LAMP products contained several inverted-repeat structures, positive samples exhibit multiple bands of different sizes upon agarose gel electrophoresis. HSV-1-specific primers amplified only HSV-1 DNA and HSV-2-specific primers amplified only HSV-2 DNA (Fig. 1), and no LAMP products were detected in reactions performed with DNA from other viral infections. We also tested the specificity of the primers by using a turbidity assay. The use of HSV-1-

specific primers elevated sample turbidity only in HSV-1 DNA-containing samples. Similar specificity was observed for HSV-2-specific primers (Fig. 1).

We also determined the sensitivity of this method. Serial dilutions of either pGEMHS1 or pGEMHS2 plasmid containing the target sequences determined the detection limits of HSV type-specific LAMP. The sensitivities of the HSV-1- and HSV-2-specific LAMP determined by agarose gel electrophoresis were 500 and 1,000 copies/tube, respectively (Fig. 2). Detection by the turbidity assay, however, produced sensitivity levels of 1,000 and 10,000 copies/tube for HSV-1- and HSV-2-specific LAMP, respectively.

After these initial validation studies, we determined the reliability of this HSV type-specific LAMP as a method of viral DNA detection from clinical specimens. Eighteen swab samples (sample numbers 1 to 18) collected from patients with either gingivostomatitis or vesicular skin eruptions were examined (Table 2). Neither HSV-1 nor HSV-2 LAMP products were detected in samples (sample numbers 1 to 8) from which no HSV DNA could be detected by real-time PCR. In contrast, HSV-1 LAMP products were detected by agarose gel electro-

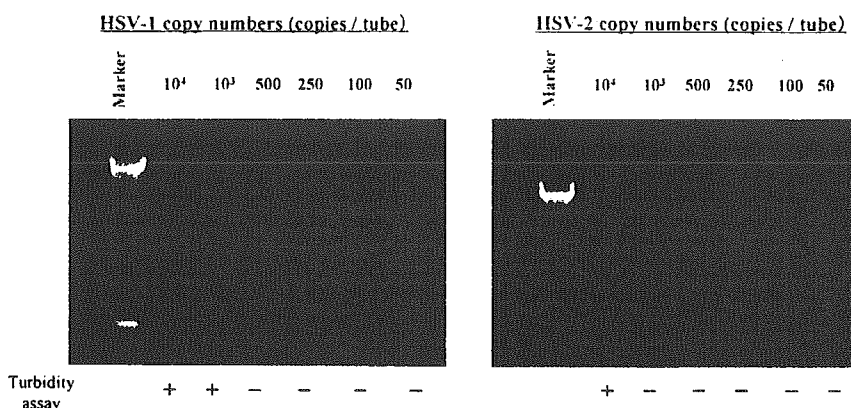


FIG. 2. To determine the respective sensitivities of each assay, serial dilutions of pGEMHS1 and pGEMHS2 plasmid DNAs were amplified by the HSV-1- and HSV-2-specific LAMP, respectively. The detection of LAMP products was assessed by agarose gel electrophoresis and turbidity assay using an LA-200. Marker, 123-bp DNA ladder marker.

TABLE 2. Comparison between HSV type-specific real-time PCR and HSV type-specific LAMP for detection of HSV DNA in swab samples collected from patients with gingivostomatitis or vesicular skin eruptions (samples 1 to 18) and genital HSV infection (samples 19 to 23)

Sample no.	HSV-1 ^a					HSV-2 ^a				
	Real-time PCR (copies/tube)	LAMP (DNA extraction) result		LAMP (direct ^b) result		Real-time PCR (copies/tube)	LAMP (DNA extraction) result		LAMP (direct ^b) result	
		Agarose gel electrophoresis	Turbidity assay	Agarose gel electrophoresis	Turbidity assay		Agarose gel electrophoresis	Turbidity assay	Agarose gel electrophoresis	Turbidity assay
1	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
2	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
3	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
4	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
5	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
6	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
7	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
8	0	-	-	-	-	0	-	-	ND	ND
9	6,350	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
10	9,200	+	-	-	-	0	-	-	ND	ND
11	29,450	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
12	129,650	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
13	194,050	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
14	283,000	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
15	669,950	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
16	2,629,400	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
17	3,769,650	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
18	86,136,700	+	+	+	+	0	-	-	ND	ND
19	0	-	-	ND	ND	641	+	+	-	-
20	0	-	-	ND	ND	22,430	+	+	-	-
21	0	-	-	ND	ND	89,929	+	+	-	-
22	0	-	-	ND	ND	413,117	+	+	-	-
23	0	-	-	ND	ND	443,963	+	+	-	-

^a +, positive; -, negative.

^b Swab samples were directly (without DNA extraction) used for LAMP reaction. ND, not done.

phoresis in the 10 HSV-1-positive samples, correlating perfectly with the results of real-time PCR. When the turbidity assay was used, HSV-1 LAMP products were detected in all but 1 (sample number 10) of these 10 positive samples. No HSV-2 DNA could be detected in these samples by either real-time PCR or LAMP. As rapidity and simplicity of the method are critical for commercial and hospital laboratory use, we investigated the requirement for DNA extraction in HSV type-specific LAMP. Either agarose gel electrophoresis or turbidity assay directly detected HSV-1 LAMP product in all 10 swab samples (sample numbers 9 to 18) (sterilized water), with the exception of sample number 10, regardless of the presence or absence of DNA extraction (Table 2). As genital herpes is another important clinical manifestation of herpes infection, we next examined the reliability of HSV type-specific LAMP for the detection of viral DNA in clinical specimens (culture medium) collected from genital lesions (sample numbers 19 to 23) (Table 2). High copy numbers of HSV-2 DNA (ranging between 641 and 443,963 copies/tube) were detected in these samples by HSV-2 type-specific real-time PCR. Both agarose gel electrophoresis and turbidity assay detected HSV-2 LAMP products in all of the samples. To determine the necessity of DNA extraction by this method, we again tried to detect HSV-2 LAMP products in the samples with or without (culture medium) DNA extraction. In contrast, while HSV-2 LAMP products were detected in samples after DNA extraction, no HSV-2 LAMP products were detected in the samples without DNA extraction (Table 2). To determine if the culture medium contained an inhibitor of LAMP, we attempted to detect HSV

LAMP products from both sterilized water and culture medium containing plasmid DNA which contained the target sequences. Although both HSV-1 and HSV-2 LAMP products could be detected in sterilized water containing the target sequences, no LAMP products were detected in culture medium containing these DNAs (data not shown).

HSV-1- and HSV-2-specific LAMP specifically amplified HSV-1 and HSV-2 DNA, respectively, exhibiting no cross-reactivity with other human herpesviruses, including another member of the subfamily *Alphaherpesvirinae*, VZV (Fig. 1). This specificity was confirmed by agarose gel electrophoresis and turbidity assay. Although the capability to distinguish between HSV-1 and HSV-2 infection is not crucial for correct administration of antiviral drugs, this discrimination is important from an epidemiological or public health standpoint. As a consequence of the experiment used for determination of the assay sensitivity, it was suggested that the turbidity assay is a less sensitive detection method than agarose gel electrophoresis, as previously suggested (23). However, the turbidity assay is more appropriate for bedside monitoring due to its ease and rapidity. Additionally, turbidity measurement of LAMP products allows a reduction in operation time and reduces contamination risks because of the absence of agarose gel electrophoresis.

We also evaluated the reliability of HSV type-specific LAMP in the detection of viral DNA from different clinical specimens. Although HSV-1 LAMP products were detected by agarose gel electrophoresis in 10 of the 18 swab samples (sterilized water) collected from patients with vesicular skin lesions

and gingivostomatitis suspected as HSV infection, no HSV-2 LAMP products were detected in these samples. All five swab samples (culture medium) collected from the lesions of patients with genital herpes contained HSV-2 LAMP products. These results corresponded well with those from real-time PCR analysis, suggesting that HSV type-specific LAMP is a reliable method for the detection of viral DNA in clinical samples. Although an HSV-1 LAMP product could not be detected in one HSV-1-positive sample by turbidity assay, this inconsistency is probably due to low copy numbers. As the majority of clinical samples (e.g., skin eruptions, oral ulcers, and genital lesions) contain large quantities of viral DNA, the sensitivity of type-specific LAMP by turbidity assay is likely sufficient for the evaluation of most clinical samples. Moreover, all amplification steps are completed within 30 min with an LA-200, and it is a cheaper piece of equipment than that required for real-time PCR, which are major advantages for hospital laboratory use.

Interestingly, when the swabs were collected in sterilized water, HSV LAMP products could be detected directly from the samples without DNA extraction. In contrast, LAMP products could not be detected directly from the culture medium containing viral DNA, regardless of the HSV strain. DNA target sequences, however, became detectable in samples after DNA extraction, suggesting that culture medium contains inhibitors of the LAMP reaction. As the DNA extraction step requires approximately 30 min, omission of DNA extraction could save both time and labor for preparing the samples for LAMP, a major advantage for rapid diagnosis in hospital laboratories. To our knowledge, this is the first report to demonstrate direct amplification of viral DNA from sterilized water containing viral nucleic acids without DNA extraction. We emphasize that the swab should be placed into sterilized water for direct amplification of viral DNA by LAMP. Direct amplification from swab samples in combination with assessment by turbidity assay would accomplish the entire amplification within 30 min. This system would therefore allow large increases in throughput, which is highly relevant for clinical laboratory use. Furthermore, as HSV DNA could be directly detected from swab samples without DNA extraction, the lesions of HSV infection may contain a large quantity of naked viral DNA as well as complete virions. Thus, direct detection of viral DNA from swab samples may be possible by additional DNA amplification methods such as real-time PCR. Further investigation will be necessary to confirm this hypothesis in the future.

We thank Eiken Chemical for their contributions to this work. We also thank Akiko Yoshikawa and Maki Sawamura for their technical assistance.

This work was supported in part by a grant-in-aid for the 21st Century COE Program of Medicine of Fujita Health University and the Open Research Center of Fujita Health University from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and also by a grant-in-aid for scientific research from the Ministry of Education, Science, and Culture of Japan.

REFERENCES

- Aldea, C., C. P. Alvarez, L. Folgueira, R. Delgado, and J. R. Otero. 2002. Rapid detection of herpes simplex virus DNA in genital ulcers by real-time PCR using SYBR green I dye as the detection signal. *J. Clin. Microbiol.* 40:1060-1062.
- Asano, S., T. Yoshikawa, H. Kimura, Y. Enomoto, M. Ohashi, H. Terasaki, and Y. Nishiyama. 2004. Monitoring of herpesviruses DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J. Clin. Virol.* 29:206-209.
- Cone, R. W., A. C. Hobson, J. Palmer, M. Remington, and L. Corey. 1991. Extended duration of herpes simplex virus DNA in genital lesions detected by the polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 164:757-760.
- Cone, R. W., A. C. Hobson, Z. Brown, R. Ashley, S. Berry, C. Winter, and L. Corey. 1994. Frequent detection of genital herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction among pregnant women. *JAMA* 272:792-796.
- Enosawa, M., S. Kageyama, K. Sawai, K. Watanabe, T. Notomi, S. Onoe, Y. Mori, and Y. Yokomizo. 2003. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 41:4359-4365.
- Espy, M. J., A. D. Wold, D. J. Jespersen, M. F. Jones, and T. F. Smith. 1991. Comparison of shell vials and conventional tubes seeded with rhabdomyosarcoma and MRC-5 cells for the rapid detection of herpes simplex virus. *J. Clin. Microbiol.* 29:2701-2703.
- Espy, M. J., J. R. Uhl, P. S. Mitchell, J. N. Thorvilson, K. A. Svien, A. D. Wold, and T. F. Smith. 2000. Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:795-799.
- Ihira, M., T. Yoshikawa, Y. Enomoto, S. Akimoto, M. Ohashi, S. Suga, Y. Nishimura, T. Ozaki, Y. Nishiyama, T. Notomi, Y. Ohta, and Y. Asano. 2004. Rapid diagnosis of human herpesvirus 6 infection by a novel DNA amplification method, loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 42:140-145.
- Iwamoto, T., T. Sonobe, and K. Hayashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 41:2616-2622.
- Kessler, H. H., G. Muhlbauer, B. Rinner, E. Stelzl, A. Berger, H. W. Dorr, B. Santner, E. Marth, and H. Rabenau. 2000. Detection of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:2638-2642.
- Kimberlin, D. W., F. D. Lakeman, A. M. Arvin, C. G. Prober, L. Corey, D. A. Powell, S. K. Burchett, R. F. Jacobs, S. E. Starr, R. J. Whitley, et al. 1996. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. *J. Infect. Dis.* 174:1162-1167.
- Kuboki, N., N. Inoue, T. Sakurai, F. Di Cello, D. J. Grab, H. Suzuki, C. Sugimoto, and I. Igarashi. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J. Clin. Microbiol.* 41:5517-5524.
- Lakeman, F. D., R. J. Whitley, et al. 1995. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. *J. Infect. Dis.* 171:857-863.
- Mitchell, P. S., M. J. Espy, T. F. Smith, D. R. Toal, P. N. Rys, E. F. Berhari, D. R. Osmon, and D. H. Persing. 1997. Laboratory diagnosis of central nervous system infections with herpes simplex virus by PCR performed with cerebrospinal fluid specimens. *J. Clin. Microbiol.* 35:2873-2877.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita, and T. Notomi. 2002. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 289:150-154.
- Nagamine, K., T. Hase, and T. Notomi. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes* 16:223-229.
- Ndjoyi-Mbiguino, A., F. Ozouaki, J. Legoff, F. X. Mbopi-Keou, A. Si-Mohamed, I. N. Onas, E. Avoune, and L. Belec. 2003. Comparison of washing and swabbing procedures for collecting genital fluids to assess cervicovaginal shedding of herpes simplex virus type 2 DNA. *J. Clin. Microbiol.* 41:2662-2664.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino, and T. Hase. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 28:e63.
- Parida, M., G. Posadas, S. Inoue, F. Hasebe, and K. Morita. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 42:257-263.
- Pevenstein, S. R., R. K. Williams, D. McChesney, E. K. Mont, J. E. Smialek, and S. E. Straus. 1999. Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglia. *J. Virol.* 73:10514-10518.
- Ryncarz, A. J., J. Goddard, A. Wald, M. L. Huang, B. Roizman, and L. Corey. 1999. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* 37:1941-1947.
- van Doornum, G. J., J. Guldemeester, A. D. Osterhaus, and H. G. Niesters. 2003. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. *J. Clin. Microbiol.* 41:576-580.
- Yoshikawa, T., M. Ihira, S. Akimoto, C. Usui, F. Miyake, S. Suga, Y. Enomoto, R. Suzuki, Y. Nishiyama, and Y. Asano. 2004. Detection of human herpesvirus 7 DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J. Clin. Microbiol.* 42:1348-1352.

Comparison of Loop-Mediated Isothermal Amplification, Real-Time PCR, and Virus Isolation for the Detection of Herpes Simplex Virus in Genital Lesions

Hiroko Sugiyama,¹ Tetsushi Yoshikawa,^{1*} Masaru Ihira,² Yoshihiko Enomoto,¹ Takashi Kawana,³ and Yoshizo Asano¹

¹Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan

²Department of Medical Information Technology, Fujita Health University College, Toyoake, Aichi, Japan

³Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Mizonokuchi, Teikyo University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa, Japan

This study compares herpes simplex virus (HSV) type-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with virus isolation and real-time PCR. Genital tract specimens were obtained from 25 patients with genital lesions; two swab samples were collected from the vulva and cervix of each patient, for a total of 50 specimens. After culturing, 10 of 50 (20%) samples were positive for HSV-1 and 12 of 50 (24%) samples were positive for HSV-2. None of the patients excreted both HSV-1 and HSV-2 virus. An original HSV type-specific LAMP assay (30 min reaction) was compared with virus isolation and HSV type-specific real-time PCR. Viral DNA was detected by LAMP in 9 of 10 HSV-1 isolated samples and 11 of 12 HSV-2 isolated samples. No viral DNA was detected in samples without virus isolation. Thus, if virus isolation was used as the standard method, the LAMP protocol was highly sensitive and specific. In comparing LAMP to real-time PCR, viral DNA was detected by the LAMP method in 9 of 12 HSV-1 DNA positive samples and 11 of 18 HSV-2 DNA positive samples. If real-time PCR was used as the standard method, then, sensitivity of the LAMP method (in particular, for HSV-2) was low. Taking this into consideration, the LAMP reaction was extended to 60 min. This led to an increase in sensitivity, resulting in an additional one and three samples testing positive for HSV-1 LAMP and HSV-2 LAMP, respectively, compared to the original LAMP protocol. Therefore, the sensitivity of the LAMP method increased to about 80%. *J. Med. Virol.* 75:583–587, 2005. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: HSV; LAMP; real-time PCR

INTRODUCTION

Herpes simplex virus (HSV) causes a wide variety of clinical manifestations in humans, specifically in the skin, lips, oral cavity, eyes, genital tract, and central nervous system. Genital HSV infection, however, is the most important manifestation from a public health perspective. Evaluating viral burden in genital secretions is important in understanding the mechanisms of heterosexual as well as mother-to-child transmission of HSV and for predicting the effect of antiviral treatment. Standard methods of HSV diagnosis include viral isolation and serological assays. Both viral isolation and serological testing, however, require substantial time to obtain accurate results. More rapid detection can be achieved by the modification of cell culture techniques, by centrifugation of inocula on cell monolayers, and the use of immunofluorescence microscopy [Espy et al., 1991]. Recent studies have suggested that the detection of HSV DNA by polymerase chain reaction (PCR) increases the sensitivity of detection relative to antigenic detection or cell culture methods [Cone et al., 1991, 1994; Lakeman and Whitley, 1995; Kimberlin et al., 1996; Mitchell et al., 1997]. While quantitative analysis of viral DNA by real-time PCR may become a valuable

Grant sponsor: Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan (Grant-in-Aid for the 21st Century COE Program of Medicine of Fujita Health University and the Open Research Center of Fujita Health University); Grant sponsor: Kurozumi Medical Foundation.

*Correspondence to: Tetsushi Yoshikawa, MD, Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan 4701192. E-mail: tetsushi@fujita-hu.ac.jp

Accepted 2 December 2004

DOI 10.1002/jmv.20309

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)

tool for bedside monitoring of HSV infection and progression [Pevenstein et al., 1999; Ryncarz et al., 1999; Espy et al., 2000; Kessler et al., 2000; Aldea et al., 2002; Ndjoyi-Mbiguino et al., 2003; Asano et al., 2004], it is not yet common in hospital laboratories due to the requirement of specific expensive equipment (a thermal cycler).

Recently, Notomi et al. [2000] reported a novel nucleic acid amplification method, termed loop-mediated isothermal amplification (LAMP), which amplifies DNA under isothermal conditions with high specificity, efficiency, and speed. The most significant advantage of LAMP is the ability to amplify specific sequences of DNA at temperatures between 63 and 65°C. The technique therefore requires only low-cost equipment that is amenable to use in hospital laboratories. Recently published reports have suggested that this method could potentially be a valuable tool for the rapid diagnosis of infectious diseases [Enosawa et al., 2003; Iwamoto et al., 2003; Kuboki et al., 2003; Ihira et al., 2004; Parida et al., 2004; Schmutzhard et al., 2004; Yoshikawa et al., 2004] including HSV [Enomoto et al., in press]. Although an HSV type-specific LAMP was developed previously, the clinical value of this method compared to virus isolation or HSV type-specific real-time PCR remains to be assessed. In this study, the aim was to compare HSV type-specific LAMP to virus isolation and real-time PCR for the detection of virus in genital swab samples.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Clinical Samples

Genital tract specimens were obtained from 25 patients (mean age: 35 ± 12), seen at Teikyo University Mizonokuchi Hospital, with ulcerative lesions on their vulvae. Two swab samples were collected separately from the vulva (with lesion) and cervix (without remarkable lesion) of each patient. Thus, 50 specimens were collected. Swabs were placed into a vial containing 1 ml virus-transport medium, and 200 μ l of each sample were used for virus isolation. The remainder of each sample was stored at -20°C until processed (for amplification of HSV DNA). Virus isolation was carried out at Teikyo University. Subsequently, DNA extraction, HSV type-specific LAMP, and HSV type-specific real-time PCR were carried out at Fujita Health University by different technicians without information about the virus isolation.

Virus Isolation

Specimens (200 μ l) removed from virus transport medium were immediately centrifuged at 2,000 rpm for 10 min at 4°C , after which the supernatant was used to inoculate bottle cultures of Vero cells. The cultures were incubated at 37°C and observed daily for cytopathic effects. If any cytopathic effect was noted, cells were harvested and stained with FITC-labeled mouse monoclonal antibodies against HSV-1 or HSV-2 to identify the HSV type [Kawana et al., 1982].

DNA Extraction

DNA was extracted from 200 μ l of sample using a QIAamp Blood Kit (Qiagen, Chatsworth, CA). After extraction, DNA was eluted in 100 μ l buffer and stored at -20°C .

HSV Type-Specific LAMP

LAMP reactions were conducted as described by Notomi et al. [2000] and Nagamine et al. [2002]. The LAMP method requires a set of four primers (B3, F3, BIP, and FIP) that recognize a total of six distinct sequences (B1–B3, F1–F3) within the target DNA. LAMP primers for HSV-1 and HSV-2 were designed against the HSV-1 gG and HSV-2 gG genes, respectively, using Primer Explorer V Soft Ware (FUJITSU, Tokyo, Japan). These primers are described elsewhere [Enomoto et al., in press]. The LAMP reaction was performed using a Loopamp DNA amplification kit (Eiken Chemical, Tochigi, Japan). Reaction mixtures (25 μ l) contained 1.6 μM each of FIP and BIP primer, 0.8 μM of each outer primer (F3 primer and B3 primer), 0.8 μM of each loop primer (LPF primer and LPB primer), 2 \times reaction mix (12.5 μ l), *Bst* DNA polymerase (1 μ l), and 5 μ l of each sample. Next, a TERAMECS LA200 (Teramecs, Kyoto, Japan) was used to measure turbidity after 30 (original HSV type-specific LAMP) or 60 min (modified HSV type-specific LAMP) of LAMP [Mori et al., 2002]. To avoid contamination between samples, different rooms were used for DNA extraction and LAMP set up, using filter-containing pipette tips for aerosol protection.

Real-Time PCR for HSV-1 and HSV-2

Real-time PCR was used to quantitate the amount of either HSV-1 or HSV-2 DNA in each sample. The genes encoding HSV-1 and HSV-2 glycoprotein G were selected for HSV type-specific real-time PCR. The sequences of the primers and probes used for these experiments were described by Pevenstein et al. [1999]. PCR reactions were performed using the TaqMan PCR Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's directions. Standard curves measuring HSV-1 and HSV-2 DNA concentrations were constructed using C_T values obtained from serially diluted plasmids, pHS1TA and pHS2TA, respectively, which contain the target DNA sequences. The C_T value from each sample was plotted on the standard curve, allowing automatic calculation of the copy number using Sequence Detector v1.6 software (PE Applied Biosystems). Each sample was tested in duplicate; the mean is represented as the copy number for each sample.

RESULTS

The results of virus isolation, HSV type-specific LAMP, and real-time PCR are summarized in Table I. By culture, 10 of 50 (20%) samples were positive for HSV-1 and 12 of 50 (24%) samples were positive for HSV-2. None of the patients excreted both HSV-1 and