

考 察

咽頭の淋菌に対しては、cefodizimeを2gに増量した場合でも、単回投与では除菌率は55%にとどまり、1g単回投与の結果16/25 (64%)と同等であった。

薬剤感受性との関係については、低感受性を示す株で、より臨床効果は悪い傾向が認められるが、感受性株(MIC 0.0078 μ g/ml)であっても、無効例も存在した。したがって、淋菌による咽頭感染の治療には単回ではなく、連日投与が必要である。

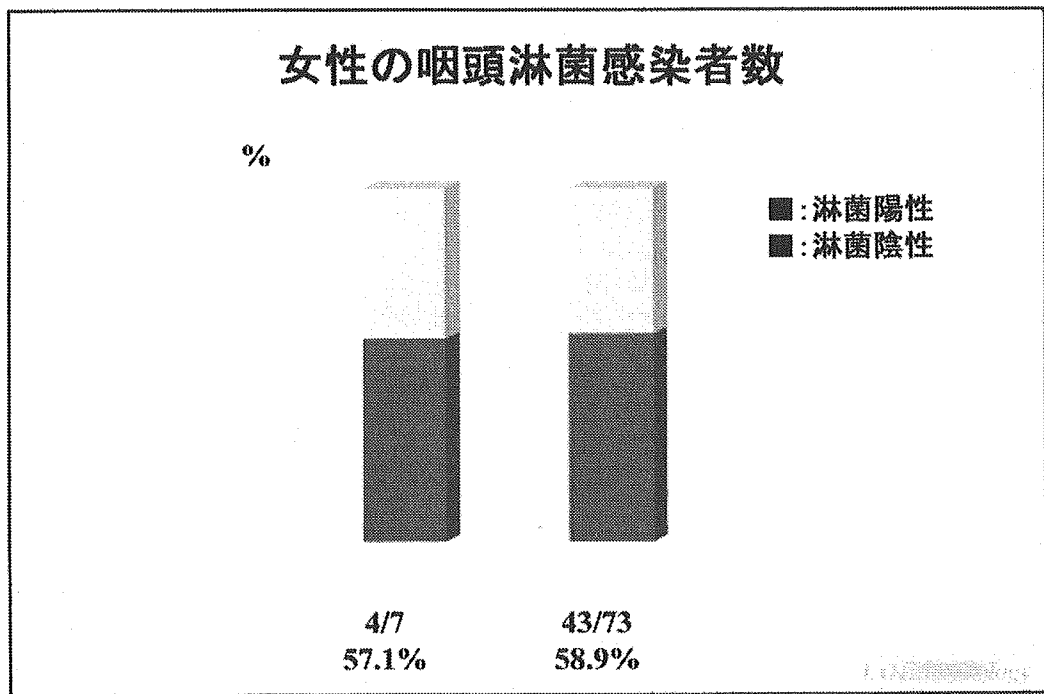
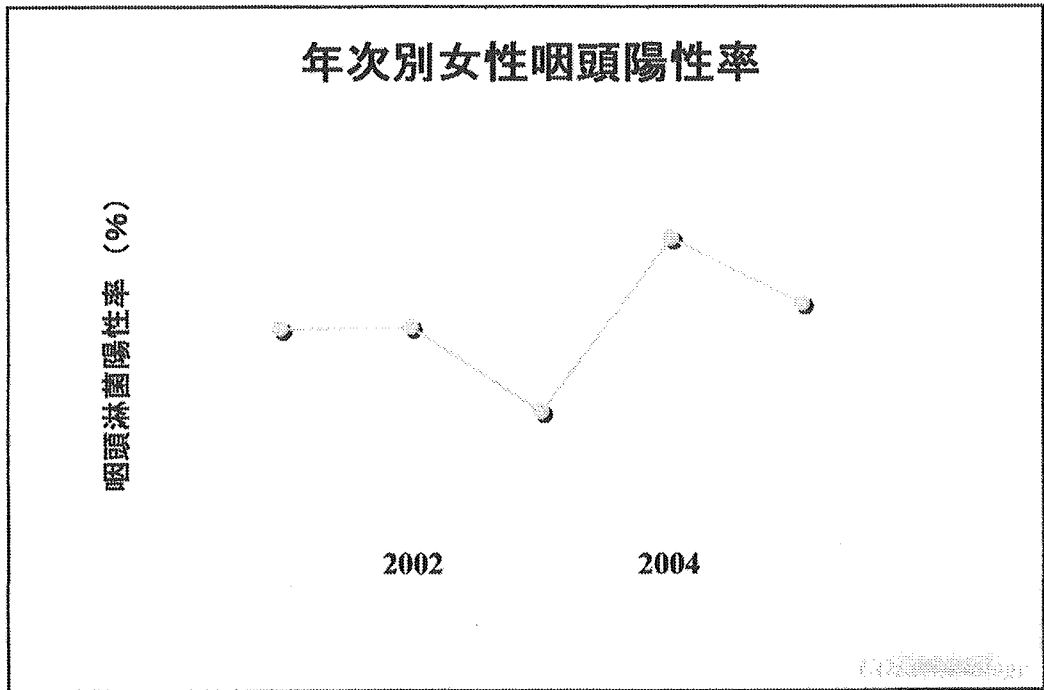
淋菌咽頭感染は、自覚症状はないが、パートナーへ感染させる可能性が高いため、除菌は必須であると考ええる。

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。

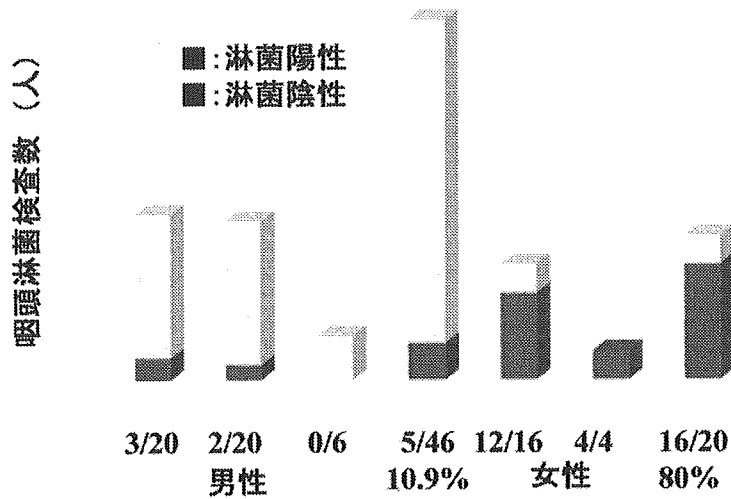
淋菌性咽頭感染の実態と治療に関する研究

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増加している。多くの場合、無症候に経過し、咽頭を介して淋菌が拡散している。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。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。これまでにcefodizime 1g単回投与および2g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、1g単回投与時の除菌率64% (16/25)、2gに増量した場合でも、単回投与では除菌率55% (6/11)にとどまった。これらの結果より、単回投与により、咽頭へ感染した淋菌を消失させることを目的として、2004年6月に保険適応となったceftriaxone 1g単回投与の治療効果を検討した。

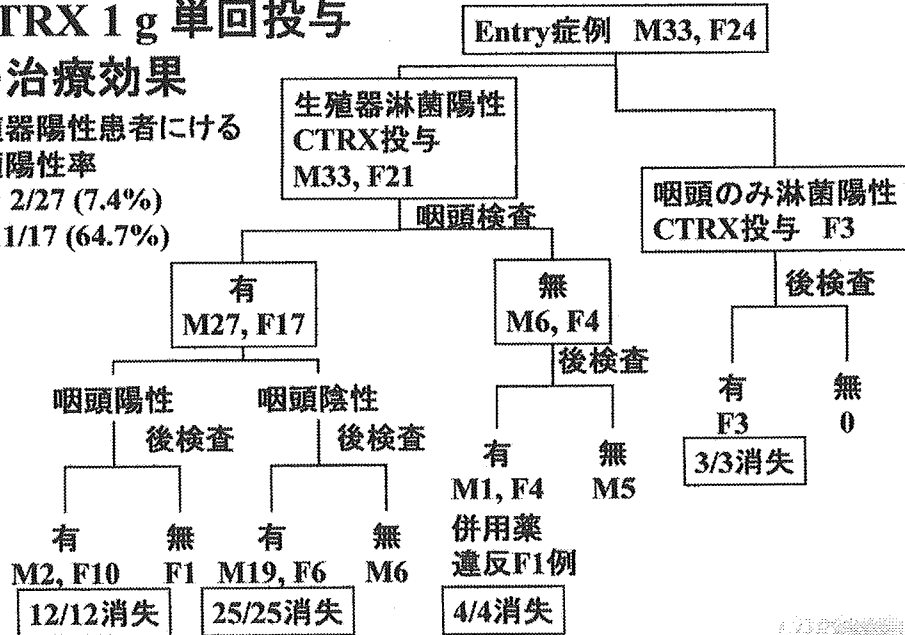


施設別咽頭淋菌感染者数



CTRX 1g 単回投与 の治療効果

生殖器陽性患者にける
咽頭陽性率
M: 2/27 (7.4%)
F: 11/17 (64.7%)



考 察

咽頭へ感染した淋菌を消失させる治療法確立を目的として、2004年6月に保険適応となったceftriaxone 1g単回投与の治療効果を検討した。

その結果、ceftriaxone 1g単回投与は、生殖器淋菌感染症患者41例中41例淋菌消失、咽頭淋菌感染患者15例中15例消失させた。

まだ、咽頭感染患者は、15例と少ないものの、現在のところ有用な薬剤であると考えられた。今後症例数を増やし検討する予定である。

厚生科学研究費補助金[新興・再興感染症研究事業]
(総合) 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	帝京大学医学部付属溝口病院産婦人科客員教授
共同研究者	塚越静香	西井 修 帝京大学医学部付属溝口病院産婦人科
	吉川哲史	杉山博子 藤田保健衛生大学小児科
	佐多徹太郎	尾崎泰子 国立感染症研究所病理部
	冲永荘一	加藤真子 帝京平成看護短期大学

研究要旨

1) 性器ヘルペスの確定診断を行う上に必須である病原診断法として感度・特異度に優れ臨床の現場にも使いやすい核酸増幅法である LAMP 法と PCR 法の開発を行った。LAMP 法は培養法とほぼ同等な感度と特異度を有し臨床応用は十分可能であると考えられた。PCR 法のための本邦で用いることのできるプライマーの開発に成功した。しかし、臨床応用する際の課題が残されている。

2) 若い女性の単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)と 2 型(HSV-2)、クラミジア・トラコマチスの抗体保有率について同意の得られた 323 名について検討した。HSV-2 抗体は 5.9%に陽性であった。性器の HSV-1 の感染も考慮に入れて性器の単純ヘルペスウイルス感染を約 10%と推定した。この集団のクラミジア・トラコマチスの抗体保有率は 12.1%であった。

A. 目的

【1】性器ヘルペスに関する検査法の開発と評価

ウイルス性性感染症の中で最も頻度の多い性器ヘルペスの診断には、単純ヘルペスウイルス(HSV)を証明する病原診断法が必須であるが、現在保険で認められている蛍光抗体法は非常に感度が悪く多くの偽陰性を出している。

HSV の証明には培養と同定が世界的な gold standard ではあるが、費用と時間がかかるため実用的ではない。そこで、新たな検査法の開発が望まれてきた。この際、実験室診断法として要求されることは、①感度と特異度に優れていること ②迅速に結果が出せること ③1 型と 2 型を分けられること ④費用が安いこと ⑤検体の採取と搬送が安易であること。これらを満足する方法としては、核酸増幅法が第一の候補となる。核酸増幅法としては、世界的に用いられている PCR 法と本邦で開発されいくつかの実用面での利点の

ある LAMP 法(loop-mediated isothermal

amplification) について検討した。そのためには、以下のステップを踏む必要がある。

- 1) プライマーの設計とその本邦において分離された HSV 株との反応性。
- 2) 臨床検体での検出感度と特異度を分離培養法と比較する。
- 3) 一般臨床の場での使用を可能にするための次のような条件を解決する。
 - ① 検体採取法とその保存と搬送。
 - ② 性器における種々な夾雑物による非特異反応や反応抑制。
 - ③ 結果の臨床的立場からの評価基準の設定。

以上の検討を踏まえて、日常臨床に使用できる感度・特異度のよい検査法の開発を目的とした。

【2】性器ヘルペスの蔓延度に関する研究

性器ヘルペスの蔓延については、厚労省のサー

ベイランス事業によってのみ現状を知ることしかできないが、前述のように診断の精度が低い検査法しかなく、また、性器の HSV 感染者の 70% は無症候と云われており、性器ヘルペスの真の蔓延度についてのデータは全くない。性器ヘルペスは単純ヘルペスウイルス 1 型(HSV-1)または 2 型(HSV-2)の感染により発症する。1 型は口腔にも性器にも感染するが、2 型は性器にしか感染せずその感染経路は性交である。クラミジアの検出に用いられている病原検出法は性器ヘルペスでは開発されていないだけでなくクラミジアと違って性器への HSV の排泄は極く短い時間であるため病原診断法では感染の真の姿はとらえられない。従って、性器の HSV 感染の疫学を知るには血清抗体の検出によらざるを得ない。そこで、同意の得られた若い女性から得た血清をコード化した上で HSV-1、HSV-2、クラミジア・トラコマチスに対する抗体を測定し、これらの集団における蔓延度を検討した。

B. 研究方法

核酸増幅法は LAMP 法と Real-time PCR 法の開発を行った。LAMP 法は臨床検体における精度を、Real-time PCR 法はプライマーの開発を行った。

[1] LAMP 法

(1) 臨床検体：帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科を訪れ性器ヘルペスの疑いのある患者の外陰や子宮頸管から 164 検体を採取した。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すぎ検体とした。その半分を分離に残りを 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て行った。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, J.Clin. Microbiol. 2005,43:951)。63°C, 60 分反応させ LAMP 増幅産物の濁度が 0.1 以上を陽性とした。検体をそのまま用いる直接法と DNA を抽出する方法を行い比較した。その感度は HSV-1 が濁度判定により 1000copies/tube、HSV-2 が 10000copies/tube である。

[2] Real-time PCR 法

(1) 野生株

我々が既に性器ヘルペスより分離し保存してあった株を用いた。HSV-1, 41 株、HSV-2, 45 株計 86 株である。分離は Vero 細胞を用い、同定と型の決定は蛍光標識マウスモノクローナル抗体 (MicroTrak 又はデンカ生研) を用いて行った。

これらの新鮮分離を 10 倍段階稀釈し、稀釈したものについて培養と Real-time PCR 法を行い特異性と感度を比較した。

(2) Real-time PCR 法

プライマーは、国立感染症研究所病理部尾崎・佐多両氏の設計したものを用いた(未発表)。

Real-time PCR 法は、QuantiTect Probe PCR kit(QIAGEN)およびABI 7900HTを用いた。95°C 15min の初期活性化ののち 94°C 15min-60°C 60sec を 45 サイクル施行、コピー数を測定した。

[3] 若い女性の HSV-1,2 抗体、クラミジア・ト

ラコマチス抗体保有率

(1) 対象：平成 15 年と平成 16 年に東京近郊の某短大 2 年(20 才前後)に在学中の女子学生より採取した血清のうちで同意の得られた平成 15 年度 173 例、平成 16 年度 150 例、計 323 検体についてコード化して検体とした。

(2) 方法：クラミジア・トラコマチスはペプタイトクラミジア(明治乳業)、単純ヘルペスウイルス 1 型と 2 型は Herpe Select HSV-1,HSV-2(Focus 社)を用いて型特異的抗体を測定した。それぞれ IgG 抗体を測定した。

[4] 倫理面への配慮

(1) 臨床検体：患者に現在保険適用のある抗原検出法は非常に感度が悪いので、口頭で保険では認められていないが世界的に gold standard である分離検査を行う旨伝え了承を得た。本検体について個人が特定できないようにコード化し、藤田保健衛生大にて LAMP 法を行った。

(2) 血清疫学：平成 15 年と平成 16 年において某看護短大の 2 年生に先ず本研究についての意義について説明し、病院実習に入る前に学校として行っている小児伝染病に対する抗体検査のために採血した血清について検査終了後に残った血清を第三者が個人を特定できないようにコード化した上で、単純ヘルペスウイルス、クラミジア・トラコマチス抗体の有無を測定したい旨とその結果を学会等で発表することもあり得る旨を述べ協力を依頼した。約 2 ヶ月後書面で同意の得られた者についてのみ個人の特定ができないように血清をコード化して検体として用いた。

C. 研究結果

(1) ウイルス分離結果

164 検体中 HSV-1 を分離した検体は 5 検体(3%)、HSV-2 を分離した検体は 14 検体(9%)であった。

(2) LAMP 法による検出結果

HSV-1 を検出したものは、直接法 13 検体(8%)、DNA 抽出法で 11 検体(7%)であった。HSV-2 を検出したものは、直接法 13 検体(8%)、DNA 抽出法で 21 検体(13%)であった。

分離培養法をスタンダードと考えて比較した。

	HSV-1		HSV-2	
	直接法	DNA 抽出	直接法	DNA 抽出
感度	100%	100%	71%	100%
特異度	95%	96%	98%	95%
陽性予測値	38%	45%	77%	67%
陰性予測値	100%	100%	97%	100%

(3) Real-time PCR 法

i) 特異性の検討

HSV-1,41 株はすべて Real-time PCR 法で HSV-1 と同定された。HSV-2,45 株もすべて HSV-2 と同定された。また、特異性を検討するためヘルペスウイルス群の HHV 3,4,5,6,7,8 の 6 種について検討したが、それらは全て HSV-1、HSV-2 のプライマーを用いた反応では陰性であり、他のヘルペスウイルス群との交差はなかった。

ii) 定量性の検討

すべての株において、原液からの 10 倍段階希釈に相応して Real-time PCR 法の値も桁数が減少し定量性が確認された。株により差はあるが、検出できるコピー数は 10 倍段階希釈において 10^{-3} ~ 10^{-5} に分布した。

同一希釈濃度における分離培養法と本法との検出感度の比較を行った。培養法より優るもの、ほぼ同等(同じか 10 倍の差)、劣るの 3 段階に

分けた。

	優る	ほぼ同等	劣る	計
HSV-1	12	23	6	41
	35(85.4%)		(14.6%)	
HSV-2	4	33	8	45
	37(82.2%)		(17.8%)	
	72(83.7%)		14(16.3%)	

HSV-1,41 株では 85.4%、HSV-2,45 株では 83.7% が同等以上であった。

(4) 女子学生における単純ヘルペスウイルス 1 型 2 型、クラミジア・トラコマチスに対する抗体保有率

i) 単純ヘルペスウイルス

HSV-1 抗体陽性 323 例中 110 例(31.9%)、HSV-2 抗体陽性例 19 例(3.7%)、HSV-1 抗体と HSV-2 抗体の両方陽性例 7 例(2.2%)であった。HSV-2 抗体陽性例は 16 例(5.9%)であった。陰性例は 201 例(62.2%)であった。

ii) クラミジア・トラコマチス抗体保有率

323 例中 39 例(12.1%)に陽性であった。

D. 考察

(1) LAMP 法は、HSV-1 については感度・特異度共にほぼ分離法と同程度と考えられた。HSV-2 では特異度はよいが感度が分離法よりやや低くプライマーの検討が必要である。DNA の抽出を省略した直接法においても検出できた点は検査法の簡略化という点で評価できる。

本法は、HSV-2 についてなお改善すべき点は残るが、分離培養法とほぼ感度は同等なので臨床応用は可能である。今後は検体の採取液の検討が必要である。

(2) Real-time PCR 法については、今回設計したプライマーは、型特異性は完璧で本邦で分離した HSV-1,41 株、HSV-2,45 株を完全に型別することができた点から高く評価できる。Real-time PCR 法は、感度・特異度共に分離法と 85%はほぼ同等かそれ以上であった。ただ、HSV-1 株の 14.6%、HSV-2 株の 19.8%に分離よりも感度が低いものがみられた。

全体として、本プライマーを用いた Real-time PCR 法は本邦における核酸増幅法のスタンダードとして用いることができると考える。

今後は、臨床検体について検討する必要がある。

(3) 核酸増幅法の臨床応用にむけての課題

一般臨床における性器ヘルペスの検査法（実験室診断法）の確立のためには以下の点の解決が必要である。

① 臨床レベル

- 1) 検体採取の部位：病変（潰瘍、水疱内容）
- 2) 採取器具：綿棒かダクロン製か、
- 3) 検体の採取液：生食、培養液、DNA 抽出液、水のどれがよいか、
- 4) 検体の保存可能な温度と時間
- 5) 外陰や膣に存在する反応阻害物質の検討
- 6) contamination の対策

② 実験室レベル

- 1) プライマーの精度と限界
- 2) 判定基準の検討
- 3) 定量性の検討

③ 結果の解釈

- 1) 臨床検体における感度と特異性
- 2) 偽陽性、偽陰性の検討と対策
- 3) 定量性の検討と評価
- 4) 臨床的意義:無症候性 HSV 排泄も含めて

④ 一般臨床の応用

- 1) 大手臨床検査期間での検査の可能性
: 経済性、需要度
- 2) 保険収載
- 3) 臨床医への PR

(4) 性器ヘルペスの蔓延度に関する考察

多数の若い女性における HSV-2 の蔓延度を調べた報告はほとんどなかった。HSV-2 は性的接触により伝播するが、この集団での 5.9% という頻度は、従来の妊婦における検出頻度とあまり変わっていない。HSV-2 抗体保有率だけからみるとこの値は世界的に最も低い群に属している。しかし、性器には HSV-1 も感染するので HSV-1 抗体陽性者のうちの一部は性的接触により感染したものと考えられる。筆者の女性の初発性器ヘルペスの 4 割が HSV-1、6 割が HSV-2 というデータから次のように推察している。即ち、HSV-2 によるものの 3 分の 2 が HSV-1 による性器感染と仮定すると約 4% が性的接触により感染している可能性がある。つまり、この集団の $6\% + 4\% = 10\%$ 程度が性的接触により HSV に感染していると考えられる。CT 抗体は 12.1% に陽性であったが、これに近い値である。

CT 抗原の検出率の約 2 倍程度が抗体が検出されると云われているので、今井氏が当研究班で発表している高校 2 年女子の CT 抗原検出率 5.6% の約 2 倍となりほぼ現在の女子学生の感染率を示していると思われる。

血清学的にみると、性器の CT 感染と HSV 感染の頻度にはそれ程大きな開きはないと考えられる。

E. 結論

(1) 感度・特異度が良く、しかも、短時間に結果を知ることができる上に検体の保存や搬送が容易であることを考えると、核酸増幅法が今後の病原診断法としては最も適している。基礎的な検討からは、LAMP 法と Real-time PCR 法の優劣はつけ難いが、費用・商業検査機関での検査体制などを考慮して選択することになるだろう。

(2) 若い女性に性器ヘルペスは、性器クラミジア感染症よりはやや低いもののかなり蔓延している可能性がある。

F. 研究発表

1. 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 卷 (臨時増刊号) 金原出版社 ; 2003.
- 6) Kawana T : 29 years' experience of clinical and virological studies on female genital herpes in Japan. HERPES 11 (1) 21-22; 2004.
- 7) 川名 尚 : ウイルス性性感染症ー性器ヘルペス

- 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)
- 8) 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 15:144-148;2004.
- 9) 川名 尚：性器ヘルペスの血清診断。ENTONI 43:50-55;2004.
- 10) 川名 尚：性器の単純ヘルペスウイルス感染症 — 潜伏感染と再活性化 —。臨床と微生物 32:452-454; 2005.
- 11) 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 43:951-5;2005.
- 12) Sugiyama H, Yoshikawa T, Ihira , 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 75:583-587;2005.
- 13) 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 75(3):421-6;2005.
- 14) 川名 尚、宮本智子、加藤真子、曲山さち子、西澤美香、沖永荘一：母子感染の立場からみた本学学生の抗体保有率の評価。帝京平成短期大学紀要 15:3-5; 2005.
- 15) 西澤美香、川名 尚、村田照夫、西井 修：女性性器ヘルペス初感染例における型特異的血清診断に関する研究。日本性感染症学会誌 16(1):97-103;2005.
- 16) 川名 尚、塚越静香、西井 修：性器ヘルペスの診断と治療 — 最近の動向 —。産婦人科の世界 57(12):107-113;2005.
2. 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。
- 3) 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、2004年6月、大阪。
- 4) 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、2004年6月、大阪。
- 5) 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、2004年12月、東京。
- 6) 川名 尚：「再発型性器ヘルペス—臨床・診断・新しい治療法—」。第93回日本泌尿器科学会教育セミナー。2005年4月、東京。
- 7) 川名 尚：「性器ヘルペスの診断」。第53回日本化学療法学会シンポジウム。2005年4月、東京。
- 8) 川名 尚：性器ヘルペスの診断と治療。第69回日本皮膚科学会東部支部学術大会。2005年9月、

盛岡.

9) 川名 尚 : Serological analysis for pathogenesis of female genital herpes simplex virus infection in Japan. IHMF 第 12 回総会. 2005 年 10 月、ポルトガル (リスボン) .

10) 川名 尚、西澤美香、西井 修 : 性器ヘルペスの臨床分類と感染病態について. 日本性感染症学会第 18 回学術大会. 2005 年 12 月、小倉.

11) 川名 尚、西澤美香、西井 修 : 女子学生における単純ヘルペスウイルス 1 型と 2 型、サイトメガロウイルス、クラミジア・トラコマチスに対する抗体保有率について. 第 18 回日本性感染症学会学術大会. 2005 年 12 月、小倉.

12) 塚越静香、川名 尚、西澤美香、西井 修 : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による性器ヘルペス迅速診断の検討. 第 18 回日本性感染症学会学術大会. 2005 年 12 月、小倉.

13) 西澤美香、川名 尚、塚越静香、村田照夫、西井 修 : 単純ヘルペスウイルス感染における型特異的抗体の Avidity Index 測定法の開発とその応用. 第 18 回日本性感染症学会学術大会. 2005 年 12 月、小倉.

G. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

なし

2) 実用新案登録

なし

3) その他

なし

厚生労働科学研究費補助金[新興・再興感染症研究事業]
総合研究報告書

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

分担研究者 萩原正則
松尾光馬
本田まりこ

東京慈恵会医科大学附属青戸病院皮膚科

研究要旨：

我々は HPV-6,11,16,18 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。コントロール DNA による基礎検討で、型特異的な増幅が確認できた。外陰部隆起性病変を有する 27 名の患者より 27 の組織検体を採取し臨床検体による検討を実施した。尖圭コンジローマ 21 例、ポーエン様丘疹症 2 例、脂漏性角化症 2 例、epidermolytic acanthoma 1 例、hairy nymphae 1 例であった。尖圭コンジローマ 21 例中、18 例に HPV-6、3 例に HPV-11 を検出し、混合感染はなかった。ポーエン様丘疹症 2 例のうち 1 例において HPV-16 を検出した。脂漏性角化症、epidermolytic acanthom、hairy nymphae では検出されなかった。これらは PCR 法の型判定の結果にほぼ一致した。平均反応時間は約 59 分であった。LAMP 法は感度、特異度、迅速性、簡便性に優れ、病院検査室レベルでの臨床的応用が期待できる。

A.研究目的

ヒト乳頭腫ウイルス (human papillomavirus;HPV)はパポバウイルス科に属する小型の DNA ウイルスであり、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、HPV-6 型や 11 型などのローリスク/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。診断は臨床像から行われるが、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ハイリスク型 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 (ISH 法) や、サンプルから DNA を抽出して行う Southern blot hybridization 法, dot blot hybridization 法, PCR 法, real time 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, real time PCR 法は、サーマルサイクラーなどの高価な特殊機器、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。

LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法は、PCR 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 と同等以上の増幅効率、感度を実現している。反応は 60~65°C の等温で進行し、反応過程で出現する白濁を利用して増幅を検出すると、全工程が約 1 時間の 1 ステップで終了する。近年種々の感染症（単純ヘルペスウイルス、帯状疱疹ウイルス、Mycobacterium avium, HHV6, HHV7, 西ナイルウイルス、アフリカントリパノソーマ）に対する迅速診断としてこの方法は有効であると報告されている。

本研究では、HPV-6,11,16,18 各々のプライマーを設計し特異性、感度、迅速性について、PCR 法と比較検討した。

B. 研究方法

<患者と臨床検体>

2004 年 1 月から 2005 年 12 月まで 2 年間に東京慈恵会医科大学附属青戸病院皮膚科を受診した外陰部隆起性病変を有する 27 名の患者（男 19 女 8, 平均 39 歳）から皮膚生検により 2 箇所ずつ組織検体を採取した。1 つはホルマリン固定し、病理組織学的診断を行った（尖圭コンジローマ 21 例、ボアエン様丘疹症 2 例、脂漏性角化症 2 例、epidermolytic acanthoma 1 例、hairy nymphaeal 1 例）。もう一方は DNA 抽出用に -80°C に保存した。

皮膚生検とウイルス学的検査については、慈恵医大倫理委員会の承認後、患者のインフォームドコンセントを得て行い、残存病変に対して炭酸ガスレーザー（日本赤外線工業）でアブレーションした。

<DNA 抽出>

QIAamp DNA Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) を使用して DNA 抽出を行った。抽出した DNA は 200 μ l の精製水で溶出し、-20°C に保存した。

<コントロール DNA の準備>

LAMP 法の特異性と感度を決定するために、HPV-1a, 2, 3, 5, 6, 10a, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 及び 58 の計 13 個の HPV-DNA を pBR322 にそれぞれ組み込みクローン化した。plasmid は QIAplep Spin Miniplep Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) を使用して DNA 抽出を行った。抽出した DNA は 50 μ l の精製水で溶出し、-20°C に保存した。

<HPV 型特異的 LAMP 法>

LAMP 反応は Notomi et al.(2002), Nagatomi et al.(2002) に従い実行した。LAMP 法は計 6 個の明確な target DNA sequences (B1-B3, F1-F3) を認識するために、4 つのプライマーを必要とする。

Primer Explorer V software (FUJITSU, Tokyo, JAPAN) を用いて HPV-6 の E6 領域、HPV-11 の E6 領域、HPV-16 の E7 領域、HPV-18 の E6 領域に対し primer を設計した。

LAMP 反応は Loopamp DNA amplification kit (Eiken Tochigi, Japan) を使用し実施した。25 μ l の reaction mixtures は 1.6 μ M の各々の inner primer (FIP と BIP), 0.2 μ M の各々の outer primer (F3 と B3), 2 \times reaction mix (12.5 μ l), Bst DNA polymerase (1 μ l), 及びそれぞれのサンプル 5 μ l を含んだ。reaction mixtures は 63°C, 120 分インキュベーションした。そして TERMAMECS LA200 (Teramecs, Kyoto, Japan) で濁度を測定した。濁度上昇は、5 つの陰性検体の平均濁度+3SD より 0.1 以上に達した検体を陽性とした。濁度測定後、LAMP 産物は 1.5% アガロースゲルで電気泳動した。サンプルのコンタミネーションを避けるために、DNA 抽出と LAMP のセットアップは別の部屋で行い、噴霧防止のフィルター付きピペットチップを使用した。

<PCR>

PCR 反応は吉川らに従い、少なくとも HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52, 58 の 9 個の typing が可能な consensus primer を用いて施行した。すなわち LIC1(5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTT-3'), LIC2(5'-TACCCTAAATACTCTGTATTG-3'), 及び LIC2M(5'-TACCCTAAATACCCTATATTG-3') で実行した。1.25U *Taq* DNA polymerase(TaKaRaBioMedicals, Tokyo, Japan)使い, TaKaRa thermal cycler (TaKaRaBioMedicals)で degeneration(95 °C, 1.5 分)annealing(48 °C, 1.5 分)extension(70°C, 2 分)40cycle 行った。PCR 産物は ethidium bromide 含有の 4% agarose gel で電気泳動した。更に制限酵素 Dde I と Rsa I で RFLP assay し typing した。

C.研究結果

<LAMP 法の特異性>

HPV-6, 11, 16, 18 特異的 primer の特異性を評価した。コントロール DNA に対し各々の primer により LAMP 法を実施した。LAMP 産物は標的遺伝子の相補的な配列が繰り返した構造がいろいろなサイズのできるために、電気泳動上ラダーパターンとなる。いずれも primer 特異的に典型的なラダーパターン、濁度上昇が認められ、その他のウイルス DNA ではそのような結果は得られなかった。

<臨床検体による検討>

これらの基礎検討の後、臨床検体による検討を行った。27 例の組織検体を外陰部隆起性病変より集めた。PCR 法, LAMP 法の結果を表 1 に示す。型特異的 LAMP 法により, 27 例中 18 例に HPV-6

が検出された。27 例中 3 例に HPV-11 が検出された。尖圭コンジローマ全 21 例においてこれら HPV-6 ないし HPV-11 が検出された。27 例中ボーエン様丘疹症の 1 例に HPV-16 が検出された。HPV-18 の検出はなかった。重複検出はなく、合わせて 22 例に HPV-DNA を検出した (n=27)。全体の平均検出時間は 59 分 9 秒であった。

一方 PCR 法では 27 例中 20 例に HPV-DNA を検出した。RELF assay では, HPV-6 型 18 例, HPV-11 型 2 例, HPV-16 型 1 例に typing され, いずれも LAMP 法の結果に一致した (表 2)。LAMP 法で検出された HPV-11 型 3 例のうち 1 例 (sample No.21) は PCR 法で検出されなかった。

D.考察

E6/7 領域にプライマー設定することにより、LAMP 法による HPV-6、11、16、18 特異的 DNA 増幅法が確立できた。基礎検討にて特異性を確認した後、臨床検体として外陰部隆起性病変の組織検体を対象として検討したが、LAMP 法は PCR 法とほぼ同等の感度で増幅することができた。交差性はなく、臨床検体の解析においても信頼性が高いことが確認された。平均検出時間は 59 分 9 秒であり、LA-200 による濁度測定によっても臨床検体の解析で十分な感度が確認された。アガロースゲル電気泳動の省略は、検査の簡略化、迅速化の面で有用と思われる。

E.結論

LAMP 法は感度、特異度、迅速性、簡便性に優れ、病院検査室レベルでの臨床的応用が期待できる。

F.研究発表

1. 論文

- ・萩原正則ほか：Imiquimod が有効であった肛囲尖圭コンジローマの 1 例. 日性感染症会誌, 2005 ; 16(1) : 127-129
- ・松尾光馬ほか：性器ヘルペス. 日性感染症会誌, 2005 ; 16(1) : 24-29
- ・本田まりこほか：皮膚疾患とウイルス感染症. 小児科治療, 2005 ; 68(11) : 2073-79
- ・萩原正則：イミキモッド. カラーアトラス 疣贅治療考, 医歯薬出版, 東京, p.123-125, 2006

2. 学会発表

- ・第 789 回日本皮膚科学会東京支部研究地方会 (2004 年 3 月 13 日) 新規核酸増幅 (LAMP) 法による VZV HSV 感染症の検討
- ・第 17 回日本性感染症学会 (2004 年 12 月 4 日) DNA 診断で何が言えるか：性器ヘルペス
- ・第 798 回日本皮膚科学会東京支部研究地方会 (2005 年 3 月 19 日) Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法による HPV DNA 検出の試み
- ・第 798 回日本皮膚科学会東京支部研究地方会 (2005 年 3 月 19 日) LAMP 法による性器ヘルペス無症候性ウイルス排泄の検討
- ・第 802 回日本皮膚科学会東京地方会 (2005 年 9 月 17 日) 外陰部に生じた epidermolytic acanthoma の 2 例
- ・第 18 回日本性感染症学会 (2005 年 12 月 3 日) 性器ヘルペスの無症候性排泄

G.知的所有権の取得状況

プライマーに対し現在特許申請中

表1a : PCR,real-time PCR法とHPV-6,11 LAMP法の比較

No. of samples	Histopathological diagnosis	Typing by PCR	Copy numbers determined by real-time PCR(HPV-6) (copies/tube)	LAMP(HPV-6)		Copy numbers determined by real-time PCR(HPV-11) (copies/tube)	LAMP(HPV-11)	
				turbidity (sec)	electrophoresis		turbidity (sec)	electrophoresis
1	CA	HPV6		2856	+		-	-
2	CA	HPV6		3204	+		-	-
3	CA	HPV6		3348	+		-	-
4	CA	HPV6		3378	+		-	-
5	CA	HPV6		3516	+		-	-
6	CA	HPV6		3642	+		-	-
7	CA	HPV6		3690	+		-	-
8	CA	HPV6		3720	+		-	-
9	CA	HPV6		3822	+		-	-
10	CA	HPV6		3828	+		-	-
11	CA	HPV6		3924	+		-	-
12	CA	HPV6		3942	+		-	-
13	CA	HPV6		3978	+		-	-
14	CA	HPV6		4242	+		-	-
15	CA	HPV6		4446	+		-	-
16	CA	HPV6		4464	+		-	-
17	CA	HPV6		4770	+		-	-
18	CA	HPV6		4884	+		-	-
19	CA	HPV11		-	-		1830	+
20	CA	HPV11		-	-		2226	+
21	CA	-		-	-		2244	+
22	BP	HPV16		-	-		-	-
23	BP	-		-	-		-	-
24	SK	-		-	-		-	-
25	SK	-		-	-		-	-
26	EA	-		-	-		-	-
27	HN	-		-	-		-	-

表1b : PCR,real-time PCR法とHPV-16,18 LAMP法の比較

No. of samples	Histopathological diagnosis	Typing by PCR	Copy numbers determined by real-time PCR(HPV-16) (copies/tube)	LAMP(HPV-16)		Copy numbers determined by real-time PCR(HPV-18) (copies/tube)	LAMP(HPV-18)	
				turbidity (sec)	electrophoresis		turbidity (sec)	electrophoresis
1	CA	HPV6		-	-		-	-
2	CA	HPV6		-	-		-	-
3	CA	HPV6		-	-		-	-
4	CA	HPV6		-	-		-	-
5	CA	HPV6		-	-		-	-
6	CA	HPV6		-	-		-	-
7	CA	HPV6		-	-		-	-
8	CA	HPV6		-	-		-	-
9	CA	HPV6		-	-		-	-
10	CA	HPV6		-	-		-	-
11	CA	HPV6		-	-		-	-
12	CA	HPV6		-	-		-	-
13	CA	HPV6		-	-		-	-
14	CA	HPV6		-	-		-	-
15	CA	-		-	-		-	-
16	CA	HPV6		-	-		-	-
17	CA	-		-	-		-	-
18	CA	HPV6		-	-		-	-
19	CA	HPV11		-	-		-	-
20	CA	HPV11		-	-		-	-
21	CA	-		-	-		-	-
22	BP	HPV16		2124	+		-	-
23	BP	-		-	-		-	-
24	SK	-		-	-		-	-
25	SK	-		-	-		-	-
26	EA	-		-	-		-	-
27	HN	-		-	-		-	-

表2 Differentiation of HPV type 6 ,11 ,and 16 by PCR RELP and LAMP

		PCR RELP			
		HPV-6	HPV-11	HPV-16	negative
	HPV-6 (n=18)	18	0	0	0
L A M P	HPV-11 (n=3)	0	2	0	0
	HPV-16 (n=1)	0	0	1	0
	negative (n=5)	0	0	0	5

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
分担研究報告書

性の健康相談室を通じての市民のSTD/HIV感染調査と予防に関する研究

分担研究者 松田 静治 （財）性の健康医学財団 副理事長

研究要旨

本研究では、1. Eメールによる“性の健康相談”での性の悩みについての相談・啓発を通して、また、2. より具体的に“性の健康相談室”での個別相談・検診を通してSTD/HIV感染の発見・予防啓発に努め、若年層のSTD/HIV感染の蔓延防止に貢献することを目的とした。

1. Eメールによる“性の健康相談”は、若者に対して性の健康を促進・助成するため、インターネットホームページおよび携帯電話用ホームページにサイトを開設し、「性の健康メール相談」と銘打ちメールによる相談を行った。本報告は2004年4月から2006年2月末日までに寄せられた相談を、予め用意したコーディング表をもとに内容の分析を行った

2. “性の健康相談室”においては、募集に応じ来訪した相談者に対し、専門の医師が身体的な検診と共に、淋菌、クラミジア、HIV、HPV(女性のみ)、梅毒、HSV、HBV、HCVの検査を行った。その際、質問票により性行動の実態調査も試みた。

“性の健康相談室”には平成16年4月～平成18年1月末までに180人（男性42%：女性58%）の相談者が来訪した。

健康相談室の情報取得手段としては、ホームページ（携帯サイトを含む）が約7割と群を抜いて多く、相談者の募集にインターネットの活用が効果的であることが分かった。

STD/HIV感染の診断では、クラミジア感染が顕著で、特に女性では感染率12%と、相談者の8～9人に1人の割合で感染していることが明らかになった。

性行動については、相談者の初交年齢の最年少は14歳で、6割弱が15-19歳グループに分類され、性体験の低年齢化が確認された。

研究協力者：阿曾 佳郎（性の健康医学財団）
小島 弘敬（性の健康医学財団）
堀口 雅子（主婦会館クリニック）
堀口 貞夫（主婦会館クリニック）
本田まりこ（慈恵会医科大学青戸病院）
荻野 員也（ヒューマンサイエンス振興財団）

A. 研究目的

STD/HIV 感染の蔓延を防止するためには、検査による感染の早期発見・早期治療、また性的に活発な若年層への感染予防啓発が必須である。

そこで、本研究は若年層の STD/HIV 感染の蔓延防止に貢献するために、第一に性的活動が活発な若い人たちが利用しやすいツールである E メールによる“性の健康相談”（“性の健康メール相談”）を通して性の悩みについての相談に対応し、相談者が抱える悩みや問題を明確化し、今後の効果的な予防啓発の方法を検討した。第二に、匿名・無料・完全予約制の“性の健康相談室”を設置し、若い人たちが STD/HIV 感染について相談し、検診を受けることができるシステムを構築し、このシステムを通して、STD/HIV 感染の実態調査、予防啓発に努めた。

B. 研究方法

1. “性の健康メール相談”：

インターネットホームページ (<http://www.jfshn.org>) および携帯電話用ホームページ (<http://www.jfshn.org/mobile>) にサイトを開設し、本相談について紹介し、専属の相談員が週日、日中常時待機し、できる限り早く、質問に対する回答をした。

2. “性の健康相談室”を通しての相談、検診、啓発：

来訪する相談者に十分配慮した、プライバシーを保てる快適な相談・検診室を（財）性の健康医学財団附属クリニック内に設置した。ホームページ (<http://www.jfshn.org>)、携帯サイト (<http://www.jfshn.org/mobile>)、都内保健所、区役所を通して、また、高校

の講演会等集会時にリーフレット、メッセージ・カードを配布し、本相談室について告知に努め、相談者を募った。平成 17 年度は携帯サイトに容易にアクセス可能な QR コードを配布資料に掲載した。

なお、平成 16 年度は対象者の制限をしなかったが、17 年度は 40 歳以下とした。

相談は、本研究班研究者を中心とした医師が担当した。実施日時は、通常週日 2 回午後 6 時から 8 時、土曜日午前 10 時から午後 2 時。予約制で、1 人の相談者に約 1 時間かけ、相談者の満足のいく相談・検診・啓発を心掛けた。

相談者は予約日時に来訪し、登録質問票および STD/HIV 感染に関する相談前質問票を記入の後、相談、検診を終え、さらに相談後質問票を記入した。その相談前後の質問票で、相談による啓発の程度の評価を試みた。

検診は身体的な検診と共に、淋菌、クラミジア、HIV、HPV（女性のみ）、梅毒、HSV、HBV、HCV の検査を行った。

検査法は次の通り。

血清については、HIV 抗体・抗原(スクリーニング)：EIA 法、梅毒定性：TPHA 法／ガラス板法、クラミジアトラコマチス抗体：IgA/IgG (EIA 法)、HCV 抗体 3：IRMA、HBs 抗原：CLIA。

スワブまたは尿については、クラミジアトラコマチスおよび淋菌同定：ロシユ PCR (平成 16 年度)・SDA 法(平成 17 年度)、HPV-DNA 同定、HSV 特異抗原検出。

また、正確な STD に関する知識の普及啓発を図るため、若い人たちが受け入れ易いパンフレットを手渡した。