

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; Ndjoiy-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

TABLE I. Results of Virus Isolation, LAMP, and Real-Time PCR

| Virus | Site of sampling | Virus isolation | No. of positive/no. of tested (%) | | |
|-------|------------------|-----------------|-----------------------------------|------------|---------------|
| | | | LAMP | | Real-time PCR |
| | | | 30 min | 60 min | |
| HSV-1 | Cervix | 2/25 (8) | 1/25 (4) | 2/25 (8) | 4/25 (16) |
| | Vulva | 8/25 (32) | 8/25 (32) | 8/25 (32) | 8/25 (32) |
| HSV-2 | Cervix | 0/25 (0) | 0/25 (0) | 2/25 (0) | 6/25 (24) |
| | Vulva | 12/25 (48) | 11/25 (44) | 12/25 (48) | 12/25 (48) |

LAMP, loop-mediated isothermal amplification.

HSV-2. Eight HSV-1 isolates were recovered from vulvae with ulcerative lesions, and the remaining two isolates were recovered from cervixes without remarkable lesions. HSV-1 was concurrently isolated from the vulvae in the two patients shedding virus into the cervix. Thus, 8 of 25 (32%) patients shed HSV-1 in genital lesions. Meanwhile, all 12 HSV-2 isolates were recovered from the vulva. Twelve of 25 (48%) patients shed HSV-2 in genital lesions. Neither HSV-1 nor HSV-2 was isolated from 5 of the 25 (20%) patients.

The original HSV type-specific LAMP (30 min reaction) was compared with virus isolation and HSV type-specific real-time PCR (Table II). Corresponding viral DNA was detected by LAMP in 9 of 10 (90%) HSV-1 isolated samples and 11 of 12 (92%) HSV-2 isolated samples. No viral DNA was detected in samples without virus isolation. Thus, if virus isolation was used as the standard method, sensitivity (HSV-1; 90%, HSV-2; 92%) and specificity (HSV-1; 100%, HSV-2; 100%) were high. Meanwhile, in a comparison of LAMP and real-time PCR, corresponding viral DNA was detected by LAMP in 9 of 12 (75%) HSV-1 DNA positive samples and 11 of 18 (61%) HSV-2 DNA positive samples. Again, no viral DNA was detected in samples that were negative by real-time PCR. Therefore, with real-time PCR as the standard method, the specificity (HSV-1; 100%, HSV-2; 100%), positive predictive value (HSV-1; 100%, HSV-2; 100%), and negative predictive values (HSV-1; 93%, HSV-2; 82%) were high, but sensitivity of the LAMP method (in particular, to HSV-2; 61%) was low.

Because the sensitivity of this original HSV type-specific LAMP seemed low, the LAMP reaction period

was extended to 60 min. This modified HSV type-specific LAMP (60 min reaction) was then compared with virus isolation and HSV type-specific real-time PCR (Table III). The modified LAMP protocol resulted in an additional one and three samples testing positive for HSV-1 LAMP and HSV-2 LAMP, respectively, as compared with the original LAMP protocol. Thus, HSV-1 DNA was detected in one sample without virus isolation and HSV-2 DNA was detected in two samples without virus isolation by the modified LAMP method. If virus isolation is used as the standard method, then as the number of false-positive samples increased, the positive predictive value decreased slightly (HSV-1; 90%, HSV-2; 86%) in comparison to the original LAMP method. Furthermore, in comparing LAMP and real-time PCR, one HSV-1 DNA negative sample and three HSV-2 DNA negative samples became positive for the corresponding viral DNA by the modified LAMP method. Therefore, sensitivity of the modified LAMP method increased to about 80% (HSV-1; 83%, HSV-2; 78%).

DISCUSSION

In the present study, the reliability of an HSV type-specific LAMP assay developed recently in our institute was evaluated for detection of genital HSV infection in comparison to virus isolation and a previously established real-time PCR assay. To assess precise reliability, virus isolation and amplification of viral DNA by either LAMP or real-time PCR were carried out in different laboratories without sharing information. In patients with genital HSV infection, it has been suggested that

TABLE II. Comparison of 30 Min LAMP Reaction (Original HSV Type-Specific LAMP) to Virus Isolation and Real-Time PCR

| Standard method | Virus | Results of LAMP | No. of samples with a standard method | | Total no. of specimens | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|-----------------|-------|-----------------|---------------------------------------|----------|------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| | | | Positive | Negative | | | | | |
| Virus isolation | HSV-1 | Positive | 9 | 0 | 9 | 90 | 100 | 100 | 98 |
| | | Negative | 1 | 40 | 41 | | | | |
| | HSV-2 | Positive | 11 | 0 | 11 | 92 | 100 | 100 | 97 |
| | | Negative | 1 | 38 | 39 | | | | |
| Real-time PCR | HSV-1 | Positive | 9 | 0 | 9 | 75 | 100 | 100 | 93 |
| | | Negative | 3 | 38 | 41 | | | | |
| | HSV-2 | Positive | 11 | 0 | 11 | 61 | 100 | 100 | 82 |
| | | Negative | 7 | 32 | 39 | | | | |

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

TABLE III. Comparison of 60 Min LAMP Reaction (Modified HSV Type-Specific Lamp) to Virus Isolation and Real-Time PCR

| Standard method | Virus | Results of LAMP | No. of samples with a standard method | | Total no. of specimens | Sensitivity (%) | Specificity (%) | PPV (%) | NPV (%) |
|-----------------|-------|-----------------|---------------------------------------|----------|------------------------|-----------------|-----------------|---------|---------|
| | | | Positive | Negative | | | | | |
| Virus isolation | HSV-1 | Positive | 9 | 1 | 10 | 90 | 98 | 90 | 98 |
| | | Negative | 1 | 39 | 40 | | | | |
| | HSV-2 | Positive | 12 | 2 | 14 | 100 | 95 | 86 | 100 |
| | | Negative | 0 | 36 | 36 | | | | |
| Real-time PCR | HSV-1 | Positive | 10 | 0 | 10 | 83 | 100 | 100 | 95 |
| | | Negative | 2 | 38 | 40 | | | | |
| | HSV-2 | Positive | 14 | 0 | 14 | 78 | 100 | 100 | 89 |
| | | Negative | 4 | 32 | 36 | | | | |

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

HSV is excreted not only in the vulva by ulcerative lesions, but also in the cervix without remarkable lesions [Kawana et al., 1982]. As we expected, a small number of samples collected from cervixes without remarkable lesions contained infectious virus particles or viral DNA.

As suggested in previous studies [Espy et al., 2000; van Doornum et al., 2003; Wald et al., 2003; Schmutzhard et al., 2004], the sensitivity of real-time PCR was clearly higher than that of virus isolation for the detection of HSV infection. Meanwhile, the sensitivity of the original HSV type-specific LAMP protocol appears low, as its sensitivity is nearly the same as virus isolation (Table II). It has been suggested that, during LAMP, turbidity gradually increases due to the rising numbers of amplified product [Mori et al., 2002]. Therefore, an increase in the LAMP reaction period may result in improved sensitivity. As expected, extending the LAMP reaction to 60 min (modified HSV type-specific LAMP) improved the sensitivity of detection of virus infection (Table III). Finally, the sensitivity of the modified HSV type-specific LAMP was higher than that of virus isolation and slightly lower than that of real-time PCR. In particular, the sensitivity of HSV-2 LAMP was low in comparison to HSV-2 real-time PCR. A further increase in the reaction period is not practical for rapid detection of viral infection. As reported previously [Enomoto et al., in press], the sensitivity of the original HSV-2 LAMP method was lower than that of HSV-1 LAMP. Therefore, modification of primer design might be necessary to improve its sensitivity in future analyses.

As effective antiviral treatments have drastically improved the prognosis of patients with severe HSV-associated diseases, early diagnosis and administration of antiviral drugs are critical for patient's management. Antigenic detection by immunofluorescence of swab specimens and PCR-based detection of viral DNA in clinical samples are currently the most popular methods for rapid diagnosis of HSV infection. Although antigenic detection of HSV can be carried out in hospital laboratories, this method's sensitivity is not sufficient for the detection of active viral infections. Meanwhile, real-time PCR is highly sensitive and sufficient for the

diagnosis of viral infections, but has not become routine in most hospital laboratories due to expensive equipment requirements. Therefore, samples must be sent out to commercial laboratories for real-time PCR analysis, and in Japan, it takes 2–4 days to obtain final results. Although modified HSV type-specific LAMP is less sensitive than real-time PCR, it could be carried out in hospital laboratories because of its lower cost. This method is also faster than real-time PCR and has a similarly low contamination risk due to the closed system of the turbidity assay. Moreover, it has been suggested that direct amplification of viral DNA could be accomplished by the LAMP method from samples without DNA extraction [Okamoto et al., 2004]. The modified HSV type-specific LAMP, in combination with direct amplification from swab samples immersed in sterilized water, would therefore greatly increase throughput, an important factor for clinical laboratory use. However, as direct amplification slightly decreases the sensitivity of the LAMP method, large numbers of prospective analyses using samples in sterilized water should be carried out to confirm its effectiveness in the detection of genital HSV infection.

In summary, the reliability of an HSV type-specific LAMP protocol was compared with virus isolation and real-time PCR. Although the sensitivity of the original HSV type-specific LAMP method was low for the detection of viral infection, the sensitivity of a modified 60 min HSV type-specific LAMP reaction was significantly higher than that of virus isolation, albeit slightly lower than that of real-time PCR. Although this study presents only preliminary results, the study suggests that the modified HSV type-specific LAMP may be a valuable tool for a rapid diagnosis of genital HSV infections.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Eiken Chemical for their contributions to this study.

REFERENCES

- Aldea C, Alvarez CP, Folgueira L, Delgado R, Otero JR. 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, Yoshikawa T, Kimura H, Enomoto Y, Ohashi M, Terasaki H, Nishiyama Y. 2004. Monitoring of herpesviruses DNA in three cases of acute retinal necrosis by real-time PCR. *J Clin Virol* 29:206–209.
- Cone RW, Hobson AC, Palmer J, Remington M, Corey L. 1991. Extended duration of herpes simplex virus DNA in genital lesions detected by the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 164:757–760.
- Cone RW, Hobson AC, Brown Z, Ashley R, Berry S, Winter C, Corey L. 1994. Frequent detection of genital herpes simplex virus DNA by polymerase chain reaction among pregnant women. *JAMA* 272:792–796.
- 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 loop-mediated isothermal amplification method. *J Clin Microbiol* (in press).
- Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. 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 MJ, Wold AD, Jespersen DJ, Jones MF, Smith TF. 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 MJ, Uhl JR, Mitchell PS, Thorvilson JN, Svien KA, Wold AD, Smith TF. 2000. Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by Light Cycler PCR. *J Clin Microbiol* 38:795–799.
- Ihira M, Yoshikawa T, Enomoto Y, Akimoto S, Ohashi M, Suga S, Nishimura N, Ozaki T, Nishiyama Y, Notomi T, Ohta Y, Asano Y. 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, Sonobe T, Hayashi K. 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.
- Kawana T, Kawagoe K, Takizawa K, Chen JT, Kawaguchi T, Sakamoto S. 1982. Clinical and virologic studies on female genital herpes. *Obstet Gynecol* 60:456–461.
- Kessler HH, Muhlbauer G, Rinner B, Stelzl E, Berger A, Dorr HW, Santner B, Marth E, Rabenau H. 2000. Detection of herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 38:2638–2642.
- Kimberlin DW, Lakeman FD, Arvin AM, Prober CG, Corey L, Powell DA, Burchett SK, Jacobs RF, Starr SE, Whitley RJ. 1996. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 174:1162–1167.
- Kuboki N, Inoue N, Sakurai T, Di Cello F, Grab DJ, Suzuki H, Sugimoto C, Igarashi I. 2003. Loop-mediated isothermal amplification for detection of African trypanosomes. *J Clin Microbiol* 41:5517–5524.
- Lakeman FD, Whitley RJ. 1995. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: Application of polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral Study Group. *J Infect Dis* 171:857–863.
- Mitchell PS, Espy MJ, Smith TF, Toal DR, Rys PN, Berbari EF, Osmon DR, Persing DH. 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, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. 2002. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun* 289:150–154.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes* 16:223–229.
- Ndjoyi-Mbiguino A, Ozouaki F, Legoff J, Mbopi-Keou FX, Si-Mohamed A, Onas IN, Avoune E, Belec L. 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, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 28:e63.
- Okamoto S, Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Shimokata K, Nishiyama Y, Asano Y. 2004. Rapid detection of varicella-zoster virus infection by loop-mediated isothermal amplification method. *J Med Virol* 74:677–682.
- Parida M, Posadas G, Inoue S, Hasebe F, Morita K. 2004. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J Clin Microbiol* 42:257–263.
- Pevenstein SR, Williams RK, McChesney D, Mont EK, Smialek JE, Straus SE. 1999. Quantitation of latent varicella-zoster virus and herpes simplex virus genomes in human trigeminal ganglia. *J Virol* 73:10514–10518.
- Ryncarz AJ, Goddard J, Wald A, Huang ML, Roizman B, Corey L. 1999. Development of a high-throughput quantitative assay for detecting herpes simplex virus DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol* 37:1941–1947.
- Schmutzhard J, Merete Riedel H, Zwegyberg Wirgart B, Grillner L. 2004. Detection of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2 and varicella-zoster virus in skin lesions. Comparison of real-time PCR, nested PCR and virus isolation. *J Clin Virol* 29:120–126.
- van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. 2003. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. *J Clin Microbiol* 41:576–580.
- Wald A, Huang ML, Carrell D, Selke S, Corey L. 2003. Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces: Comparison with HSV isolation in cell culture. *J Infect Dis* 188:1345–1351.
- Yoshikawa T, Ihira M, Akimoto S, Usui C, Miyake F, Suga S, Enomoto Y, Suzuki R, Nishiyama Y, Asano Y. 2004. Rapid diagnosis of human herpesvirus 7 infection by a novel DNA amplification method—Loop mediated isothermal amplification. *J Clin Microbiol* 42:1348–1352.

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

西澤美香、川名 尚、村田照夫、西井 修

日本性感染症学会誌
Vol.16, No.1

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

Studies on Type-Specific Serodiagnosis of Women with Primary Genital Herpes Simplex Virus Type 1 or Type 2 Infection

西澤美香 川名 尚 村田照夫
Mika NISHIZAWA Takashi KAWANA Teruo MURATA
西井 修
Osamu NISHII

女性性器ヘルペスの初感染例について、単純ヘルペスウイルス (HSV) の表面にある glycoprotein G 抗原 (gG-1、gG-2) を用いた抗体測定 ELISA を用いて、型特異的血清診断の可能性を検討した。同時に従来から用いられている HSV 抗原を用いた非特異的 HSV 抗体の検出を行い比較した。HSV-1 による初感染例では、gG-1 抗体が陽転したものは、第 3 週目 41.2%、第 4~5 週目 42.1%であった。HSV 抗体は第 2 週目で 100%陽性を示した。HSV-2 による初感染例では、gG-2 抗体が陽転したものは、第 3 週目 83.3%、第 4~5 週目 100%であった。HSV 抗体は第 4~5 週目で 90.9%陽性となった。gG 抗原を用いた型特異的診断は HSV-2 感染例でほぼ全例可能であったが HSV-1 感染例では 50%程度であった。

Type specific serodiagnosis of patients with primary genital herpes simplex virus infection was performed by ELISA kit using glycoprotein G (gG-1 or gG-2) as antigen. In patients with primary genital HSV-1 infection antibodies to gG-1 were detected in 41.2% at 3 weeks and 42.1% at 4-5 weeks respectively after the onset of the disease respectively. The antibody for whole HSV-1 lysate was positive in all cases at 2 weeks. In patients with primary genital HSV-2 infection antibodies to gG-2 were detected in 83.3% at 3 weeks and 100% at 4-5 weeks after the onset of the disease. The antibody for whole HSV-1 lysate was detected in 90.9% at 4-5 weeks. Type-specific serodiagnosis using gG antigen was possible for almost all cases of HSV-2 infection but in half for HSV-1 infection.

Key words : Type-specific serodiagnosis, Primary genital herpes, Herpes simplex virus type 1 and type 2, ELISA, Antibody to gG

緒言

性器ヘルペスは本邦の性感染症の中で第三位に位置する重要な疾患である。本症は単純ヘルペスウイルス (HSV) 1 型 (HSV-1) あるいは 2 型 (HSV-2) によって発症するウイルス疾患である。その実験室診断には病原診断と血清診断が行われるが、今回血清診断の可能性について検討した。この際 HSV-2 感染例は HSV-1 感

染例に比べ再発の頻度が高く¹⁾、また向神経性が強いので感染している HSV の型を決めることは、予後の判定など臨床的に有意義である。今回型特異的な glycoprotein G (gG)-1 及び gG-2 を抗原とした、現在世界的に最も精度の高いとされている ELISA 法を用いた血清診断キットである HerpeSelect を用いて²⁾、初感染例について型特異的診断の可能性を、分離された HSV の型と比較しながら検討した。同時に従来から用いられて

帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科 : Department of Obstetrics & Gynecology, Mizonokuchi Hospital, Teikyo University
平成17年3月25日受付、平成17年4月28日掲載決定
(〒213-8507) 神奈川県川崎市高津区溝口3-8-3 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科 西澤美香

いる HSV 感染細胞を抗原とした非特異的 HSV 抗体測定 ELISA 法についても比較検討した。

対象と方法

1. 対象

1996 年～2004 年の間に東大分院及び帝京大溝口病院産婦人科を訪れ、HSV の分離により女性性器ヘルペスと診断され、発症時に抗体が陰性であった初感染 33 例を対象とした。これらの症例のうち 30 例にはアシクロビル 200mg 1 日 5 回を用い、3 例にはバラシクロビル 500mg 1 日 2 回を用い、5～10 日間の治療を行った。

HSV-1 を分離した 21 例は初診時以降 8 週間の間に 2 回から 4 回、平均 2.3 回の来院があり、合計 60 検体を採取した。

HSV-2 を分離した 12 例は初診時以降 8 週間の間に 2 回から 4 回、平均 2.7 回の来院があり、合計 32 検体を採取した。

口頭で患者の同意を得て血清を採取した。

2. ウイルスの分離と型決定

ウイルスの分離は病変部から採取した検体を Vero または R-66 細胞に接種し、37°C 5%CO₂培養器で培養を続け、細胞変性効果が陽性になった所で FITC 標識抗 HSV モノクローナル抗体（デンカ生研社製 ヘルペス 1・2 FA 試薬「生研」または、シバ社製 Micro Trak Herpes）を用いて蛍光染色して同定と型の決定を行った。

3. 血清抗体測定

血清は採取後 -40°C に保存しておいたものを測定時に溶解し使用した。

a) 非特異的 HSV IgG 抗体測定

デンカ生研社製 ヘルペス IgG (II)-EIA「生研」を用いた。これは HSV-1 感染細胞の lysate を抗原として使用している間接法による ELISA 法で、HSV の型に係わらず HSV に対する IgG 抗体が検出できるとされている。測定法は添付文書に従いコントロール用血清（コントロールヘルペス IgG (II)「生研」）の検量線を用いて検

体血清中の抗体値を求めた。抗体値が 4.0 以上の場合を陽性と判定した。

b) 型特異的 IgG 抗体検出

FOCUS 社製 HerpeSelect-1 ELISA IgG (以下 HerpeSelect-1 と略) および FOCUS 社製 HerpeSelect-2 ELISA IgG (以下 HerpeSelect-2 と略) を用いた。HerpeSelect-1 は gG-1 抗原、HerpeSelect-2 は gG-2 抗原がプレートにコートされている間接法による ELISA 法で IgG 抗体をそれぞれ検出する。gG は HSV-1 と HSV-2 での変異がほとんどないため型特異的に抗体の検出が可能と考えられている^{3),4)}。測定法および Cut-off 値の設定は添付文書に従い、検体吸光度を付属の Cut-off 用コントロールの吸光度で割り抗体値を求め、抗体値が 1.10 より大きい場合を陽性と判定した。

4. 陽性率の計算法

初診日を起点とし、第 1 週目、第 2 週目、第 3 週目、第 4 週～5 週目、第 6 週～7 週目、第 8 週目以降の 6 つの期間に分けて各期間の抗体陽性率を計算した。なお、血清の採取は 6 週間全て採取はできなかったため、血清が採取されていない期間の判定は、一度陽性になったら以降も陽性 (Table では + と表示) とし、陰性と陰性の間の期間は陰性 (Table では - と表示) とした。陰性から陽性になるまでの間で採血されていないため判定できない場合 (Table では ? と表示) これらを除いて陽性率を計算した。

結果

1. HSV-1 初感染例における血清抗体の経時的変化 (Table 1, 2)

Table 1 に 21 例の抗体値の経時的変化を非特異的抗体 (HSV)、gG-1 に対する抗体 (gG-1)、gG-2 に対する抗体 (gG-2) にわけて示した。Table 2 にこれらのまとめたものを示した。

a) 非特異的 IgG 抗体

非特異的 IgG 抗体は第 2 週目に 13 例全例が陽性を示した。第 3 週目以降は 8 週以降の 1 例を除き 4 期すべて陽性であった。抗体値は 3.8 から 100.3 まで分布した。抗体値 92.0、100.3 を示した 2 症例は急上昇し

Table 1 IgG antibody against herpes simplex virus over time after primary genital HSV-1 infection

| | patient | antigen | 1W | 2W | 3W | 4~5W | 6~7W | 8W~ |
|----|---------|---------|------|------|-------|------|------|------|
| 1 | 866 | HSV | 3.6 | 9.4 | + | + | + | 8.6 |
| | | gG-1 | 0.04 | 0.87 | - | - | - | 0.64 |
| | | gG-2 | 0.09 | 0.03 | - | - | - | 0.04 |
| 2 | 744 | HSV | 1.9 | ? | ? | 4.5 | ? | 3.8 |
| | | gG-1 | 0.12 | - | - | 0.14 | - | 0.23 |
| | | gG-2 | 0.08 | - | - | 0.07 | - | 0.07 |
| 3 | 764 | HSV | 3.2 | 10.5 | + | + | 8.5 | + |
| | | gG-1 | 0.15 | 0.66 | - | - | 0.47 | ? |
| | | gG-2 | 0.04 | 0.02 | - | - | 0.02 | ? |
| 4 | 724 | HSV | 2.6 | 5.9 | 7.5 | + | 7.5 | + |
| | | gG-1 | 0.04 | 0.17 | 0.91 | - | 0.53 | ? |
| | | gG-2 | 0.17 | 0.12 | 0.14 | - | 0.13 | ? |
| 5 | 861 | HSV | 1.2 | ? | 14.1 | + | 15.8 | + |
| | | gG-1 | 0.09 | - | 0.20 | - | 0.40 | ? |
| | | gG-2 | 0.18 | - | 0.09 | - | 0.11 | ? |
| 6 | 858 | HSV | 0.4 | ? | ? | ? | 6.6 | + |
| | | gG-1 | 0.20 | - | - | - | 0.31 | ? |
| | | gG-2 | 0.07 | - | - | - | 0.03 | ? |
| 7 | 848 | HSV | 1.2 | ? | ? | ? | 9.5 | + |
| | | gG-1 | 0.19 | - | - | - | 0.77 | ? |
| | | gG-2 | 0.09 | - | - | - | 0.04 | ? |
| 8 | 773 | HSV | 1.6 | 9.8 | + | 8.0 | + | + |
| | | gG-1 | 0.07 | 0.22 | - | 0.43 | ? | ? |
| | | gG-2 | 0.08 | 0.08 | - | 0.08 | ? | ? |
| 9 | 726 | HSV | 1.0 | 6.5 | 11.7 | 10.3 | + | + |
| | | gG-1 | 0.19 | 0.17 | 0.36 | 0.92 | ? | ? |
| | | gG-2 | 0.26 | 0.21 | 0.24 | 0.25 | ? | ? |
| 10 | 743 | HSV | 1.0 | ? | 9.8 | + | 7.6 | + |
| | | gG-1 | 0.04 | - | 0.83 | - | 0.74 | ? |
| | | gG-2 | 0.10 | - | 0.08 | - | 0.07 | ? |
| 11 | 888 | HSV | 1.0 | 9.2 | + | + | + | + |
| | | gG-1 | 0.22 | 0.99 | ? | ? | ? | ? |
| | | gG-2 | 0.16 | 0.18 | ? | ? | ? | ? |
| 12 | 844 | HSV | 2.8 | 9.2 | + | + | 15.9 | + |
| | | gG-1 | 0.28 | 0.18 | ? | ? | 2.46 | + |
| | | gG-2 | 0.20 | 0.13 | - | - | 0.16 | ? |
| 13 | 722 | HSV | 1.0 | 4.2 | + | 7.6 | + | + |
| | | gG-1 | 0.08 | 0.46 | ? | 1.31 | + | + |
| | | gG-2 | 0.11 | 0.07 | - | 0.10 | ? | ? |
| 14 | 833 | HSV | 2.0 | ? | ? | 7.8 | 5.5 | + |
| | | gG-1 | 0.73 | ? | ? | 1.73 | 1.13 | + |
| | | gG-2 | 0.11 | - | - | 0.05 | 0.04 | ? |
| 15 | 723 | HSV | 1.3 | 5.2 | 6.7 | 6.2 | + | + |
| | | gG-1 | 0.08 | 0.25 | 1.45 | 0.81 | + | + |
| | | gG-2 | 0.14 | 0.12 | 0.16 | 0.08 | ? | ? |
| 16 | 883 | HSV | 1.7 | ? | 11.0 | + | + | + |
| | | gG-1 | 0.09 | ? | 2.39 | + | + | + |
| | | gG-2 | 0.10 | - | 0.07 | ? | ? | ? |
| 17 | 843 | HSV | 2.4 | ? | 100.3 | + | + | + |
| | | gG-1 | 0.21 | ? | 3.94 | + | + | + |
| | | gG-2 | 0.08 | - | 0.04 | ? | ? | ? |
| 18 | 868 | HSV | 3.0 | 16.0 | + | + | 22.5 | + |
| | | gG-1 | 0.15 | 2.09 | + | + | 1.32 | + |
| | | gG-2 | 0.27 | 0.35 | - | - | 0.29 | ? |
| 19 | 859 | HSV | 0.7 | 7.9 | + | + | + | + |
| | | gG-1 | 0.13 | 1.20 | + | + | + | + |
| | | gG-2 | 0.11 | 0.02 | ? | ? | ? | ? |
| 20 | 777 | HSV | 1.0 | 14.5 | + | 22.5 | + | + |
| | | gG-1 | 0.66 | 1.59 | + | 1.50 | + | + |
| | | gG-2 | 0.16 | 0.13 | - | 0.17 | ? | ? |
| 21 | 853 | HSV | 1.2 | 92.0 | + | + | + | 12.4 |
| | | gG-1 | 0.21 | 2.30 | + | + | + | 1.35 |
| | | gG-2 | 0.43 | 1.38 | + | + | + | 1.24 |

Table 2 Seroconversion rates in patients with primary genital HSV-1 infection

| antigen | 1W | 2W | 3W | 4~5W | 6~7W | 8W~ |
|---------|---------|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| HSV | 0/21 0% | 13/13 100% | 17/17 100% | 19/19 100% | 20/20 100% | 20/21 95.2% |
| gG-1 | 0/21 0% | 4/18 22.2% | 7/17 41.2% | 8/19 42.1% | 10/18 55.6% | 10/12 83.3% |
| gG-2 | 0/21 0% | 1/21 4.8% | 1/19 5.3% | 1/17 5.9% | 1/12 8.3% | 1/3 33.3% |

ているため再感染例と考えられるのでこれを除くと、抗体値は 3.8 から 22.5 に分布し平均 9.7 であった。第 6 週目以降になっても 12 例の IgG 抗体値は低く、平均 10.4 であった。

b) 型特異的 IgG 抗体 (gG-1 抗体)

gG-1 抗体は、第 2 週目で 22.2%(4/18)、第 3 週目で 41.2% (7/17)、第 4 週~第 5 週目で 42.1% (8/19)、第 6 週~第 7 週目で 55.6% (10/18) が陽性であった。第 8 週以降では 83.3% (10/12) であったが、血清が採取していないため判定できない例が 9 例あるのでこの値の信頼性は低い。第 3 週目に陽転した後第 4 週目で陰性となった例 (# 723) が 1 例あった。また、# 853 は HSV-1 感染例であるが第 2 週目と第 8 週以降に gG-2 に対する抗体も同時に検出された。

c) gG-1 抗体と非特異的 HSV 抗体との関連

HSV 抗体陽性 38 血清のうち gG-1 抗体陽性は 14 血清(36.8%)で、HSV 抗体陰性の 1 血清は gG-1 抗体も陰性であった。HSV 抗体の抗体値が 11.0 以上の時 gG-1 抗体は 75% (9/12) 陽性、15.9 以上で gG-1 抗体は全て (6/6) 陽性であった。

2. HSV-2 初感染症例における血清抗体の経時的変化 (Table 3, 4)

12 例の抗体値の経時的変化を Table 3 に、そのまとめを Table 4 に示した。

a) 非特異的 IgG 抗体

第 2 週目で 85.7% (6/7)、第 3 週目で 88.9% (8/9)、第 4 週~第 5 週目で 90.9%(10/11)、第 6 週~第 7 週目で 100% (11/11)、第 8 週以降で 100% (12/12) の陽性率であった。第 2 週目以降の 20 血清における抗体値は 3.0 から 24.0 まで分布し、平均 11.5 であった。

b) 型特異的 IgG 抗体 (gG-2 抗体)

gG-2 抗体の経時的陽性率は、第 2 週目で 71.4%(5/

7)、第 3 週目で 83.3% (5/6)、第 4 週~第 5 週目で 100% (9/9)、第 6 週~第 7 週目で 100% (11/11)、第 8 週以降で 100% (12/12) であった。gG-1 抗体が検出された例はなかった。

c) gG-2 抗体と非特異的 HSV 抗体との関連

HSV 抗体陽性 18 例のうち 15 例 (83.3%) が gG-2 抗体陽性であった。HSV 抗体 9.0 以上はすべて gG-2 抗体が陽性であったが、2 症例 (# 882、# 801) の血清で gG-2 抗体が陽性であったが HSV 抗体は陰性であった。

考 察

性器ヘルペスの型特異的血清診断の可能性について、女性性器ヘルペス初感染例でウイルスを分離して HSV の型を決定した症例について検討を行った。血清診断の原理からみるとその可能性と精度を検討するために先ず最初に行わなければならないのが初感染例の検体をみることである。しかし性器ヘルペスの多くは再発であり、初感染例を集めることは難しいうえに複数回以上採血していなければならないため、8 年間の性器ヘルペス患者 181 例のうちの 33 例にとどまった。Ashley-Morrow らが 6 カ月間に 2 回以上採血できた例について抗体の陽性率を検討した報告があるが⁵⁾、初感染例について 8 週間以内に複数回の採血を行って HSV 抗体と型特異的な抗体の推移を検討した報告は国の内外を問わずほとんどみられない。世界的には型特異的 HSV 抗体検出法が開発されている⁶⁾。我々は既に Gull 社の開発した型特異的 HSV 抗体測定キットについて検討したところ問題のあることが判明し⁷⁾、HerpeSelect(元 MRL)の方が優れていると判断して今回の研究を行った。今回の結果を図示すると Fig. 1 のようになる。HSV-1 初感染例について方法別に比較すると、非特異的な HSV 抗体が第 2 週目に 100%陽転したのに対し、型特異的 HSV-1 抗体の

Table 3 IgG antibody against herpes simplex virus over time after primary genital HSV-2 infection

| | ID | antigen | 1W | 2W | 3W | 4~5W | 6~7W | 8W~ | |
|----|-----|---------|------|------|------|-------|------|-------|------|
| 1 | 734 | HSV | 1.0 | 7.1 | + | + | + | + | |
| | | gG-1 | 0.04 | 0.04 | ? | ? | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.07 | 0.67 | ? | ? | ? | ? | |
| 2 | 747 | HSV | 1.2 | ? | ? | 10.0 | + | + | |
| | | gG-1 | 0.03 | - | - | 0.02 | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.03 | ? | ? | 2.43 | + | + | |
| 3 | 802 | HSV | 1.1 | ? | 8.8 | + | 16.0 | + | |
| | | gG-1 | 0.03 | - | 0.03 | - | 0.05 | ? | |
| | | gG-2 | 0.26 | - | 1.08 | ? | 1.53 | + | |
| 4 | 860 | HSV | 1.4 | ? | ? | ? | 7.6 | 24.0 | 14.6 |
| | | gG-1 | 0.38 | - | - | - | 0.08 | 0.10 | 0.07 |
| | | gG-2 | 0.15 | ? | ? | ? | 1.13 | 8.00↑ | 6.01 |
| 5 | 797 | HSV | 1.6 | ? | ? | 10.0 | + | + | |
| | | gG-1 | 0.11 | - | - | 0.19 | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.08 | ? | ? | 2.46 | + | + | |
| 6 | 882 | HSV | 0.1 | - | - | 3.9 | ? | ? | |
| | | gG-1 | 0.03 | - | - | 0.01 | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.14 | ? | ? | 1.52 | + | + | |
| 7 | 741 | HSV | 1.0 | 5.0 | + | 13.5 | + | + | |
| | | gG-1 | 0.10 | 0.10 | - | 0.08 | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.45 | 0.55 | ? | 8.00↑ | + | + | |
| 8 | 790 | HSV | 1.1 | 9.4 | + | 17.0 | 18.5 | + | |
| | | gG-1 | 0.20 | 0.18 | - | 0.19 | 0.19 | ? | |
| | | gG-2 | 0.11 | 1.74 | + | 3.78 | 4.27 | + | |
| 9 | 856 | HSV | 2.1 | 15.7 | + | + | 21.8 | + | |
| | | gG-1 | 0.34 | 0.20 | - | - | 0.36 | ? | |
| | | gG-2 | 0.08 | 3.84 | + | + | 6.42 | + | |
| 10 | 801 | HSV | 1.0 | 3.0 | 9.0 | + | + | + | |
| | | gG-1 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | ? | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.23 | 3.36 | 5.50 | + | + | + | |
| 11 | 847 | HSV | 2.1 | 7.0 | + | + | + | + | |
| | | gG-1 | 0.06 | 0.01 | ? | ? | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.14 | 5.37 | + | + | + | + | |
| 12 | 725 | HSV | 3.4 | 7.5 | + | + | + | + | |
| | | gG-1 | 0.05 | 0.07 | ? | ? | ? | ? | |
| | | gG-2 | 0.11 | 2.39 | + | + | + | + | |

Table 4 Seroconversion rates in patients with primary genital HSV-2 infection

| antigen | 1W | 2W | 3W | 4~5W | 6~7W | 8W~ |
|---------|---------|-----------|-----------|-------------|------------|------------|
| HSV | 0/12 0% | 6/7 85.7% | 8/9 88.9% | 10/11 90.9% | 11/11 100% | 12/12 100% |
| gG-1 | 0/12 0% | 0/12 0% | 0/9 0% | 0/8 0% | 0/4 0% | 0/2 0% |
| gG-2 | 0/12 0% | 5/7 71.4% | 5/6 83.3% | 9/9 100% | 11/11 100% | 12/12 100% |

陽転率は 22.2%と低く、第 4 週～第 5 週目で 42.1%、第 6 週～第 7 週目でも 55.6%と、約半数しか血清診断できなかった。Ashley-Morrow らは HSV-1 初感染例では感染後 25 日で 50%が、50 日で 70%が陽転するとし、本研究よりもやや良い成績を報告しているが⁴⁾ほぼ同じ傾向であろう。一方 HSV-2 の初感染例において、第 4 週～第 5 週目で HSV 抗体の陽転率は 90.9%、型特異的な HSV-2 抗体の陽転率は 100%を示し、どちらの方法でも血清診断が可能であった。上述の Ashley-

Morrow らの報告では感染後 21 日で 50%が、50 日で 85%が陽転しているがほぼ本研究と同じ傾向である。HSV-1 の初感染 21 例のうち 1 例 (4.8%) で gG-1 に対する抗体の陰転がみられた (# 723)。このような一過性の陰転が HSV-1 の初感染の 10%にみられたとの報告⁴⁾もあり血清診断の際に考慮する必要がある。HSV 抗体が第 3 週目に抗体値 100.3 となった例 (# 843) および第 2 週目に抗体値 92.0 となった例 (# 853) は、その他の症例の 2 週目以降の抗体値の平均が 9.7、5 週目以

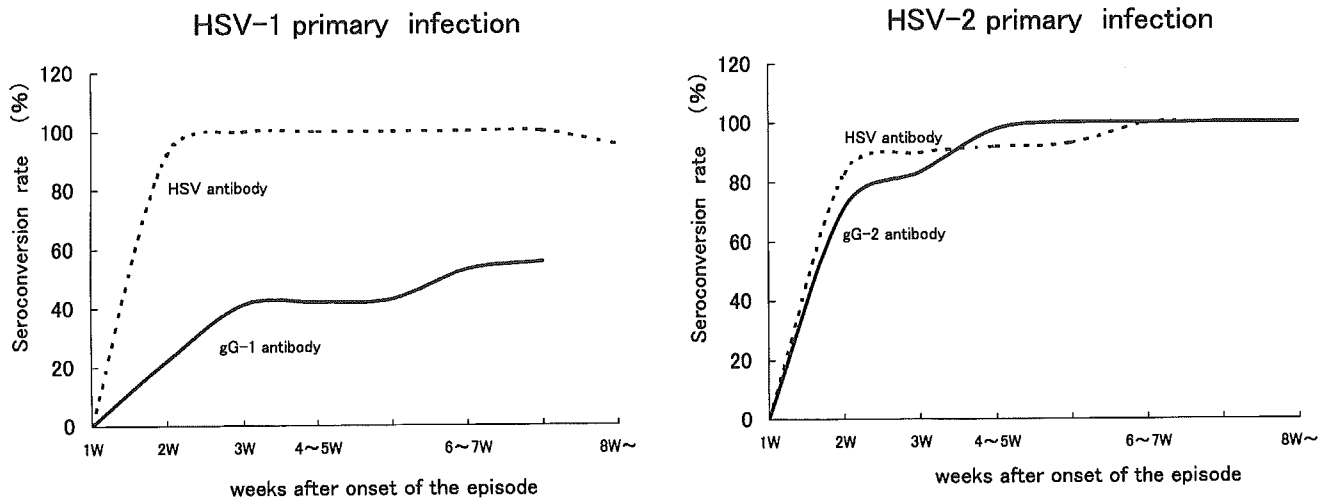


Fig. 1 Seroconversion rates of non-typespecific and type-specific antibodies against herpes simplex virus (HSV) in patients with primary genital HSV infection

降でも平均 10.4 であったのと比べると異常高値であることが判る。発症時の抗体は陰性なので初感染と考えたが、IgG 抗体が急上昇していることからこの 2 例は再感染によるブースター効果と考えられた。特に# 853 例は発症時抗体陰性であったので HSV-1 の初感染例と考えたが 2 週目には gG-1 に対する抗体と gG-2 に対する抗体が両方検出された。本例は HSV 抗体が急上昇していることから、既に HSV-2 にも感染していたものと思われる。或いは本キットによる型別能が感染している HSV の株によっては限界があるのかも知れない。HSV-1 の初感染例で HSV 抗体陽性の 38 血清のうち gG-1 抗体陽性は 14 血清 (36.8%) であり、HSV 抗体の抗体値が 15.9 以上になると gG-1 抗体が全例陽性となったことから、gG-1 抗体の出現は抗原性のより強いと云われている gB、gD に対する抗体の出現よりも劣ることが考えられる。或いは今回用いた HerpeSelect-1 で使用している gG-1 の抗原量が少ないため感度が低かったことも考えられる。一方、HSV-2 初感染例では HSV 抗体 9.0 以上で gG-2 抗体が全て検出されている。このように gG-2 抗体がより早く出現しているのは、もともと抗原性が強いいためか出現する抗原量が多いためと考えられる。HSV 抗体陰性の 2 例 (# 882、# 801) で gG-2 抗体は陽性を示したが、HSV 抗体測定キットは HSV-2 に対する抗体の検出感度が悪い可能性がある。このキットは HSV-1 の感染細胞の lysate を用いているためと

考えられる。病原診断の難しい症例では、HerpeSelect を用いることにより HSV-1 初感染例の約 50%が、HSV-2 初感染例ではほぼ全例に型特異的に血清診断が可能であることが判明した。今回は IgG 抗体について検討したが感染後早期に出現する IgM 抗体を型特異的に検出できるキットの開発が望まれる。

文 献

- 1) Reeves, WC, et al.: Risk of recurrence after first episodes of genital herpes. Relation to HSV type and antibody response. N. Engl. J. Med. 1981; 305: 315-319.
- 2) CDC. Sexually Transmitted Diseases, Treatment Guidelines 2002. MMWR. 2002; 51 (No. RR-6): 12-17.
- 3) Lee, FK, et al.: Detection of herpes simplex virus type 2 specific antibody with glycoprotein G. J. Clin. Microbiol. 1985; 22: 641-644.
- 4) Ashley, RL: Type-specific antibodies to HSV-1 and 2: review of methodology. Herpes. 1998; 5: 33-38.
- 5) Ashley-Morrow, R, Krantz, E, Wald, A: Time Course of Seroconversion by HerpeSelect ELISA After Acquisition of Genital Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) or HSV-2. Sex Transm. Dis. 2003; 30: 310-314.
- 6) Ashley, RL: Sorting out the new HSV type specific

antibody tests. Sex Transm. Inf. 2001 ; 77 : 232-237.

異抗体測定 ELISA キット「Gull」と「MRL」の比較検討.
臨床とウイルス, 2002 ; 30 : 50-56.

7) 川名 尚, 相馬春江: 単純ヘルペスウイルスウイルス型特

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—

KAWANA TAKASHI

川名 尚

◎帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科

潜伏感染するウイルスといえば、まず単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) を思い浮かべるように、HSV は潜伏感染するので有名なウイルスである。それは、古くから HSV 感染では再発または回帰発症が知られていたからである。

HSV は、潜伏感染するだけでなく再活性化されて再び体の表面や時には眼や脳に炎症を惹起するなど、その名が示すほど決して単純ではない。HSV は永年にわたり子孫を絶やすことなく広く人類に感染し蔓延し続けてきた。したがって、最もありふれたウイルスといってもよい。HSV はそのために知覚神経節内の潜伏感染と再活性化という巧みなメカニズムを用いてきた。免疫反応の届きにくい神経節内というところを選び、さらに宿主の免疫反応を巧妙にすり抜ける仕組みまで持っている。

本稿では、筆者が産婦人科の医者として女性の性器ヘルペスの臨床に従事してきた経験を元と与えられた課題について述べてみたい。

■HSV 感染の疫学

HSV は、ヘルペスウイルス亜科に属し、約 150kbp の直線状 2 本鎖の DNA ウイルスである。同じように知覚神経節に潜伏感染する水痘・帯状

疱疹ウイルスとともに α ヘルペスウイルスに分類されている。

HSV には、抗原的に一部異なる 1 型 (HSV-1) と 2 型 (HSV-2) が知られている。ヒトの自然感染部位は、1 型が口、眼、脳などの上半身、2 型が性器を中心とする下半身である。しかしこの棲み分けは必ずしもクリアカットではなく、1 型は性器にも感染する。

1 型は、幼少時に口内炎という形で感染することが多い。2 型は、性交によって感染するのでティーンエイジャー以降に感染する。

既述のとおり HSV は、人類に広く感染しているが、本邦では 1960 年代に比べて一般人口の抗体保有率は減少してきている。例えば人口の 50% が抗体を保有する年齢を比べた報告がある。それによると 1960 年代は 9 歳であったものが、1980 年代では 28 歳に上昇しているという¹⁾。これは、1 型も 2 型も合わせて検出したものであるが、その大部分は 1 型の抗体を中心に検出したものであろう。2 型の抗体保有率は、民族や国により大変異なっているが、本邦では世界的にみて最も低く、成人では 5~10% の保有率である。米国では白人が 25%、黒人では 50% 以上という²⁾。

HSV は、人に感染すると知覚神経を伝わって知覚神経節に潜伏感染する。HSV 抗体保有者には、恐らく HSV が潜伏感染していると考えられる。そして、恐らくこれらのほとんどすべての人

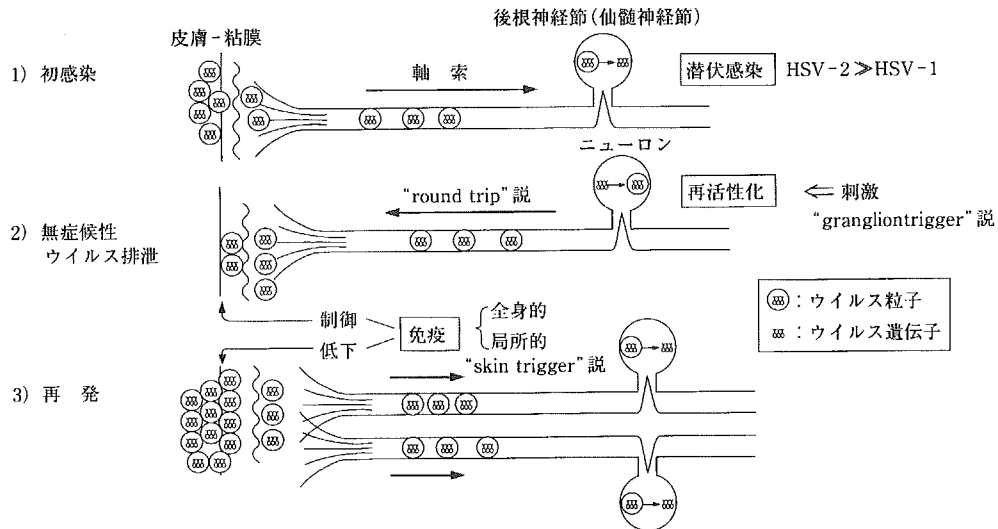


図1 性器の単純ヘルペスウイルスの感染病態(川名)

がHSVを症候性に、または無症候性に、頻度には差があるが再活性化し排泄していると思われる。

■潜伏感染のメカニズム

HSVは性器に感染すると知覚神経を上行して知覚神経節である仙髄神経節のニューロンの核内に潜伏感染する。潜伏感染しているHSVは何らかの刺激で再活性化されると再び知覚神経を下行して皮膚粘膜に達する。ここで増殖して病変を形成すると考えられる(図1)。

筆者は、再活性化されて下行し、皮膚や粘膜に達することは頻繁に起きているのではないかと考えている。局所や全身の免疫が抑えているために発症しないが、抑えられなくなるとHSVが増殖し、発症することになるのであろう。HIV感染者やステロイドや抗癌剤を全身投与されている患者にしばしば発症するのは、このような仕組みによるものであろう。また、性交後に決まって再発する患者がいるが、恐らく局所の免疫機構が変化するためではないかと考えている。疲労やストレスによって再発する原因としては、全身の非特異的免疫(innate immunity)の低下が考えられる³⁾。

HSVの潜伏感染と再活性化というプロセスに

は、潜伏感染の成立とその維持、そして再活性化という事象があり、それぞれにどのようなメカニズムが働いているのかが興味のあるところである。HSVが潜伏感染している知覚神経節ではHSVゲノムは認められるが、遺伝子の転写、蛋白合成は抑制されている状態である。しかし、LAT(latency associated transcripts)は潜伏感染状態でも唯一転写されている遺伝子である。LATの転写領域にコードされているORF0がウイルス遺伝子発現カスケードの最初のステップである α 遺伝子産物の発現または機能を抑制しているためではないかといわれている。

HSVの再活性化のメカニズムは不明な点が多いが、刺激に反応する宿主細胞因子が α 遺伝子の発現を誘導し、再活性化が引き起こされると考えられている⁴⁾。最近マウスの実験により潜伏感染している神経節細胞の中には、数は少ないがHSVの遺伝子が発現し、さらにはHSV抗原まで検出されるニューロンがあるという報告がなされた⁵⁾。潜伏感染といっても実は少量ながらHSVが排泄されている可能性を示唆している。

筆者は、血清抗体の検出頻度からこれと同じような考え方をしてきた。すなわち、性器にHSV

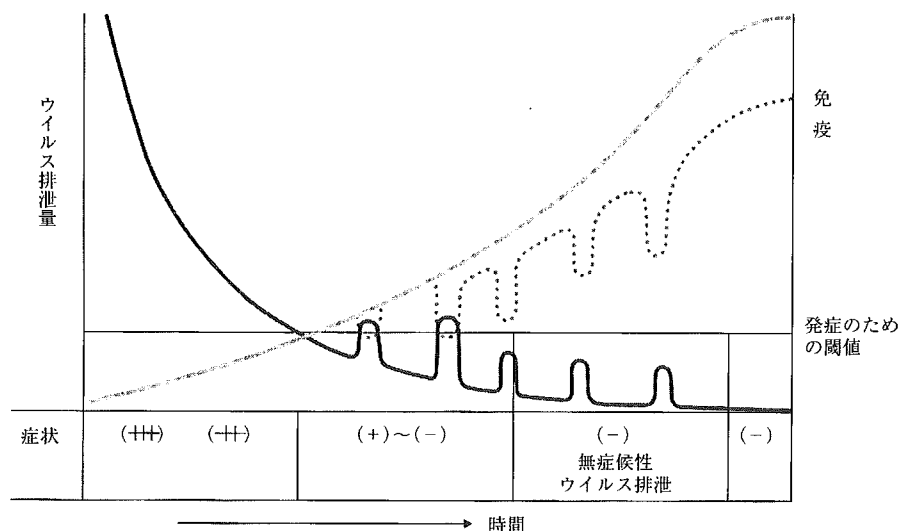


図2 性器の単純ヘルペスウイルス感染のスペクトラム

が初感染した人の IgG 抗体は、急性症状を呈したにもかかわらず感染した後もあまり高くならなかった。しかし、一般人口の IgG 抗体値の分布をみると、かなり高い値の人が 30~50% もいるのである。このことは、HSV の IgG 抗体は HSV に感染後、何度も HSV 抗原刺激を受けて上昇することを意味している。つまり HSV 抗体を有する一般の健康人の体の中では頻りに HSV の再活性化が起きているが、免疫の力で症状の発現が抑えられているのであろう。

■潜伏感染の臨床的意義

潜伏感染している HSV が体に障害を与えることはないようであるが、その再活性化による再発は重大な意義がある。再発は肉体的、心理的に大きなストレスになる。性器ヘルペスの頻回の再発は特に深刻な問題である。

再発の頻度は、HSV の型に関係がある。口と性器に HSV が同時感染したヒトの再発の頻度を調べた報告によると、1 型に感染した人は口唇ヘルペスの再発が多いが、性器ヘルペスの再発は少ない。一方、2 型に感染した場合は口唇ヘルペスの再発は少ないが、性器ヘルペスの再発が多いと

いう⁶⁾。

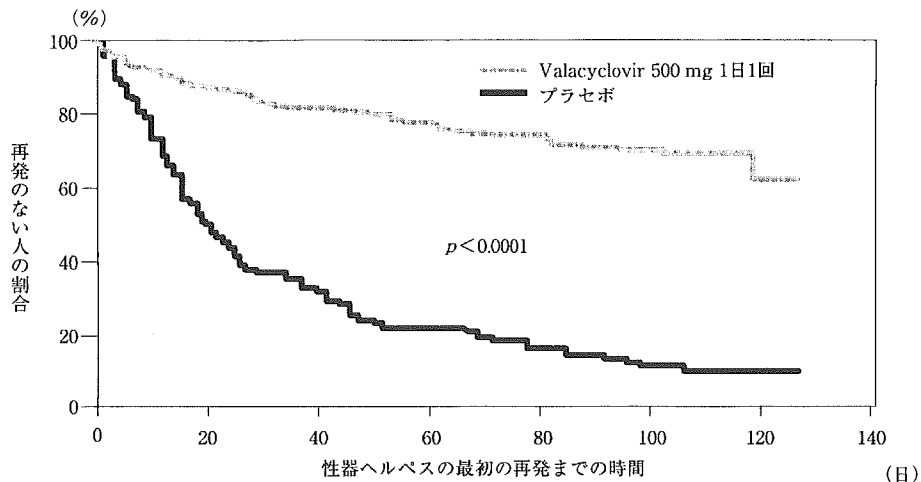
筆者が、初感染性器ヘルペス患者について前方視的にその再発率を調べたところ、1 年以内の再発が 2 型に感染した場合は 85% であったが、1 型では 25% であった。しかも 2 型に感染した場合は比較的早期に再発している。したがって感染した HSV の型を決めることは、その後の再発率を予見する上で役立つ。ただし 1 型に感染した場合も再発することもある。その際、同じ 1 型でもある特殊なタイプは特に再発しやすいようである⁷⁾。

■無症候性ウイルスの排泄

初めて性器ヘルペスを発症した患者の性行為の相手について調査したところ、その 70% は全くヘルペスウイルス感染を思わせる症状がなかった。このような相手は無症候で HSV を排泄していると考えられる。

無症候といったが、実は真の意味の無症候はむしろ少なく、軽い症状などのため HSV によるということを認識していないだけの場合が意外に多いという報告がある⁸⁾。

性器ヘルペスの場合、ピンホール程度の小さい病変は認識されないし、肛門の病変は痔と誤診さ



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回以上頻回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ため、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、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てみたい。

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、潰瘍が線状のこともある。中にはピンホール程度のごく小さいものまでである。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 |
| | | HSV-2 初感染 |
| | 非初感染 | HSV-1 非初感染初発 |
| | | HSV-2 非初感染初発 |
| | | 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、人手と設備がいるので

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 |