

特集 性感染症の診断・治療と予防

# 1. 性感染症 (STD) の最近の動向

橋戸 円

国立感染症研究所感染症情報センター

Key Words/STD, 疫学, 発生動向調査

## 要旨

わが国の STD 発生動向調査で監視している性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症、梅毒、HIV/エイズの6疾病について、最近の動向をまとめた。2002年をピークとして、性器クラミジア感染症と淋菌感染症は減少傾向にあり、2004年もその傾向が続いた。とくに若年齢層、そして女性において顕著であった。一方、HIV/エイズは、男性同性愛者において急増している。この解析結果は、現行の発生動向調査の限界をふまえ、交絡因子の検討や他の疫学調査報告との比較を含めて、慎重に解釈する必要がある。

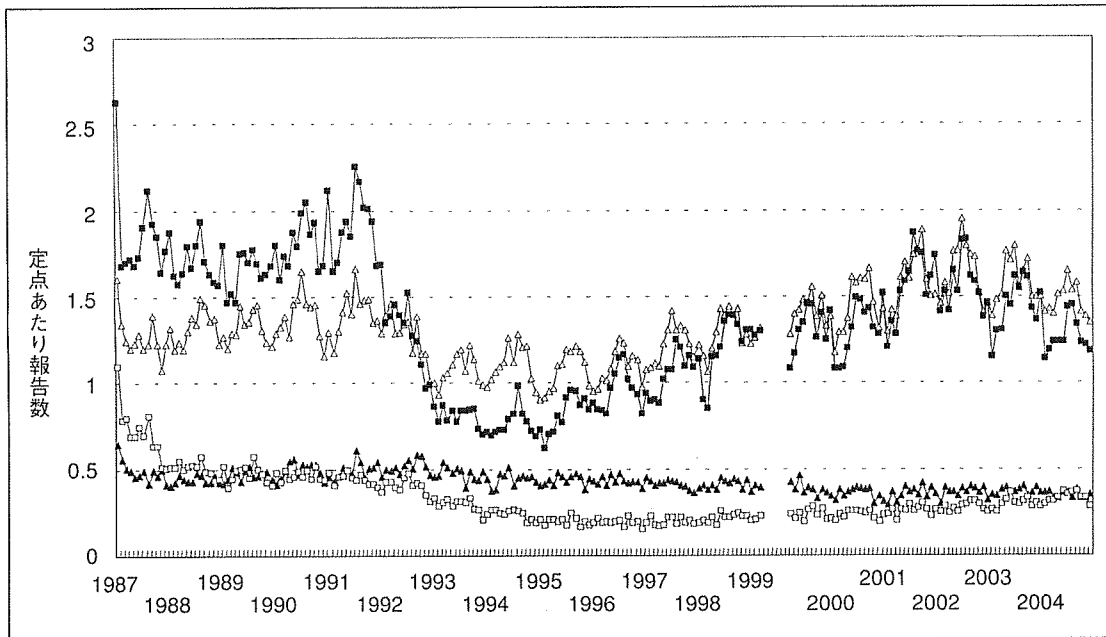
## はじめに

わが国では、平成11年4月から施行（平成15年11月に改正）された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」（以下、感染症法）のもとに、5類感染症の定点把握疾病として性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の4種類、および全数把握疾病として梅毒、これら合わせて5種の性感染症（Sexually Transmitted Diseases、以下、STD）の発生動向調査が行われている。同様に5類の全数把握の対象となっている後天性免疫不全症

候群（HIV/エイズ）も、現在のおもな感染ルートは性的接触であることを考えれば性感染症としてとらえることができる。ここでは、上記STD6疾病の最近の動向を概観してみたい。

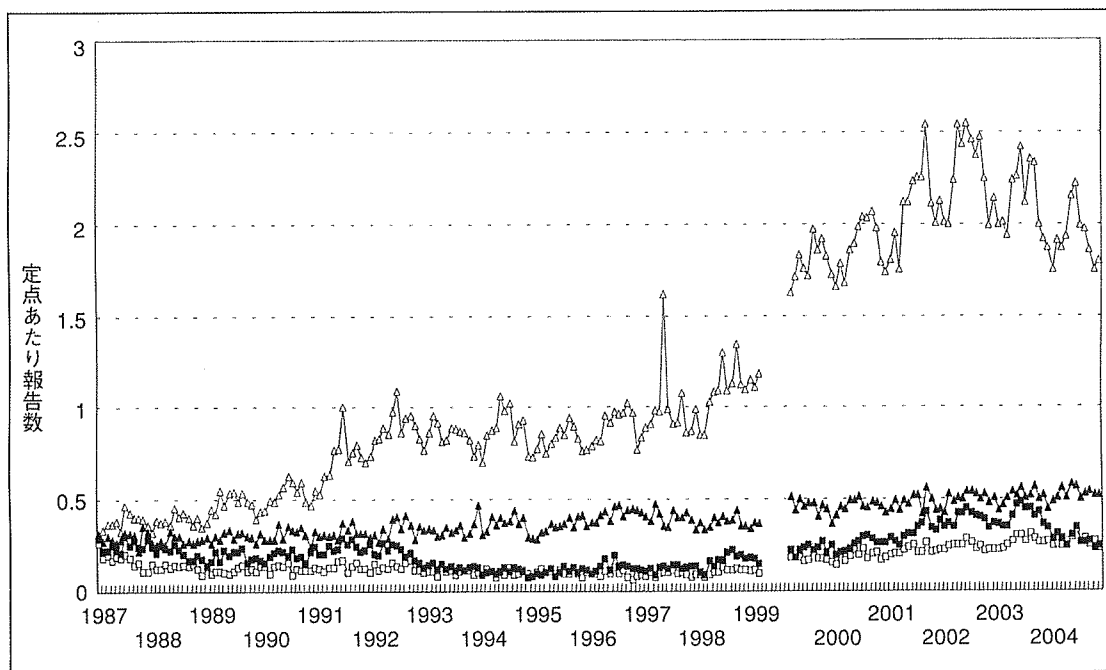
## 発生動向調査の実施方法

発生動向調査がどのように実施されているかについては、文献<sup>1)</sup>を参照してもらうことにし、ここでは簡略に述べる。定点把握対象のSTDは、STD定点として指定された全国で約920の医療機関から管轄保健所に報告され、月ごとにまとめられている。報告内容は、各疾病



(□- 性器クラミジア感染症, △- 性器ヘルペスウイルス感染症, ○- 尖圭コンジローマ, ◆- 淋菌感染症)

図 1a 感染症発生動向調査による性感染症の年次推移 (男性)



(□- 性器クラミジア感染症, △- 性器ヘルペスウイルス感染症, ○- 尖圭コンジローマ, ◆- 淋菌感染症)

図 1b 感染症発生動向調査による性感染症の年次推移 (女性)

の性別、年齢別の人数である。定点の指定は、各都道府県が、産婦人科系（産婦人科または産科もしくは婦人科）と泌尿器科・皮膚科系（性病科または泌尿器科もしくは皮膚科もしくは皮膚泌尿器科）が概ね同数になるように行っている。全数把握対象のSTDは、診断した医師が7日以内に管轄の保健所へ届け出るよう定められている。報告は個人名を除いた個票で行われ、性別・年齢・症状・検査方法・感染経路・感染地等の情報が記載されている。各疾病の届け出基準については、以下の厚生労働省ホームページを参照されたい（<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/kansensyo/kijun.html>）。報告された定点把握STDのデータは、国立感染症研究所・感染症情報センターで解析され、結果は厚生労働省・国立感染症研究所が発行する感染症発生動向調査（IDWR）に掲載されている（<http://idsc.nih.go.jp/kanja/index-j.html>）。エイズに関しては、3カ月ごとに開催される厚生労働省エイズ動向委員会で動向が解析され、結果はエイズ予防情報センターの

ウェブサイトで公開されている（[http://api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou\\_Frame.htm](http://api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou_Frame.htm)）。

## 定点把握 STD の最近の動向

### 1. 経時的トレンド

性器クラミジア、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の定点あたり報告数の年次月別推移を男女別に図1に示した（1999年3月～4月間のギャップは、感染症サーベイランス事業から感染症法へ移行した際に定点数・定点構成の見直しが行われたことを示している）。全体としては、男女ともに性器クラミジアと淋菌感染症の増加を大きなトレンドとして読むことが可能である。この2疾病は、夏に多く冬に少ない季節変動が顕著にみられる。1992年にはエイズに対する認識が高まった影響で他のSTDも減少し、とくに男性で淋菌感染症が激減したが、エイズに対する不安や関心が薄れるとともに1996年からは再び増加に転じてきた。だが、

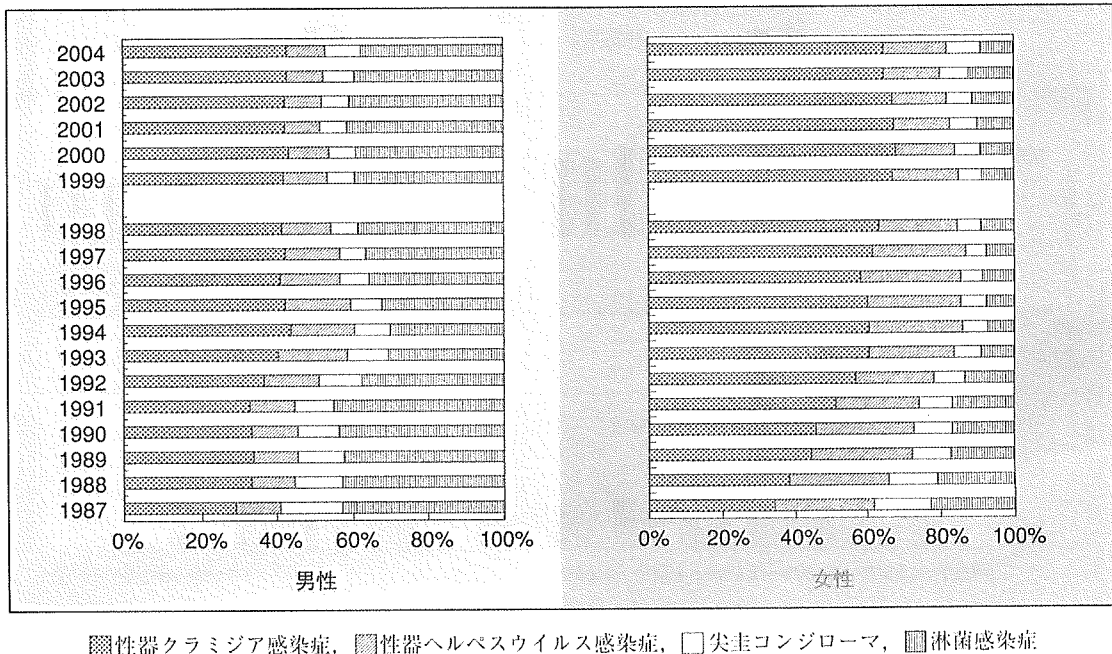


図2 感染症発生動向調査による年次別性感染症の比率

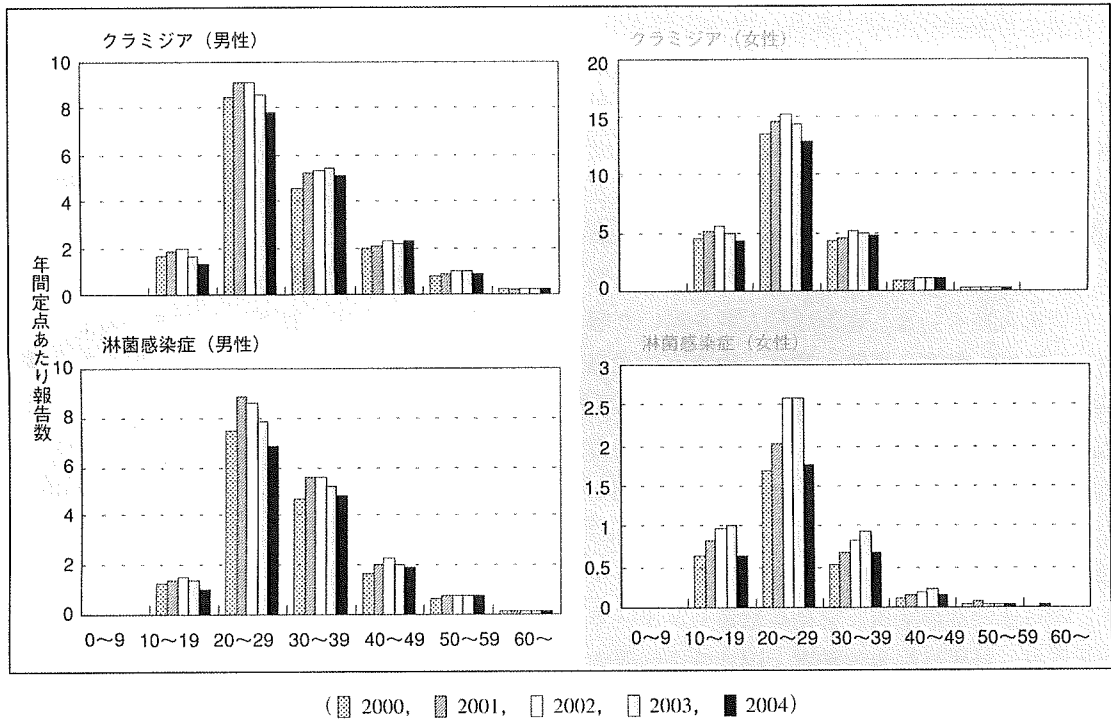


図 3a 感染症発生动向調査による各性感染症の年次別、年齢別患者報告数

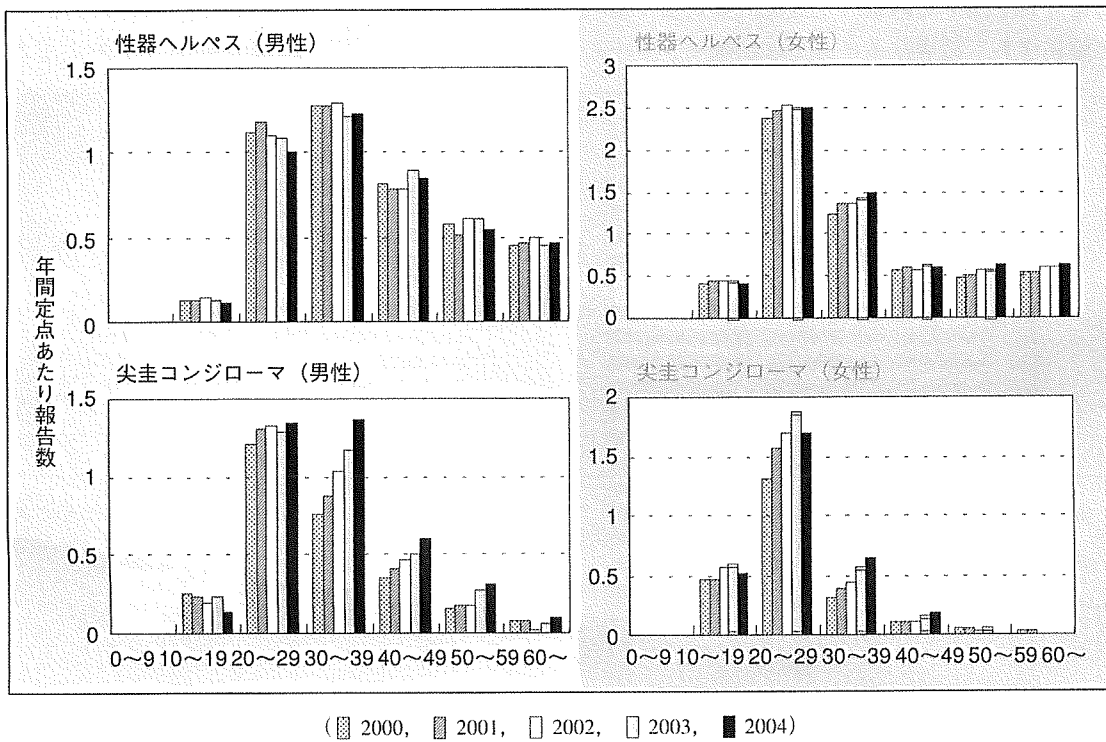


図 3b 感染症発生动向調査による各性感染症の年次別、年齢別患者報告数

2002年をピークとして、性器クラミジア、淋菌感染症は男女ともに減少傾向を示している点、注目される。

2. 疾病の割合

疾病の割合を男女別にみた場合(図2)、現在では男性ではクラミジアと淋菌感染症がほぼ等しく、それぞれ定点把握STD全体の4割を占めている。女性ではクラミジアが約6割を占める。2004年の特徴としては、男女ともに淋菌感染症の割合の低下が見られている。

3. 年齢構成

各疾病について、感染症法施行後の年齢別報告数の経時変化を男女別に示した(図3)、全体に男性では20代、30代が中心であるが、女性の報告数はより若年齢層にシフトしているのが特徴である。2004年はクラミジア、淋菌感染症において、若年齢層での減少が目立った。一方、尖圭コンジローマが30代以降の年齢において、顕著な増加を見せている。

4. 男女比

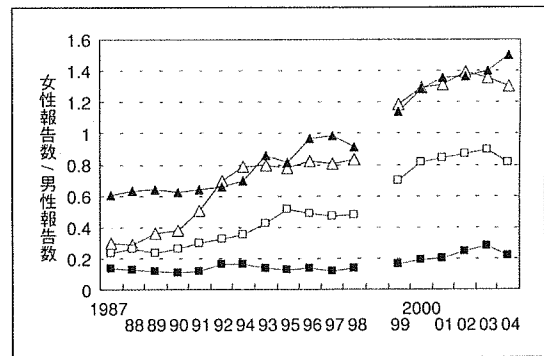
各疾病について、男女比の経時変化を図4に示した。1999年に女性の比率が突然高くなった理由は、STD定点の構成の変更によるものと考

えられる。1999年以降、全体のトレンドとして女性の比率が高くなってきていたが、2004年は、クラミジア、尖圭コンジローマ、淋菌感染症において、女性の比率の低下が見られた。

全数把握STDの最近の動向

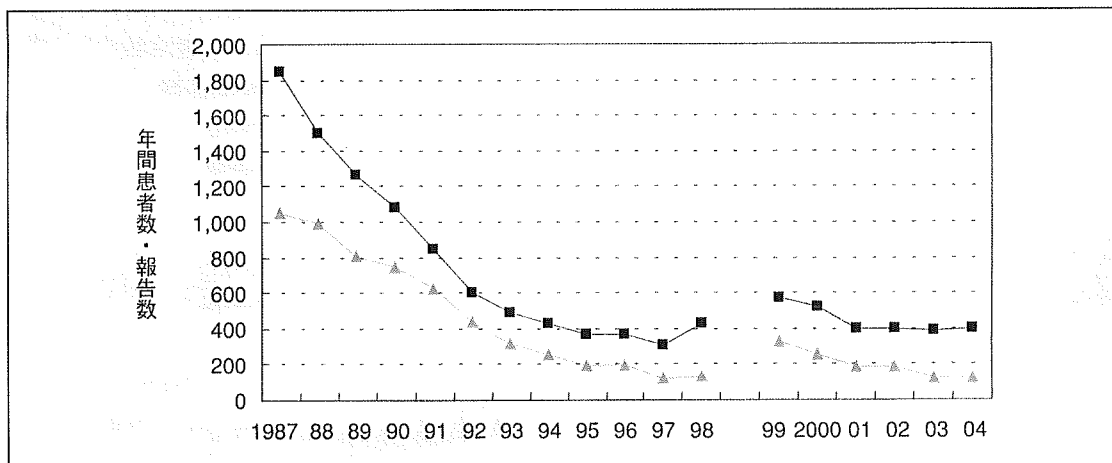
1. 梅毒

1999年3月まで、梅毒は性病予防法に基づい



(—△— 性器クラミジア感染症, —▲— 性器ヘルペスウイルス感染症, —□— 尖圭コンジローマ, —■— 淋菌感染症)

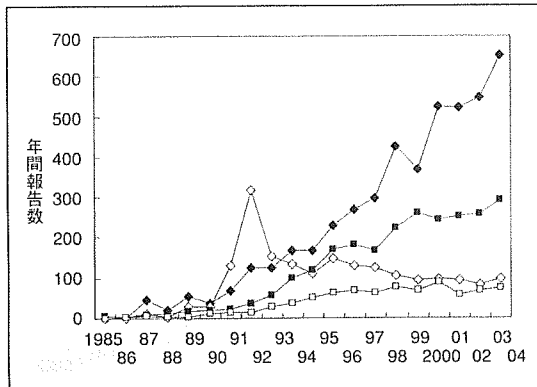
図4 感染症発生動向調査による各性感染症の男女比の年次推移



(—■— 男性, —△— 女性)

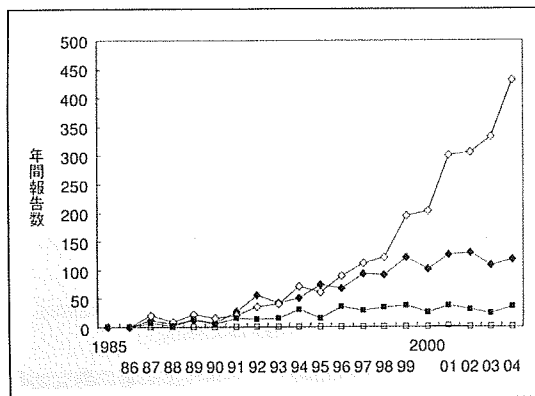
\*1999年の報告数は伝染病統計調査と感染症発生動向調査の合計

図5 伝染病統計調査・感染症発生動向調査による梅毒の患者数・報告数



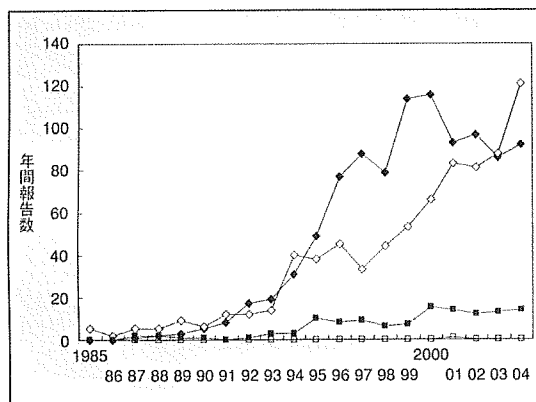
(—●— HIV感染者-日本国籍, —○— HIV感染者-外国国籍,  
—■— AIDS患者-日本国籍, —□— AIDS患者-外国国籍)

図6 HIV感染者およびエイズ患者報告数の年次推移



(—●— 日本国籍男性-異性間, —○— 日本国籍男性-同性間,  
—■— 日本国籍女性-異性間, —□— 日本国籍女性-同性間)

図7 日本国籍 HIV 感染者の感染経路別年次推移



(—●— 日本国籍男性-異性間, —○— 日本国籍男性-同性間,  
—■— 日本国籍女性-異性間, —□— 日本国籍女性-同性間)

図8 日本国籍エイズ患者の感染経路別年次推移

て全数報告がなされていたが、同年4月から性病予防法は廃止、代わって施行された感染症法によって、引き続き全数把握対象疾病に指定されている。両法による患者数・報告数の年次推移を図5に示す。厚生労働省の「性感染症サーベイランス研究班」の報告書<sup>2)</sup>によると、1998～2000年にかけての梅毒患者数（早期顕症のみ）は年間4,000～5,000例と推定されており、その数と比較すると、現行の発生動向調査での捕捉率は10%程度で、信頼できる疫学データが得られているとはいえない。しかし、経時的なトレンドを見る限り、男性は横ばい、女性では減少傾向がみられる。

## 2. HIV/エイズ

HIV/エイズ発生動向に関しては3カ月ごとにエイズ動向委員会が詳細な解析を行っており、病原微生物検出情報や、上述したエイズ予防情報センターのウェブサイトで公開されているので参照していただきたい (<http://idsc.nih.go.jp/kanja/idwr/idwr-j.html>, および [http://api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou\\_Frame.htm](http://api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou_Frame.htm)). HIV/エイズ報告数は、一貫して増加傾向が続いているが（図6）、とくに1999年から日本国籍男性の同性間の性的接触によるHIV感染が著しく増えている（図7）。エイズ患者数の年次推移においても、異性間の性的接触によるものは2000年で頭打ちになっているが、男性の同性間の性的接触によるものは急増している（図8）。

## おわりに

発生動向調査からみたわが国のSTDの最近の動向をまとめた。2002年以降、性器クラミジア感染症、淋菌感染症の減少が見られており、2004年もその傾向が続いた。この減少傾向は、とくに女性において、また、若年齢層において強く、若年齢の女性における淋菌感染症の減少

がもっとも顕著であった。性比をみても、この2疾病では女性の割合が低下している。一方、性器ヘルペスは横ばいから微増、尖圭コンジローマはじりじりと増えているようである。梅毒報告数は報告漏れがきわめて多いため、絶対数としては論じられないが、傾向としては横ばい、女性ではやや減少傾向がみられる。HIV/エイズは、日本人女性および日本人男性異性愛者では横ばいが続いているにもかかわらず、日本人男性同性愛者では驚くべき急増がみられる。

本調査結果が、1990年代後半からわが国におけるSTD増加の主要因となってきた、若年齢、とくに女性での感染増加に歯止めがかかった事実を示唆するものであるとしたら、望ましい状況ではあるが、そう判断するには早計であろう。誤った解析結果を導く交絡因子の検討、たとえば、医療機関を受診しない“隠れた”STD患者が増加している可能性はないか、STD発生動向調査の報告システム自体に不備や変化がないか、STDの現状を示す他の疫学調査レポートと矛盾はないかなど、さまざまな角度から検証を加える必要がある。全数報告が義務づけられている梅毒ですら、多数の報告もれが存在するのが実情である。そのような限界も考慮しつつも、実際に近年減少している可能性について、その原因となった社会状況の変化や、STD防止施策・キャンペーンの効果などを評価し、将来に向けてさらに有効性を高めてゆくための検討を行いたいと考える。一方、HIV感染に関しては、激増している男性同性愛者間の感染拡大を防止するための対策が火急に必要な。この群では、HIVのみならず他のSTDも増加していることが容易に想像できる。

さいごに、現行のSTD発生動向調査の問題点についても若干言及したい。上述の厚生労働省の「性感染症サーベイランス研究班」報告<sup>2)</sup>では、1998～2000年に9道府県においてSTDの全数調査を行っているが、本発生動向調査の

データと比較すると、全体的に女性報告数が多く、本発生動向調査では、とくに女性におけるSTDの広がりが十分把握できていない可能性が示唆されている。そもそも、現行の定点把握STD発生動向調査においては、定点の選定に際して均質性・代表性が確保されていない。STDの場合、小児科系や内科系感染症とは患者の受診行動が大きく異なるので、それらの感染症を対象にしたサーベイランスの手法をそのまま適用しては無理がある。現状では、定量的な推計値の算出やそれらを用いた比較を行うことは困難で、経時的なトレンドの監視を主眼とせざるを得ない点、本発生動向調査のデータを解釈するうえで注意を喚起したい。

感染症法に基づいた発生動向調査は、施行後5年ごとに見直し作業が行われる予定になっている。平成12年2月に告示された「性感染症に関する特定感染症予防指針」の趣旨ののっとり、STD蔓延の防止という目的のもとに、わが国にふさわしいSTD発生動向調査の実施方法について、今後とも多方面での検討が必要であろう。

## 文 献

- 1) 橋戸 円, 岡部信彦: 発生動向調査からみた性感染症の最近の動向. 日性感染症会誌 15 (Suppl): 60-68, 2004.
- 2) 熊本悦明・他: 「日本における性感染症 (STD) 流行の実態調査—2000年度のSTD・センチネル・サーベイランス報告—」. 日性感染症会誌 13:147-167, 2002.

---

### 著者連絡先

(〒162-8640)  
東京都新宿区戸山1-23-1  
国立感染症研究所感染症情報センター  
橋戸 円

---

## 1. わが国における性感染症の現状

橋戸 円\*<sup>1)</sup> 岡部 信彦\*<sup>2)</sup>

わが国のSTD発生動向調査で監視している6疾患、性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症、梅毒、HIV/エイズについて、現状を解説した。1996年から一貫して増加していたが、2003年以降、性器クラミジア感染症と淋菌感染症は減少傾向にあり、2004年もその傾向が続いた。特に若年齢層、女性において顕著であった。一方、HIV/エイズは、男性同性愛者において急増していた。この結果の解釈にあたっては、現行の発生動向調査には、定点構成の不均一や女性患者の捕捉率の低さ、梅毒における多数の報告漏れ等の限界があることをふまえ、他の交絡因子の検討や疫学調査報告との比較の上で、慎重に行われる必要がある。

**Key Words :** STD / 疫学 / 発生動向調査

### I はじめに

性感染症 (sexually transmitted diseases : STD) は性的接触によって感染する感染症の総称でその数は20種を越えるとされるが、平成11年4月から施行(平成15年11月に改正)された「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」(以下、感染症法)のもとで発生動向調査が行われているのは、5類感染症の定点把握疾患として性器クラミジア感染症、性器ヘルペスウイルス感染症、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の4種、および全数把握疾患としての梅毒、これら合わせて5種である。同様に5類の全数把握の対象となっている後天性免疫不全症候群(HIV/エイズ)も、現在の主な感染ルートは性的接触であることを考えれば性感染症としてとらえることができる。ここでは、上記STD6疾患の現状を解説したい。

### II STD発生動向調査の概要

発生動向調査の実施方法の詳細は文献1に譲り、以下に簡略に述べる。定点把握対象のSTDは、STD定点として指定された全国で約920の医療機関から、管轄の保健所に報告されている。定点医療機関は、各都道府県により、産婦人科系(産婦人科または産科もしくは婦人科)と泌尿器科・皮膚科系(性病科または泌尿器科もしくは皮膚科もしくは皮膚泌尿器科)が概ね同数になるように定められている(しかし、現状では、各都道府県における比率にはばらつきがあり、1:1という基準も守られていない)。報告する内容は各疾患の性別、年齢別の人数で、月ごとに保健所でまとめられ、厚生労働省へ報告されている。全数把握対象のSTDは、診断した医師が7日以内に管轄の保健所へ届け出るよう定められている。報告は個人名を除いた個票で行われ、性別・年齢・症状・検査方法・感染経路・感染地等の情報が記載されて

STD trends in Japan, 1987-2004

\* Madoka Hashido, Nobuhiko Okabe 国立感染症研究所・感染症情報センター <sup>1)</sup> 病原診断室主任研究員

<sup>2)</sup> センター長

(1083) 19



特集◎ 性感染症

いる。各疾患の届け出基準については、以下の厚生労働省ホームページを参照されたい (<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/kansensyo/kijun.html>)。報告された定点把握STDのデータは、国立感染症研究所・感染症情報センターで解析され、結果は厚生労働省・国立感染症研究所が発行する感染症発生動向調査(IDWR)に掲載されている (<http://idsc.nih.go.jp/idwr/index.html>)。エイズに関しては、3カ月ごとに開催される厚生労働省エイズ動向委員会でも動向が解析され、結果はエイズ予防情報セン

ターのウェブサイトで公開されている ([http://api-net.jfap.or.jp/siryousiryou/siryou\\_Frame.htm](http://api-net.jfap.or.jp/siryousiryou/siryou_Frame.htm))。

Ⅲ 定点把握 STD の最近の動向

経時的トレンド：性器クラミジア、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の定点あたり報告数の年次月別推移を男女別に図1に示した(1999年3月～4月間のギャップは、感染症サーベイランス事業から感染症法へ移行した際に定点構成が変化したことを示している)。1992年に減少した理由は、エイズに対する認識が高まった影

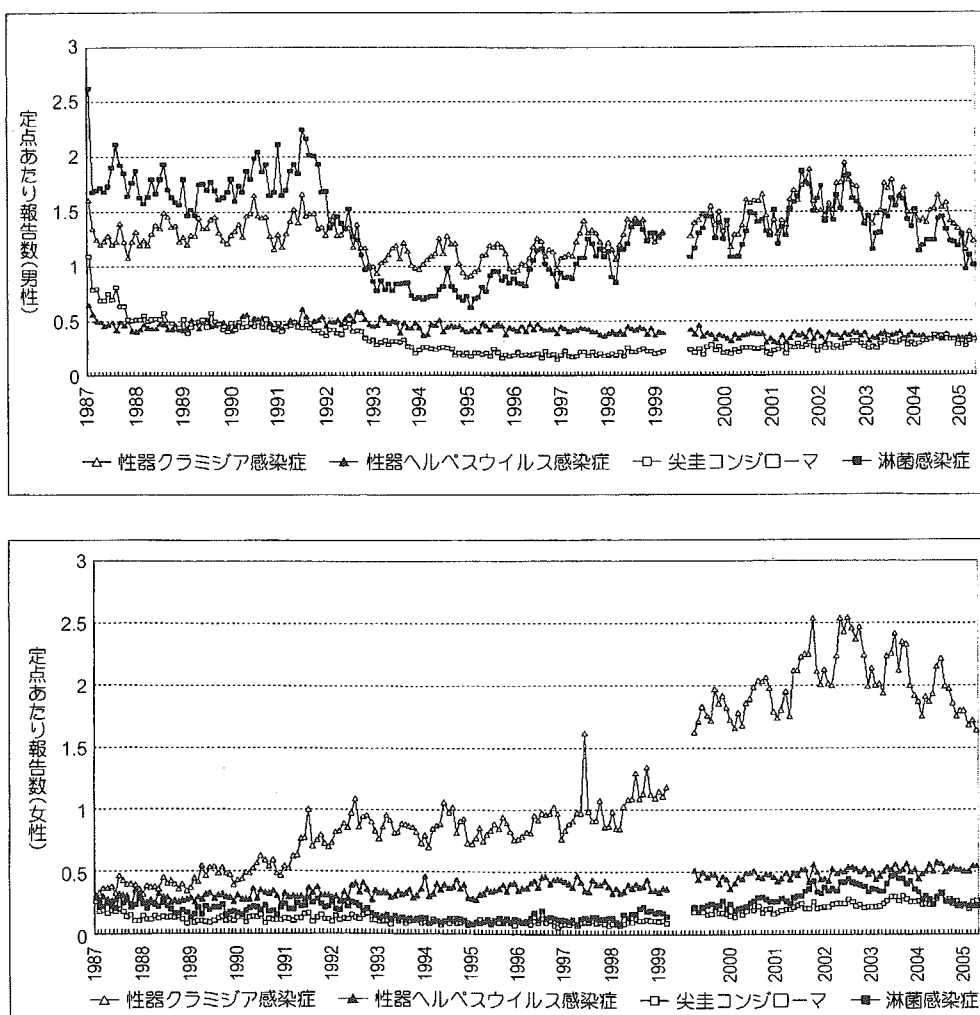


図1 感染症発生動向調査による性感染症の年次推移

性器クラミジア、性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、淋菌感染症の定点あたり報告数の年次推移を男女別に示した。1999年3月～4月間のギャップは、感染症サーベイランス事業から感染症法へ移行した際に定点構成が変化したことを示している。

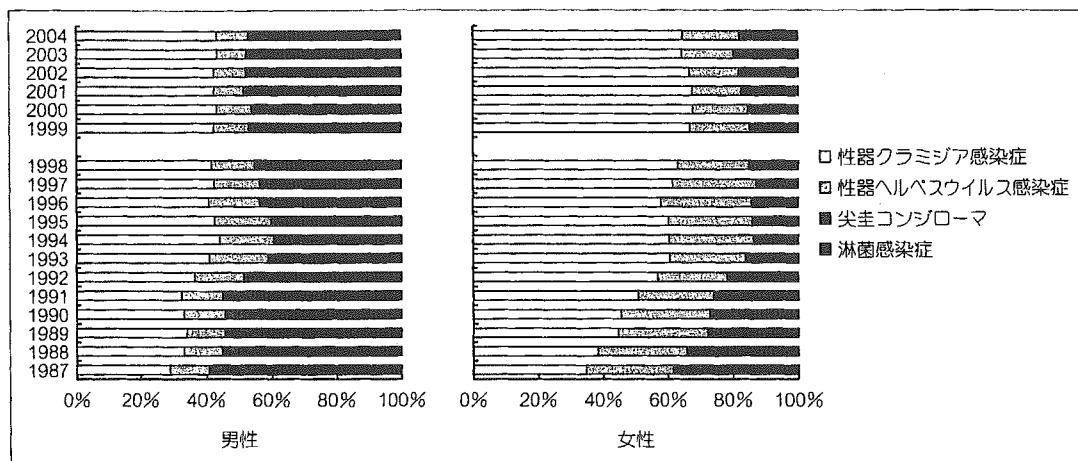


図2 感染症発生動向調査による年次別性感染症の比率

疾患の割合を男女別に示した。現在では、男性ではクラミジアと淋菌感染症がほぼ等しく、それぞれ定点把握STD全体の4割を占めている。女性ではクラミジアが約6割を占める。2004年の特徴としては、男女ともに淋菌感染症の割合の低下が見られている。

響によるもので、他のSTDも減少し、特に男性で淋菌感染症が激減した。しかし、エイズに対する不安や関心が薄れるとともに1996年からは再び増加に転じていた。2002年までは男女共に性器クラミジアと淋菌感染症の増加が主なトレンドであったが、その後、減少傾向を示している点が注目される。この2疾患は、夏に多く冬に少ない季節変動が顕著に見られる。

疾患の割合：疾患の割合を男女別に見た場合（図2）、現在では男性ではクラミジアと淋菌感染症がほぼ等しく、それぞれ定点把握STD全体の4割を占めている。女性ではクラミジアが約6割を占める。2004年の特徴としては、男女ともに淋菌感染症の割合の低下が見られている。

年齢構成：各疾患について、感染症法施行後の年齢別報告数の経時変化を男女別に示した（図3）。全体に男性では20代、30代が中心であるが、女性の報告数はより若年齢層にシフトしているのが特徴である。性器ヘルペスは感染すると生涯にわたって潜伏、再発を繰り返すため、常時、高年齢層からの報告が少なくない。2004年はクラミジア、淋菌感染症において、それまで増加してきていた若年齢層での減少が目立った。一方、尖圭コンジローマが30代以降の年齢において、顕著な増加を見せている。

男女比：各疾患について、男女比の経時変化を図4に示した。1999年に女性の比率が突然高くなったのは、STD定点の構成の変更による人為的な理由が考えられる。すなわち、感染症法の施行にあたりSTD定点となる医療機関を再選定した際、意図的に産婦人科系を増やした結果、女性報告数が増えたためである（STD診療機関は施設ごとに患者数や男女比が大きく異なる。定点構成によって疾患の男女比等が左右される事実は、各地域に存在するSTD診療機関の中からどのような基準で定点機関を選定すれば、地域を等しく代表し、また各疾患の疫学像を正しく反映する動向調査が可能になるのか、発生動向調査の実施の上で難しい問題が内在することを示唆している）。ここで得られる男女比の数値は概況として見るにとどめるが、1999年以降、一貫して女性の比率が高くなってきていたのが、2004年は、クラミジア、尖圭コンジローマ、淋菌感染症において、女性の比率の低下が見られた。

#### IV 全数把握STDの最近の動向

梅毒：1999年3月まで、梅毒は性病予防法に基づいて全数報告がなされていたが、同年4月から性病予防法は廃止、代わって施行された感染症法によって、引き続き全数把握対象疾病に指定され

特集 性感染症

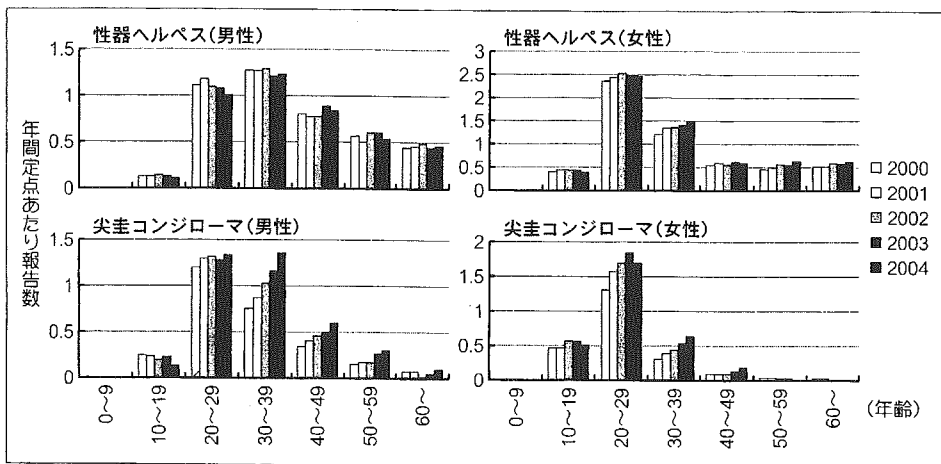
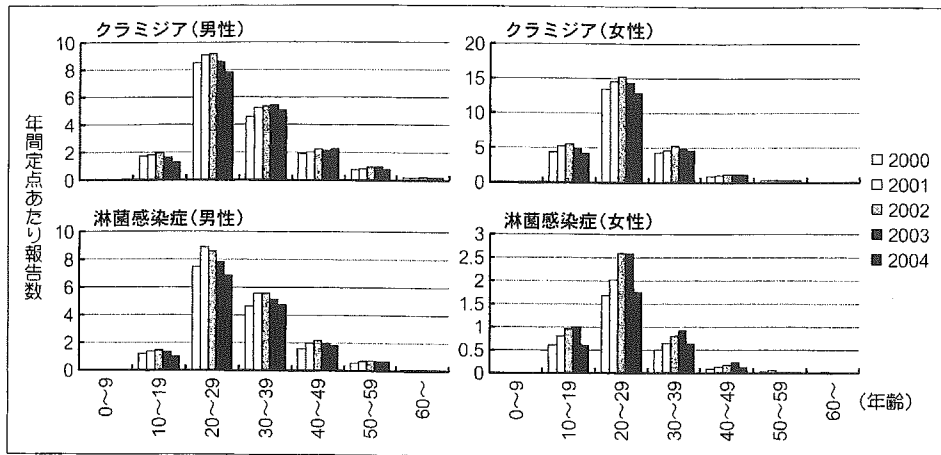


図3 感染症発生動向調査による各性感染症の年次別、年齢別患者報告数

各疾患について、感染症法施行後の年齢別報告数の経時変化を男女別に示した。全体に男性では20代、30代が中心であるが、女性の報告数はより若年齢層にシフトしているのが特徴である。2004年はクラミジア、淋菌感染症において、それまで増加してきていた若年齢層での減少が目立った。

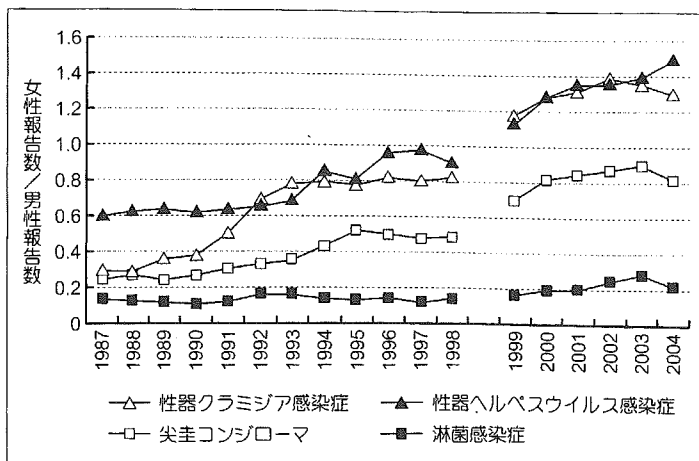


図4 感染症発生動向調査による各性感染症の男女比の年次推移

各疾患について、男女比の経時変化を示した。ここで得られる男女比の数値は概況として見るにとどめるが、1999年以降、一貫して女性の比率が高くなってきていたのが、2004年は、クラミジア、尖圭コンジローマ、淋菌感染症において、女性の比率の低下が見られた。

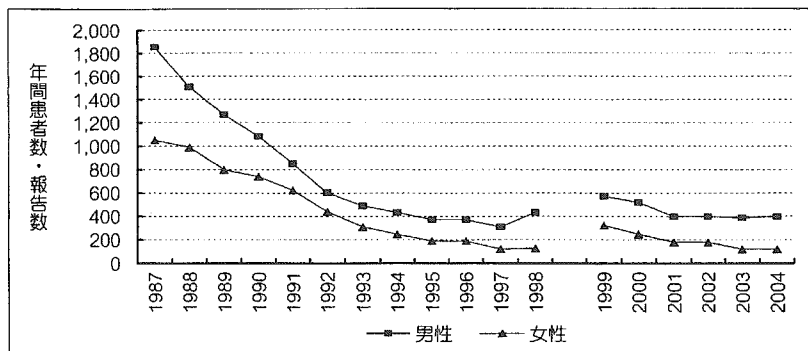


図5 伝染病統計調査感染症発生動向調査による梅毒の患者数・報告数  
性病予防法と感染症法による患者数・報告数の年次推移を示す。男性は横ばい、女性では減少傾向が見られる。

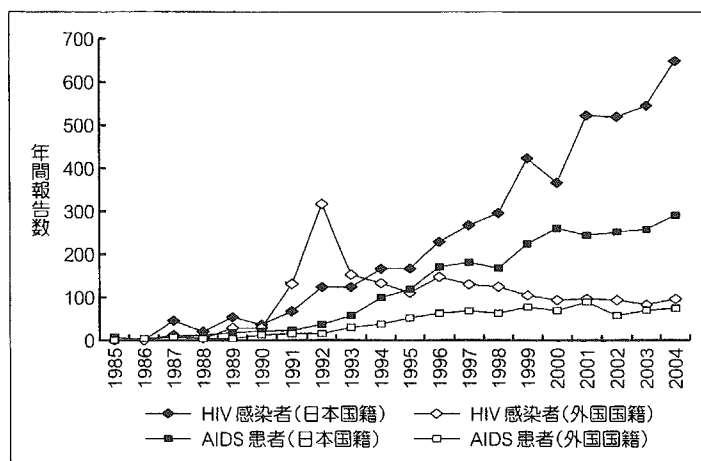


図6 HIV感染者およびAIDS患者報告数の年次推移  
HIV/エイズ報告数は、一貫して増加傾向が続いている。

ている。両法による患者数・報告数の年次推移を  
図5に示す。厚生労働省の「性感染症サーベイ  
ランス研究班」の報告書<sup>2)</sup>によると、1998～2000年  
にかけての梅毒患者数（早期顕症のみ）は年間  
4,000～5,000例と推定され、その数と比較する  
と、現行の発生動向調査での捕捉率は10%程度  
で、信頼できる疫学データが得られているとはい  
えない。しかし、経時的なトレンドを見る限り、  
男性は横ばい、女性では減少傾向が見られる。

HIV/エイズ:HIV/エイズ発生動向に関しては、  
3カ月ごとにエイズ動向委員会が詳細な解析を  
行っており、病原微生物検出情報や、上述したエ  
イズ予防情報センターのウェブサイトで公開され

ているので参照していただきたい ([http://www.  
acc.go.jp/mlhw/mlhw\\_frame.htm](http://www.acc.go.jp/mlhw/mlhw_frame.htm), および[http:  
//api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou\\_Frame.htm](http://api-net.jfap.or.jp/siryou/siryou_Frame.htm))。HIV/エイズ報告数は、一貫して増加傾向が続い  
ているが(図6)、特に1999年から日本国籍男性  
の同性間の性的接触によるHIV感染が著しく増  
えている(図7)。エイズ患者数の年次推移におい  
ても、異性間の性的接触によるものは2000年で  
頭打ちになっているが、男性の同性間の性的接触  
によるものは急増している(図8)。

## V おわりに

発生動向調査から見たわが国のSTDの最近の

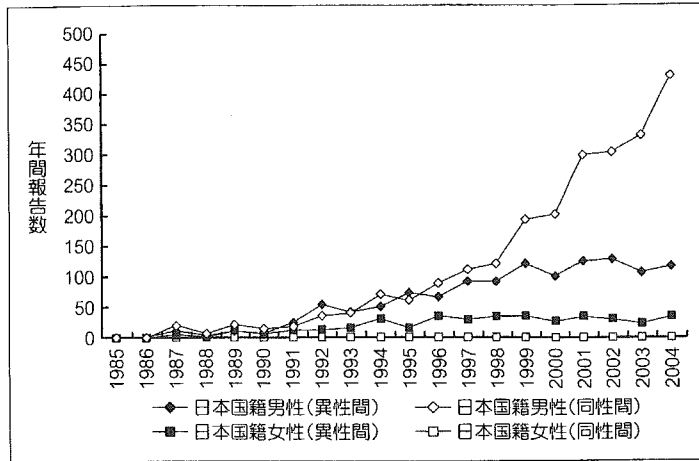


図7 日本国籍 HIV 感染者の感染経路別年次推移

1999年からは、日本国籍男性の同性間の性的接触による HIV 感染が著しく増えている。

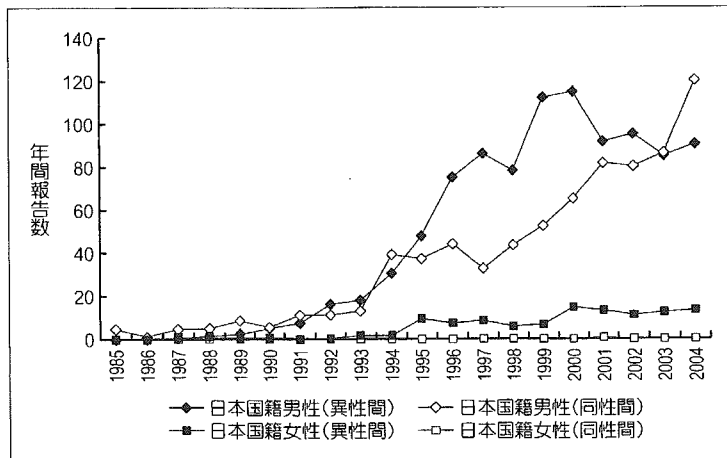


図8 日本国籍 AIDS 患者の感染経路別年次推移

エイズ患者数の年次推移においても、異性間の性的接触によるものは2000年で頭打ちになっているが、男性の同性間の性的接触によるものは急増している。

動向をまとめた。STDは、エイズショックから回復した1996年頃からは一貫して増加していたが、2003年以降、性器クラミジア感染症、淋菌感染症の減少が見られており、2004年もその傾向が続いた。この減少傾向は、特に女性において、また、若年齢層において強く、若年齢の女性における淋菌感染症の減少が最も顕著であった。性比を見ても、この2疾患では女性の割合が低下している。一方、性器ヘルペスは横ばいから微増、尖圭コン

ジローマは増えているようである。梅毒報告数は報告漏れがきわめて多いため、絶対数としては論じられないが、傾向としては横ばい、女性ではやや減少傾向が見られる。HIV/エイズは、日本人女性および日本人男性異性愛者では横ばいが続いているにも関わらず、日本人男性同性愛者では驚くべき急増が見られる。

本調査結果が、1990年代後半からわが国におけるSTD増加の主要因となってきた、若年齢、特

に女性での感染増加に歯止めがかかった事実を示唆するものであったら、望ましい状況ではあるが、そう判断するには早計であろう。誤った解析結果を導く交絡因子の検討、例えば、医療機関を受診しない“隠れた”STD患者が増加している可能性はないか、STD発生動向調査の報告システム自体に不備や変化がないか、STDの現状を示す他の疫学調査レポートと矛盾はないか等、様々な角度から検証を加える必要がある。具体的には、上述の厚生労働省の「性感染症サーベイランス研究班」報告<sup>2)</sup>では、1998年から2000年9道府県においてSTDの全数調査を行っているが、本発生動向調査のデータと比較すると、全体的に女性報告数がより多く、本発生動向調査では、特に女性におけるSTDの広がりや十分把握できていない可能性が示唆されている。また、そもそも、現行の定点把握STD発生動向調査においては、定点の選定に際して均質性・代表性が確保されていない事実も明らかになっている<sup>3)</sup>。全数報告が義務づけられている梅毒ですら、多数の報告漏れが存在するのが実情である。また、HIV感染に関しては、男性同性愛者間で激増しており、この群では、HIVのみならず他のSTDも増加していることが容易

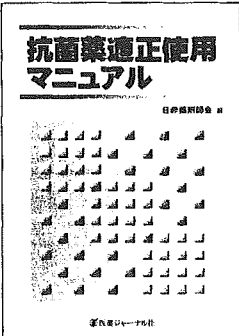
1. わが国における性感染症の現状

に想像できる。

感染症法に基づいた発生動向調査は、施行後5年ごとに見直し作業が行われる予定になっている。平成12年2月に告示された「性感染症に関する特定感染症予防指針」の趣旨の通り、STD蔓延の防止という目的のもとに、わが国にふさわしいSTD発生動向調査の実施方法について、今後とも多方面での検討が必要であろう。

文 献

- 1) 橋戸 円, 岡部信彦: 発生動向調査からみた性感染症の最近の動向. 性感染症学雑誌 15 Suppl:60-68, 2004
- 2) 熊本悦明, 塚本泰司, 利部輝雄ほか: 「日本における性感染症 (STD) 流行の実態調査— 2000年度のSTD・センチネル・サーベイランス報告—」性感染症学雑誌 13:147-167, 2002
- 3) 橋戸 円, 小坂 健, 谷口清洲ほか: (新興・再興感染症研究事業)「効果的な感染症発生動向調査のための国および県の発生動向調査の方法論の開発に関する研究 (主任研究者: 岡部信彦) — STDサーベイランスの定点の解析」平成14年度報告書



**抗菌薬適正使用  
マニュアル**

日本薬剤師会 編

医薬ジャーナル社

# 抗菌薬適正使用マニュアル

日赤薬剤師会 編


B5判 204頁 定価 3,675円(本体 3,500円+税5%)送料実費

ISBN4-7532-1827-9 C3047

◎抗菌薬適正使用のために必要な情報を、総論・各論に分けて網羅！

◎抗菌薬の有効菌種表、略号一覧などの付録も充実。

◎臨床現場で必ず役立つ実用的な一冊！


**株式会社 医薬ジャーナル社** 〒541-0047 大阪市中央区淡路町3丁目1番5号・淡路町ビル21 電話 06(6202)7280(代) FAX 06(6202)5295 (振替番号) 00910-1-33353  
 〒101-0061 東京都千代田区三崎町3丁目3番1号・TKビル 電話 03(3265)7681(代) FAX 03(3265)8369

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

Yoshihiko Enomoto,<sup>1</sup> Tetsushi Yoshikawa,<sup>1\*</sup> Masaru Ihira,<sup>2</sup> Shiho Akimoto,<sup>1</sup>  
Fumi Miyake,<sup>1</sup> Chie Usui,<sup>1</sup> Sadao Suga,<sup>1</sup> Kayoko Suzuki,<sup>3</sup>  
Takashi Kawana,<sup>4</sup> Yukihiro Nishiyama,<sup>5</sup>  
and Yoshizo Asano<sup>1</sup>

*Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine,<sup>1</sup> and Department of Medical Information Technology, Fujita Health University College,<sup>2</sup> Toyoake, and Department of Dermatology, Central Hospital of Tokai Medical Institute, Tokai,<sup>3</sup> and Department of Virology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya,<sup>5</sup> Aichi, and Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital, Mizonokuchi, Teikyo University School of Medicine, Kawasaki, Kanagawa,<sup>4</sup> 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: 8 1-562-939251. Fax: 8 1-562-95-2216. E-mail: tetsushi@fujita-hu.ac.jp.

TABLE 1. Primers targeting the HSV-1 and HSV-2 gG genes<sup>a</sup>

Virus	Locations of target sequences <sup>b</sup>	Name of primer	Sequence of primer <sup>c</sup>
HSV-1	136741 ATCATGTCGACGGGGCCATGCGTGGCGTGGTTGCCATTATCCGATTCCTTGTGGTCTT	HS1F3	5'-GCCGTTGTCCCAATTATCC-3' (F3)
	136801 GTGGGT GTATCGGGTTCCACCAG CDTCTCTCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACC	HS1B3	5'-TACTTGGCATGGGGTG-3' (B3c)
	136861 ACCGGTGTGGTTGCCTTCCAGTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG	HS1F1P	5'-GTTGGGTGGAGGAGACGCTCCITTTGGTTCCTTGTCGGT-3' (F1c-F2)
		HS1B1P	5'-GGTCGCTCCCTCCGATGAAGCGGGTGTAAGGCTGATG-3' (B1-B2c)
		HS1LPF	5'-TTGGTGGGAACCCCGATAC-3' (LPFc)
		HS1LPB	5'-AAACATGACCCAGACCCGGCAC-3' (LPB)
		HS2F3	5'-GGCCTTGACCCGGAGACAC-3' (F3)
		HS2B3	5'-CGACTCCACGGATGCAGT-3' (B3c)
		HS2F1P	5'-TCGACTGAGGTTGCCATGGCATGGCTCTCCGATTCCGCTACG-3' (F1c-F2)
		HS2B1P	5'-GCACAACACTACTCCCCCGACCCGTTTCTCCGGGCTAA-3' (B1-B2c)
	HS2LPF	5'-GCCGACACAGGGAGGGCGT-3' (LPFc)	
	HS2LPB	5'-GATGGCCACACAAGCCGCAA-3' (LPB)	
HSV-2	13991 CGCCTCATGCGCTTGACGAGGAGAC GTCTCTGATTCGCTAGCTTCCTCCGAGAG	HS1F3	5'-GCCGTTGTCCCAATTATCC-3' (F3)
	139861 ACCGCTTCTGTTGTTGGCGTCCGACCGGCGTGTCCATGGCTTCCTCCGATTCCGCTACG-3'	HS1B3	5'-TACTTGGCATGGGGTG-3' (B3c)
	139921 ACCGCTTCTGTTGTTGGCGTCCGACCGGCGTGTCCATGGCTTCCTCCGATTCCGCTACG-3'	HS2F1P	5'-TCGACTGAGGTTGCCATGGCATGGCTTCCTCCGATTCCGCTACG-3' (F1c-F2)
		HS2B1P	5'-GCACAACACTACTCCCCCGACCCGTTTCTCCGGGCTAA-3' (B1-B2c)
		HS2LPF	5'-GCCGACACAGGGAGGGCGT-3' (LPFc)
		HS2LPB	5'-GATGGCCACACAAGCCGCAA-3' (LPB)
		HS1LPF	5'-TTGGTGGGAACCCCGATAC-3' (LPFc)
		HS1LPB	5'-AAACATGACCCAGACCCGGCAC-3' (LPB)
		HS2LPF	5'-GCCGACACAGGGAGGGCGT-3' (LPFc)
		HS2LPB	5'-GATGGCCACACAAGCCGCAA-3' (LPB)

<sup>a</sup> 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.  
<sup>b</sup> 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).  
<sup>c</sup> 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



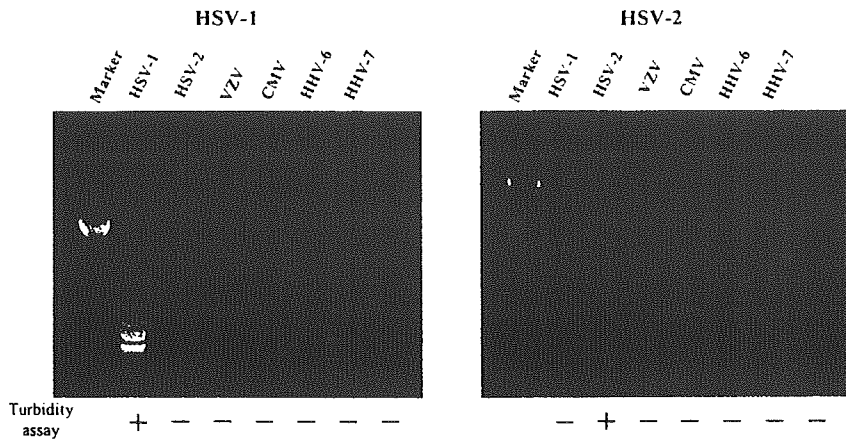


FIG. 1. DNA extracted from HSV-1 (KOS)-, HSV-2 (186)-, VZV (Oka)-, HCMV (AD-169)-, HHV-6 B (Z29)-, and HHV-7 (RK)-infected cells was amplified by using HSV-1- and HSV-2-specific LAMP to determine method specificity. The detection of LAMP products was assessed by agarose gel electrophoresis and turbidity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

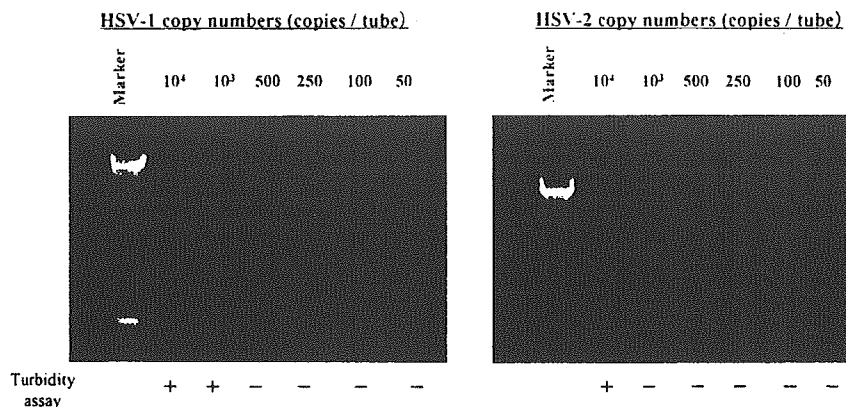


FIG. 2. To determine the respective sensitivities of each assay, serial dilutions of pGEMHS1 and pGEMHS2 plasmid DNAs were amplified by the HSV-1- and HSV-2-specific LAMP, respectively. The detection of LAMP products was assessed by agarose gel electrophoresis and turbidity assay using an LA-200. Marker, 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 <sup>a</sup>					HSV-2 <sup>a</sup>				
	Real-time PCR (copies/tube)	LAMP (DNA extraction) result		LAMP (direct <sup>b</sup> ) result		Real-time PCR (copies/tube)	LAMP (DNA extraction) result		LAMP (direct <sup>b</sup> ) 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	+	+	-	-

<sup>a</sup> +, positive; -, negative.<sup>b</sup> 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. Berbari, 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,<sup>1</sup> Tetsushi Yoshikawa,<sup>1\*</sup> Masaru Ihira,<sup>2</sup> Yoshihiko Enomoto,<sup>1</sup> Takashi Kawana,<sup>3</sup> and Yoshizo Asano<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan

<sup>2</sup>Department of Medical Information Technology, Fujita Health University College, Toyoake, Aichi, Japan

<sup>3</sup>Department 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)