

寄せられた相談メールは 4,174 件であった。

月別の相談メール件数を図 2 に示したが、1 月～2 月が多かった。また、曜日別 (図 3)、時間別 (図 4) の状況をみると、月～木曜日、夕方から夜間にかけての利用が多かった。

また、相談者のメールは、3/4 強が携帯電話から送信されたものである (図 5)。

相談者の性別構成を図 6 に示したが、男性 1,640 件 (39%)、女性 2,281 件 (55%)、性別不明が 253 件 (6%) であった。

メール相談利用者の中心は 10 代後半から 20 代前半の若年層であった (図 7 参照)。全体の平均年齢は 22.6 歳で、男性 23.8 歳、女性 21.7 歳であった。

コーディング表をもとにメール相談内容を分類したのが表 2 である。相談内容は 1 件のメールでも多岐に渡ることが多いため、複数該当になっている。男女ともに多いのは「自覚症状」、「異性間性的接触」である。男性では次に「性器・ED」「精液・射精・早漏」「検査法・治療法」の順で多く、女性では「妊娠・不妊・不感症」「生理・排卵」「おりもの」「検査法・治療法」の順が多かった。

性感染症の疾患については男性では「HIV・エイズ」、女性では「クラミジア」に関する相談が多かった。また、男女ともに「感染経路」に関するものが多かった。

2. “性の健康相談室”を通しての相談、検診、啓発：

平成 18 年 4 月より平成 21 年 2 月末の期間に 184 人の相談者が来訪した。性別、年齢構成は次のとおり。

性別：

男性 43% (79 人)；女性 57% (105 人)

年齢構成： (男性：女性)

15-19 歳： 3% (1：5 人)

20-24 歳： 23% (11：31 人)

25-29 歳： 27% (18：31 人)

30-34 歳： 22% (19：22 人)

35-39 歳： 24% (29：15 人)

40 歳以上： 1% (1：1 人)

男性では 35-39 歳が最も多く、女性では 20-24 歳と 25-29 歳が多い。男性に比べると女性の方が明らかに若い年齢層が来訪している。(図 8、図 9 参照)。

また、受診者の初交年齢は、18 歳が男女ともに一番多かった。最年少は 11 歳だった (図 10 参照)。

この健康相談室を知った手段としては、携帯サイトを含めた財団ホームページ・その他ネットが 57%、友人・パートナーからの紹介 16%などである (図 11 参照)。

性感染症の検査結果・診断：

クラミジア抗原 (陽性) 13 人 (7%)

淋菌 (陽性) 4 人

HCV 抗体 (陽性) 1 人

また、低リスク型 HPV 陽性の 10 人が尖圭コンジローマと診断された。希望者へのみ実施したのどの拭い液ではクラミジア (陽性) 1 人。HIV、梅毒、HBS、HSV については感染者がいなかった。(図 12 参照)。

また、クラミジア IgA 抗体 (+) / IgG 抗体 (+) 21 人 (11%)、(+)/(±) 1 人、(+)/(-) 1 人、(±)/(+) 1 人、(±)/(-) 1 人、(-)/(+) 31 人 (16%)、(-)/(±) 1 人、(-)/(-) 125 人 (図 13 参照)。HPV 中～高リスク (陽性) 28 人の結果となった (図 14 参照)。

感染者には適切な治療を勧め、医療機関を紹介するなど、相談・検診者の立場に立って対応をした。そして、非感染者には今

後も性感染症への注意を促し、予防啓発に努めた。

D. 考察

1. Eメールによる“性の健康メール相談”:

本メール相談の利用者は10代から20代前半の若者が中心と言えるだろう。若者たちにとってはいつでも、どこからでもメールが送信可能で、インターネットにも接続可能な携帯電話は、最も身近で便利なコミュニケーションツールであり、データバンクになっていることが分かる。

携帯電話を利用した性感染症予防啓発活動やキャンペーンが、若年層の性感染症予防に有効であることに疑問の余地はない。彼らが必要としたときに役に立つ情報を掲載した携帯サイトの構築が、若年層の性感染症蔓延防止の第一歩になり得る。

また、自分の身体や月経や妊娠・避妊に関する正しい知識が不足していることは明らかであり、若年層に積極的にこれらの情報を提供していく必要があると考える。

2. “性の健康相談室”を通しての相談、検診、

啓発:

無症状のことが多い性感染症は、その特異性からも検診率を上げることは難しいが、1人ではなくパートナーや友人同士のカップル検査を推進すれば、ピンポン感染を防止できるし、より効率的な感染の発見・治療・予防啓発に直結し、性感染症の蔓延防止策として有効であろう。

性感染症の蔓延防止のためには、若い人々をターゲットに性感染症という疾患の重大性を強くアピールし、保健行政が積極的、継続的に匿名、無料の相談・検診の場を整備・拡充・

提供していく必要がある。そして、教育行政による徹底した性教育の推進が必須である。

E. 結論

1. Eメール“性の健康メール相談”:

若年層の性感染症蔓延防止策として携帯電話の有効性が極めて高いことが分かった。

2. “性の健康相談室”を通しての相談、検診、啓発:

若年層の相談・検診者の募集法として携帯サイトを中心としたインターネットの活用が有効である。また検査機会の積極的、継続的な提供が検診率の向上に繋がり、性感染症の蔓延防止に重要である。

性器クラミジア感染症は2002年をピークに歯止めがかかったといわれているが、本研究結果でも減少傾向にある。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

文献

- 1) 松田静治:性感染症における最近の動向と話題, 婦人科治療 vol.92 no.5-2006/5, 791-799.
- 2) 松田静治:わが国における性感染症の動向, 臨床と研究, 84 (5), 1-6, 2007.
- 3) 松田静治:近年の性感染症事情, クリニカルプラクティス, 26 (4), 60-66, 2007.
- 4) 松田静治:性感染症, 産婦人科の世界, 59 (4), 107-116, 2007.
- 5) 松田静治:細菌性性感染症, 小児科, 48 (5), 533-538, 2007.
- 6) 松田静治:若い世代にふえている! 家族で考えたい性感染症, クリニック Q&A, 547, 2-5, 2009.
- 7) 松田静治:東京におけるクラミジアトラコマチスおよび淋菌検査の実施成績, 東京都予防医学協会年報 2008 年版, 第 37 号, 110-113, 2008.
- 8) 松田静治:性感染症の最近の動向, 臨床婦

人科産科, 63 卷, 2 号, 110-115, 2009.

- 9) 松田静治: 性感染症の最近の動向, 臨床とウイルス, 36 卷, 5 号, 361-367, 2008.

学会発表など

- 1) 松田静治, 市瀬正之, 小林重高: 東京地区におけるクラミジア・トラコマチスおよび淋菌の検査成績, 日本性感染症学会第 20 回学術大会, 平成 19 年 12 月 1 日.
- 2) 松田静治: 性感染症と月経トラブルからの解放に向けて, 第 59 回日本産科婦人科学会市民公開講座の司会, 平成 19 年 4 月 13 日 (於. 京都).
- 3) 松田静治: 第 10 回性科学セミナー, 最近の性感染症—若年層を中心に, 平成 20 年 10 月 4 日 (於. 京都).

H. 知的所有権の取得状況

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案登録 | なし |
| 3. その他 | なし |

図1 研究の目的・方法

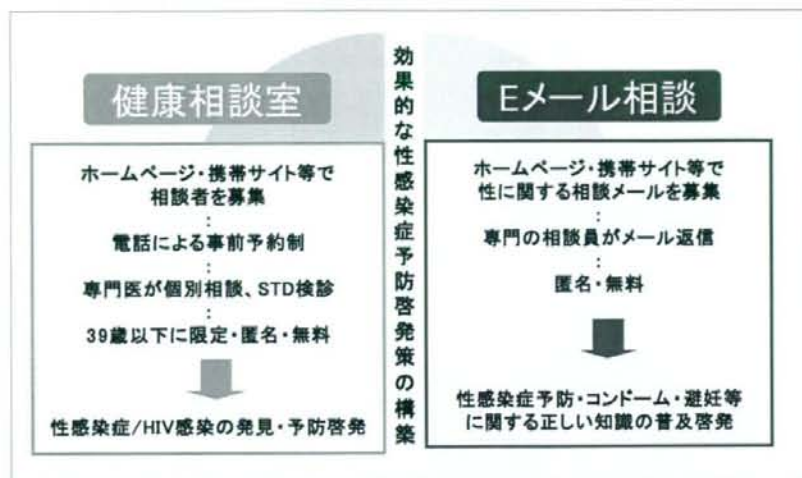


図2 Eメール - 月別相談件数

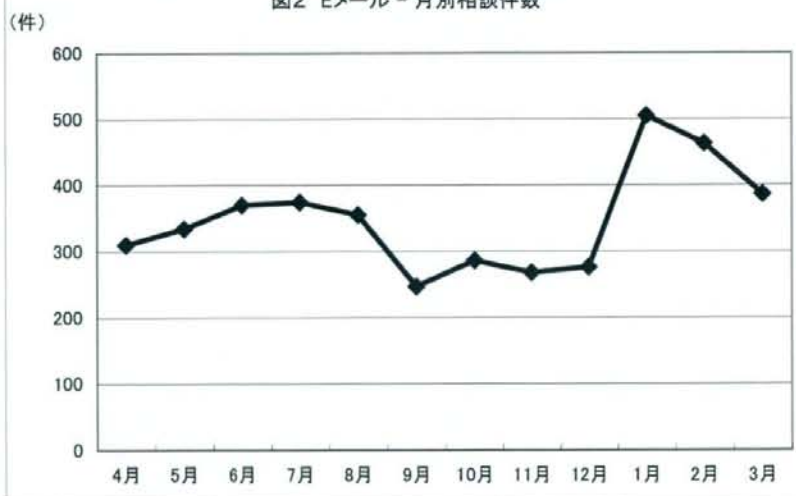


図3 Eメール - 曜日別相談件数

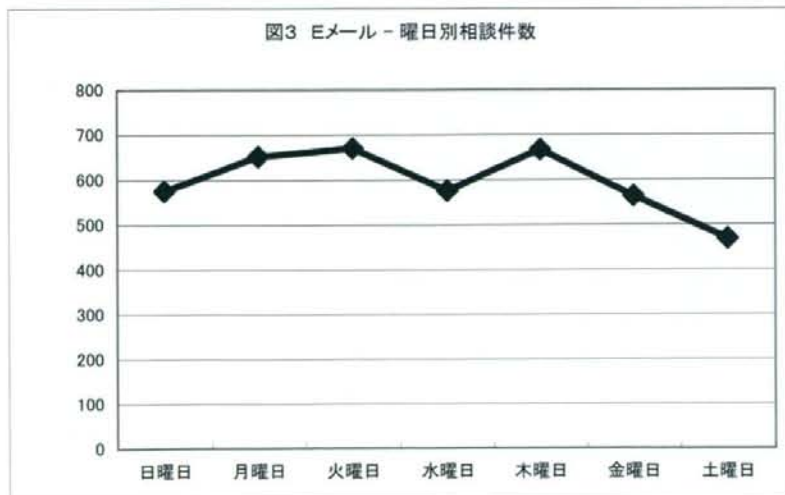


図4 エメール - 受信時刻別件数



図5 エメール - 相談者のメール端末

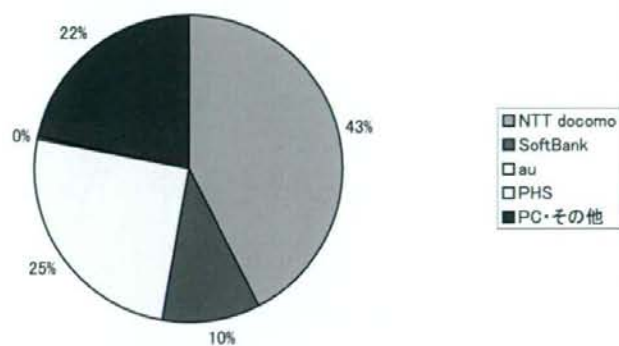
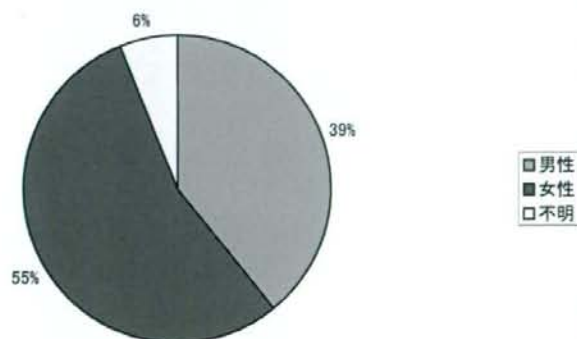


図6 エメール - 相談者の性別



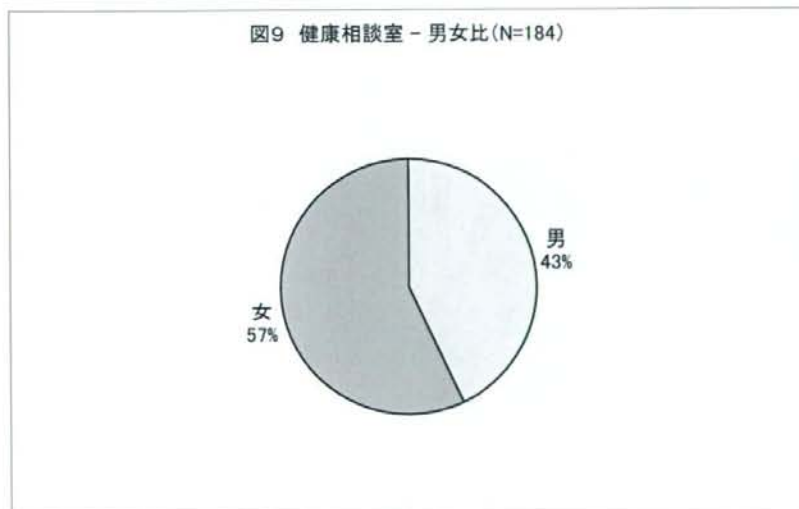
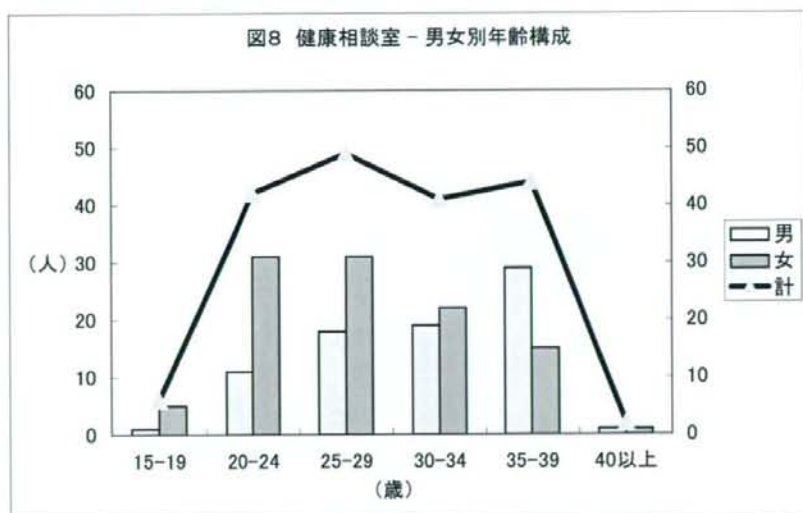
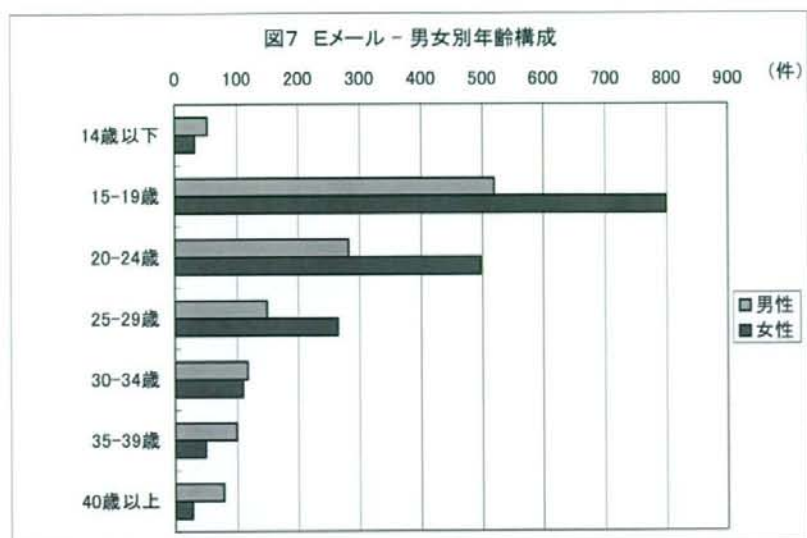


図10 初交年齢

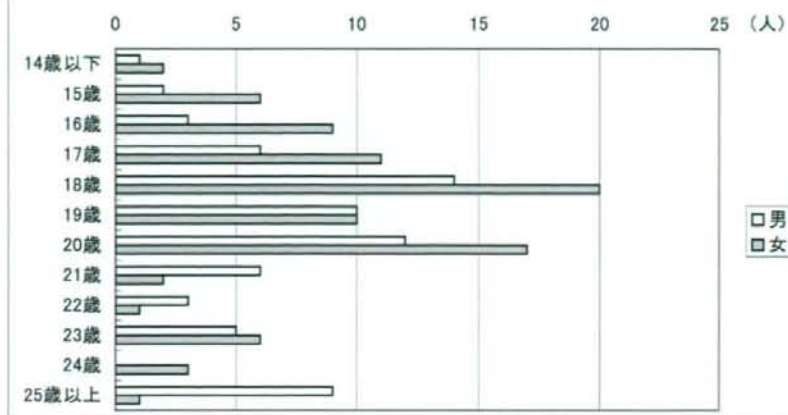


図11 情報取得手段

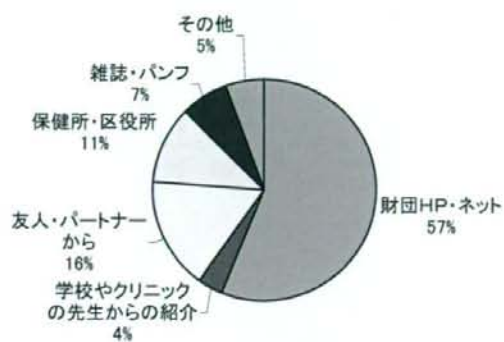


図12 クラミジア抗原 (全体N=177)

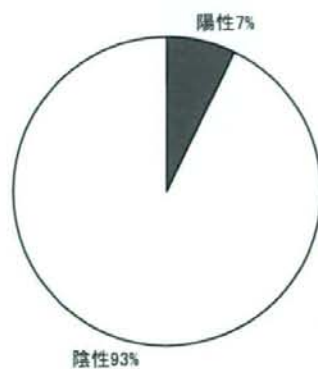


図13 クラミジア抗体(全体N=182)

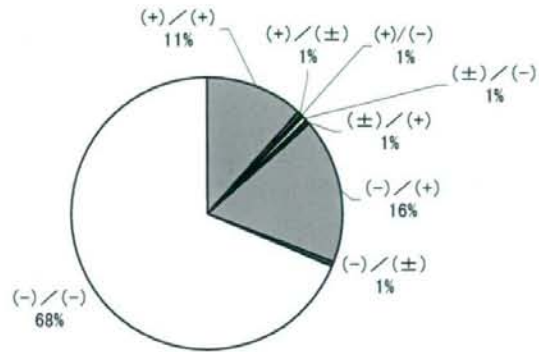


図14 中～高リスク型HPV(女N=97)

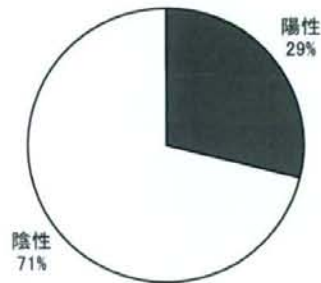


表1 健康相談室・検査項目・検査法

血清	:	HIV 抗体・抗原(スクリーニング): EIA 法
		梅毒定性: RPR 法/TP 抗体法 (平成 20 年度)
		: TPHA 法/ガラス板法 (平成 18~19 年度)
		クラミジアトラコマチス IgA/IgG (EIA 法)
		HCV 抗体 3: LPIA (平成 20 年度)
		: RIA (平成 18~19 年度)
		HBs 抗原: CLIA
スワブまたは尿	:	クラミジアトラコマチス: SDA 法
		淋菌同定DNA: SDA 法
		HPV-DNA同定: 中～高/低リスク型
		HSV 特異抗原検出

表2 相談内容の集計結果

カテゴリー	男 (N=1640)		女 (N=2281)		
	N	(%)	N	(%)	
症状	自覚症状(痛み・かゆみ・炎症・腫な)	481	29.3%	818	35.9%
	症状	115	7.0%	167	7.3%
	性器	345	21.0%	166	7.3%
	胸	9	0.5%	36	1.6%
	膣分泌液	9	0.5%	41	1.8%
	おりもの	14	0.9%	355	15.6%
	生理・排卵	73	4.5%	419	18.4%
	不正出血	32	2.0%	222	9.7%
	精液・射精・早漏	245	14.9%	64	2.8%
真珠様小丘疹	108	6.6%	26	1.1%	
STD	クラミジア	96	5.9%	217	9.5%
	淋病	41	2.5%	35	1.5%
	梅毒	26	1.6%	30	1.3%
	口唇・性器ヘルペスウイルス感染症	40	2.4%	74	3.2%
	尖圭コンジローマ・HPV	58	3.5%	69	3.0%
	臈トリコモナス症	2	0.1%	25	1.1%
	性器カンジタ症	15	0.9%	117	5.1%
	HIV感染症・AIDS	182	11.1%	99	4.3%
	毛ジラミ症	5	0.3%	16	0.7%
	A型・B型・C型肝炎	16	1.0%	14	0.6%
	赤痢アメーバ症	0	0.0%	0	0.0%
	感染経路	200	12.2%	266	11.7%
	異性間性的接触	352	21.5%	597	26.2%
	同性間性的接触	8	0.5%	1	0.0%
	性的接触(性別不明)	0	0.0%	0	0.0%
予防法	53	3.2%	57	2.5%	
全般	178	10.9%	239	10.5%	
検査・治療	検査法・治療法	229	14.0%	334	14.6%
	検査代・治療費	33	2.0%	44	1.9%
	検査・病院の信頼性	76	4.6%	113	5.0%
	検査場所・病院の場所	53	3.2%	65	2.8%
セックス全般	セックス	158	9.6%	258	11.3%
	妊娠・不妊・不感症	202	12.3%	513	22.5%
	中絶・流産	12	0.7%	46	2.0%
	ピル	9	0.5%	77	3.4%
	避妊	47	2.9%	103	4.5%
	基礎体温	8	0.5%	40	1.8%
	コンドーム	69	4.2%	55	2.4%
	オナニー	144	8.8%	48	2.1%
コミュニケーション	14	0.9%	35	1.5%	
セクシュアリティ	同性愛	10	0.6%	3	0.1%
	両性愛	1	0.1%	0	0.0%
	ジェンダー	3	0.2%	3	0.1%
他機関紹介	12	0.7%	8	0.4%	
その他	173	10.5%	187	8.2%	

性感染症検査に関する説明

当相談室では、性感染症（クラミジア、淋菌、梅毒、HBV、HPV（女性のみ）ヘルペス、HCV、HIV）に関する検査を受けることをおすすめ致します。検査結果につきましては、匿名のデータとして学会等で発表することがありますが、個人のプライバシーを厳守し、ご迷惑をおかけしないことをお約束致します。

なお、検査内容等についてご不明な点がありましたら、遠慮なく担当医にご質問下さい。

性の健康医学財団性の健康相談室
代表 松田 静治

.....
性の健康医学財団性の健康相談室 松田 静治 殿

性感染症検査同意書

私は、性感染症検査、特に HIV 感染症検査の実施について _____ 医師より検査内容と必要性について十分説明を受け理解しました。

つきましては、性感染症検査および HIV 感染症検査を受けることに

同意致します

HIV を除く検査のみ同意致します

同意致しません

また、検査結果を聞くことに

同意致します

同意致しません

平成 年 月 日

氏名 印

住所

緊急時の連絡先：(財)性の健康医学財団 電話 03-3813-4098

3. 性感染症における検査や治療法に関する研究開発

厚生科学研究費補助金[新興・再興感染症研究事業]
性感染症に関する特定感染症予防指針の推進に関する研究班
総合研究報告書

性器ヘルペスの病原診断法の開発

分担研究者 川名 尚 帝京大学医学部付属溝口病院産婦人科客員教授
研究協力者 西澤美香 大貫裕子 塚越静香* 西井 修
帝京大学医学部付属溝口病院産婦人科
*キネマアートクリニック
田中道子 佐多徹太郎 国立感染症研究所病理部

研究要旨

性器ヘルペスの診断には病原診断が必須であるが、現在保険で行える検査法は感度が非常に悪い。そこで、精度の高い性器ヘルペスの病原診断として LAMP 法と PCR 法などの核酸増幅法の開発とその臨床応用の可能性を検討した。今回開発した LAMP 法は、培養法と同等の感度・特異度を有し、しかも簡易装置により短時間に少ない手順で単純ヘルペスウイルス DNA を検出できるなど優れた点を有する。LAMP 法は臨床の場で用いることのできる簡易核酸増幅法として有望である。

I. 研究の意義

2006 年改正の性感染症に関する特定感染症予防指針における本研究の意義は以下の通りである。

第一 原因の究明

二 発生動向の調査の活用

定点からの性器ヘルペスの届出は正しい診断によらなければならない。性感染症学会のガイドラインでは鑑別を要する疾患として 13 疾患が挙げられているが、そのためには精度がよく迅速にできる病原診断(病原体検査)の開発が必須である。現在保険で用いられている蛍光抗体法による病原診断は性器ヘルペスのような小さい病変では感度が非常に悪く偽陰性が大変多い。この点を考慮したためか届出基準に病原診断が含まれていない。このことはクラミジア感染症が感度の非常に良い核酸増幅法が届出基準に入っているのと対照的で、従って性器ヘルペスの届出数が過小となっている可能性がある。精度の良い病原診断法

が開発されることにより届出数はより正確になる。

第二 発生の予防及び蔓延の防止

三 検査の推奨と検査機会の提供

「…梅毒及び性器ヘルペスウイルス感染症にあつては抗体検査を基本としつつ…」とあるが、単純ヘルペスウイルスには 1 型と 2 型があり、現在の血清学的検査法では口に感染する 1 型と性器に感染する 2 型の鑑別はできない。多くの人は口に単純ヘルペスウイルス 1 型に感染しているが、これを性器ヘルペスと誤診するのでこの部分の記載は不適當である。性器ヘルペスも病原診断を基本としなければならない。そのためには精度の良い診断法の開発が必須である。

第四 研究開発の推進

二 検査や治療等に関する研究開発の推進

迅速かつ正確に結果が判明する検査方法の開発が求められている。本研究はまさにこの要望に

応えるものである。

以上により、性器ヘルペスの病原診断の開発を目指す本研究は「特定感染症予防指針」の推進には適うものである。

II. 研究の目的

性器ヘルペスを確定診断するための感度・特異度がよくしかも迅速に簡便にできると共に単純ヘルペスウイルス1型か2型も判別できる病原診断法の開発を目的とした。これに適う方法として本邦で開発された核酸増幅法である¹⁾LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)に注目し臨床の現場でも使える方法の開発を目指した(Notomi et al. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:e63)。さらに、世界的に行われているPCR (Polymerase chain reaction) 法による単純ヘルペスウイルスDNA 検出法について本邦で使えるプライマーの開発を行いその有用性を検討した。

III. 期待される効果

感度・特異度の良い病原診断法が開発されれば性器ヘルペスの診断の精度が向上するので診断と治療に大いに貢献するばかりでなく届出基準に入れることにより、より正確な疫学情報を得ることができる。

IV. 3年間の研究成果

1. LAMP法の開発と臨床応用

1) LAMP法に注目したのは以下の理由による。

①LAMP法は核酸増幅法であるため非常に感度がよく特異性もよい。

②反応時間が1時間と短くてよいので迅速に結果がでる。

③PCR法と違って温度が一定で反応するので用いる器具が簡易となる。

④以上から、日常臨床の場で簡易にできる検査法として用いられる可能性があり性器ヘルペスの正しい診断と治療に寄与することになる。

⑤本邦で開発された方法であり改良を加えることも容易であると共に本邦産業育成に貢献する。

2) LAMP法の開発の経緯

LAMP法はLoopを用いて核酸を等温でインキュベートすることにより検体のDNAを短時間で増幅できる本邦で開発された新しい核酸増幅法である。操作はHSV-1またはHSV-2プライマーミックスとDNA増幅試薬キット(栄研)を合わせて23 μ lにし、ここに蒸留水で採取した検体2 μ lを添加する。65 $^{\circ}$ C,60分インキュベートした後、リアルタイム濁度測定装置LA-200テラメックス(株)を用いて濁度を測定し、濁度0.1以上を陽性とし、0.1に達した時間をもって半定量とした。

a) プライマーの検証:この方法の精度を検証するにはHSV-1とHSV-2検出用にそれぞれ作成したプライマーが正しくHSV-1又はHSV-2DNAの一部を増幅できるかが最も大切である。金子らの作成したHSV-1とHSV-2検出用プライマーを用いた(Kaneko H, et al *J.Clin.Microbiol* 2005;43:3290)この二つのプライマーがHSV-1,HSV-2に型特異的に検出できるかを検討するため我々が性器ヘルペス患者から分離し蛍光標識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った新鮮分離株HSV-1 20株、HSV-2 21株を用いて反応性を検討した。HSV-1プライマーはHSV-1株すべてを検出することができ、HSV-2株とは全く反応しなかった。同様にHSV-2用プライマーはHSV-2株すべてを検出することがで

き HSV-1 株とは反応しなかった。

これらから、この二つのプライマーは本邦の HSV を型特異的検出することが証明され優れたプライマーであることが判った。その感度は、10 copy/tube と考えられた。HSV 検出の gold standard である R-66 細胞を用いた分離培養法と比べてほぼ同等か株によってはより検出感度が高いことが証明された³⁾。

b) 臨床検体の採取法と処理について

①臨床検体を細い綿棒で病変部から採取し 5% 仔牛血清の入った培養液と蒸留水と比べたところ、蒸留水が良いことが判明した⁴⁾。

②検体から DNA 抽出を行うか否かについて検討したところ、DNA 抽出を行った方が感度は 10 倍上昇した。この操作により検体から夾雑物を除き pure な DNA にすることができる利点はあるものの操作が一段階増える欠点があり、臨床検体の利便性を重視して DNA 抽出操作をしないで直接検体を用いることにした。

c) 臨床検体を用いた検討

① 対象：HSV を分離して診断した女性性器ヘルペス患者 54 名を対象とした。患者には発症時に HSV 感染の診断と追跡調査として無症候性ウイルス排泄などの感染病態を検討する旨を口答で説明し同意を得た。検体は病変のある時は病変から、ない時は外陰や子宮頸管から細い綿棒で擦過し、ウイルス分離培養のために抗生物質と仔牛血清 5% の入った培養液と LAMP 法のための蒸留水の 2 種類のトランスポートメEDIUM にてそれぞれすすいで検体とした。

② 方法：

i) 培養用検体を 4°C にて 2000rpm, 10 分遠心し、上澄を $5 \times 10^5/ml$ に調整した R-66 細胞浮遊液 5ml

に約 0.5ml 接種した。毎日観察し CPE が陽性 (++) になったものについて細胞を採取しスライドグラスに塗抹し蛍光標識したマウスモノクローナル抗体(デンカ生研)により同定と型の決定を行った。CPE の程度を ~ 3(+) の 4 段階に分け、その観察は 7 日以上行った。CPE が 2~3(+) となった日数を記載した。8 日以上陰性の場合を陰性とした。

ii) LAMP 法：金子らの作成した HSV-1 と HSV-2 のプライマーを用いた(Kaneko H, et al J Clin Microbiol. 2005;43:3290)。操作は HSV-1 または HSV-2 プライマーミックスと DNA 増幅試薬キット(栄研)を合わせて 23 μ l に蒸留水で採取した検体 2 μ l を添加した。65°C 60 分 インキュベートした後リアルタイム濁度測定装置 LA-200 テラックス(株)を用いて濁度を測定し濁度 0.1 以上を陽性とし、0.1 に達した時間で表わした。

③ 臨床検体：HSV-1 を分離した 30 名の患者から計 108 検体を採取した。そのうち 77 検体は培養陽性であった。HSV-2 を分離した 24 名の患者から計 325 検体を採取した。そのうち 58 検体が培養陽性であった。

④ 結果：

i) 検出効率：計 433 検体のうち培養陽性が 135 検体あったが、このうちの 119 検体(88.1%)が LAMP 法で陽性となった。一方、培養法陰性 298 検体のうち 287 検体(96.3%)が陰性となった。

【臨床検体における培養法との比較】

		LAMP法		
		+	-	
培養法	+	119	16	135
	-	11	287	298
		130	303	433
				感度 119/135 88.1%
				特異度 287/298 96.3%

ii) 型特異性:培養法により HSV-1 と判定された 25 検体は全て LAMP 法でも HSV-1 と、培養法で HSV-2 と判定された 22 検体は LAMP 法でも HSV-2 と判定され型別判定は 100%一致した。

【LAMP法と培養法の型決定】

		HSV-1 プライマー	HSV-2 プライマー
HSVモノクローナル抗体 による型別	HSV-1	25	0
	HSV-2	0	22

LAMP法のHSV型は全てモノクローナル抗体による型と一致した。

iii) 乖離例の検討:量が少ない場合と子宮頸管の検体における LAMP 法の阻害物質の存在が想定された。偽陽性となった検体の検討から、viable な HSV がなくとも検出可能となること、細菌感染などのコンタミネーションがあっても陽性になるなど培養法よりも LAMP 法の有利な点も明らかとなった。ただ、原因不明に LAMP 法の偽陽性となった症例が 433 例中 1 例あったが頻度が低いし、この場合は HSV-1 と HSV-2 の両方に反応することから非特異反応であることが想定され、さらに DNA 抽出することにより非特異反応であることが判定できるので大きな問題点となることはない。

2. Real-time PCR 法の開発

本邦における HSV-1 と HSV-2 の DNA を検出するためのプライマーがなくこれらを設計しその妥当性について検討した上で臨床検体の検出の精度を検討した。

1) Real-time PCR 法:尾崎らの開発した HSV-1 と HSV-2 のプライマーを用いた(塚越静香 他, 第

47 回日本ウイルス学会発表 2006 年 6 月)。

検体 200 μ l より FUJIFILM 社の自動核酸抽出システムにより DNA を抽出し、1 μ l を real time PCR の検体とした。検出は HSV-1、HSV-2 とともに UL30 領域に設定した型特異的プライマー、プローブ及び Quanti Tect Probe PCR Kit(QIAGEN)を用いて ABI7900HT により行った。

2) Real-time PCR 法による結果

①HSV-1 分離症例:分離陽性 7 検体については型特異的に全例で陽性で、そのコピー数は 467893 から 293 に分布した。分離陰性 100 検体のうち 99 検体は陰性であったが 1 検体が陽性(コピー数 64)となった。

②HSV-2 分離症例:分離陽性 17 検体については型特異的に 15 検体は検出されたが 2 検体は陰性となった。陽性検体のコピー数は 1068900 から 21 に分布した。分離陰性 90 検体のうち 2 検体が陽性となった。

以上より、今回設計したプライマーを用いた real-time PCR 法は臨床検体にも十分用いることができると考えられる。

3. 考察

感度・特異度の良い HSV-DNA 検出法の開発を目的として LAMP 法と real-time PCR 法の開発を行った。

臨床検体を用い gold standard である培養法と LAMP 法を比べたところ、感度 88.1%(119/135)、特異度 96.3%(287/298)と良好な成績を示した。本法は十分臨床に使用可能と考えられる。

偽陰性となるのは、ウイルス量が少ない場合と、子宮頸管の検体における LAMP 法の阻害物質の存在が想定された。

偽陽性となった検体の検討から、viable な HSV がなくとも検出可能となること、細菌感染などのコンタミネーションがあっても陽性になるなど培養法よりも LAMP 法の有利な点も明らかとなった。ただ、原因不明に LAMP 法の偽陽性となった症例が 433 例中 1 例あったが頻度が低いし、この場合は HSV-1 と HSV-2 の両方に反応することから非特異反応であることが想定され、さらに DNA 抽出することにより非特異反応であることが判定できるので大きな問題点となることはないと考えている。

今後の課題として、LAMP 法阻害物質の除去する方法の開発が望まれる。本方法は、性器ヘルペスだけでなく HSV 感染症全てに用いられるので男性の性器ヘルペスやその他の HSV 感染症についても検討することにより更なる応用の拡大も望むことができる。

今回設計した PCR 法のプライマーは本邦でも十分使用できるものと考えられる。

4. 結論

LAMP 法は感度・特異度・迅速性に優れ、臨床検査として用いることができる。装置は簡易で手順も少ないので臨床の場で用いることのできる簡易装置の開発の可能性がある。

V. 発表

1. 原著論文

- 1) Kaneko H, Kawana T, Ishioka K, Ohno S, Aoki K, Suzutani T. Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2. *J Med Virol.* 80(5):883-7;2008.
- 2) 塚越静香, 川名 尚, 西澤美香, 金子久俊, 西

井 修, 鍋谷達夫. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)法による性器ヘルペス迅速診断 *日本性感染症学会誌* 17(1):104-109;2006.

- 3) Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances.

J.Biochem.Biophys.Methods 70:499-501;2007

- 4) 塚越静香, 川名 尚, 佐多徹太郎.

Real time PCR法による性器ヘルペスウイルス遺伝子の検出 *臨床とウイルス* 34(2):S44;2006.

- 5) 川名 尚: 初発性器ヘルペスの感染病態

日本産婦人科学会千葉地方部会誌

1:10-12;2008

- 6) Kaneko H, Kawana T, Ishioka K, Fukushima E, Suzutani T: Discrimination of herpes simplex virus type 2 strains by nucleotide sequence variations.

J Clin Microbiol. 46(2):780-4;2008.

- 7) 川名 尚: 特集 性感染症 III. おもな性感染症 性器ヘルペスウイルス感染

小児科診療 71(8):1311-1317;2008.

- 8) 川名 尚: 性器ヘルペス

日本臨牀 67:143-152,2008.

2. 学会発表

- 1) 塚越静香, 川名 尚, 佐多徹太郎:

Real-time PCR 法による性器ヘルペスウイルス遺伝子の検出

第 47 回日本臨床ウイルス学会

2006 年 6 月 3 日, 東京

- 2) 杉山博子, 吉川哲史, 榎本喜彦, 浅野喜造, 井平 勝, 川名 尚:

性器ヘルペス迅速診断法としての HSV 型特異的

LAMP法の有用性に関する前方視的研究

第47回日本臨床ウイルス学会

2006年6月3日,東京

3) 田中道子、佐多徹太郎、西澤美香、川名 尚 :

「Real-time PCR法による性器感染ヘルペスウイルスの検出:臨床検体への応用」

第48回日本臨床ウイルス学会 2007年6月,富山

4) 西澤美香、川名 尚、大貫裕子、金子久敏俊、
錫谷達夫、西井 修 :

「性器ヘルペス診断のためのLAMP法の基礎的臨床的検討」第20回日本性感染症学会学術大会

2007年12月,東京

5) 川名 尚、大貫裕子、松見泰宇、村田照夫、西井 修.

LAMP法による性器ヘルペスの迅速診断

第60回日本産科婦人科学会総会・学術講演会

2008年4月12日,横浜

6) 川名 尚、西澤美香.

LAMP法による性器ヘルペスの迅速診断とその臨床応用

第49回日本臨床ウイルス学会

2008年6月14日,名古屋

VI. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

総合研究報告書（平成 18-20 年度の結果のまとめ）

厚生労働科学研究

「性感染症に関する特定感染症予防指針の推進に関する研究」

主任研究者 小野寺昭一（東京慈恵会医科大学感染制御部教授）

分担研究報告書

ヒト乳頭腫ウイルスの迅速検出法の開発

分担研究者：本田まりこ（東京慈恵会医科大学皮膚科教授）

研究協力者：松尾光馬（東京慈恵会医科大学皮膚科）

萩原正則（ 同上 ）

佐々木一（ 同上 ）

堀田健人（ 同上 ）

LAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法は、PCR に代わる安価、迅速、簡易な増幅法として栄研化学が独自に開発した遺伝子増幅法であり、従来の PCR と同等以上の増幅効率、感度を実現している。反応は等温で進行し、反応過程で出現する白濁を利用して増幅を検出すると、全工程が数時間以内の 1 ステップで終了する。この方法を用いて尖圭コンジローマの迅速診断を試みた。我々は HPV-6, 11, 16, 18 各々のプライマーを設計し、特異性、感度、PCR 法との比較について検討したところ、尖圭コンジローマ 21 例中、18 例に HPV-6、3 例に HPV-11 を検出し、混合感染はなかった。ポーエン様丘疹症 2 例のうち 1 例において HPV-16 を検出した。real-time PCR の結果に完全に一致した。平均反応時間は約 59 分であった。その他イムノクロマトグラフィーを試みたが、今のところ検出可能にはなっていない。

A. 研究目的

日常診療で、HPV 感染症を迅速に診断できる検査法を確立する。我々は、1 時間以内に判定できる LAMP 法を選択し、HPV 6, 11, 16, 18 感染症の診断することを目的とした。

B. 研究方法

2004 年 1 月から 2005 年 12 月までに当科を受診した外陰部隆起性病変を有する 27 名（男 19 女 8、平均年齢 39.1 歳）を対象とした。病変部

から 3 mm punch biopsy により 2 箇所ずつ組織検体を採取した。1 つはホルマリン固定し病理組織学的診断を行った。もう一方は QIAamp DNA Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) を使用して DNA 抽出を行った。

●コントロール DNA の準備：

HPV-1a, 2, 3, 5, 6, 10a, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 及び 58 の計 13 個の HPV-DNA を pBR322 で増幅。plasmid は QIAlep Spin Miniplep Kit (Qiagen, Chatsworth, CA) を使用して DNA 抽出

を行った.

● PCR :

Yoshikawa らによる L1 領域の consensus primer

L1C1 (5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTT-3')

L1C2 (5'-TACCCTAAATACTCTGTATTG-3')

L1C2M (5'-TACCCTAAATACCCTATATTG-3')

を使用し, Dde I, Rsa I による restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) を施行した.

● real-time PCR :

Tuker らによる E6/7 領域 HPV-6, 11, 16, 18 特異的 primer を使用した. コントロール DNA による検量線を作成した後, 臨床検体のウイルスコピー数を Sequence Detector v1.6 software (PE Applied Biosystems) を用いて解析した.

● LAMP プライマー設計 :

Primer Explorer V software (FUJITSU, Tokyo, JAPAN) を用いて HPV6 : E6 領域, HPV11 : E6 領域, HPV16 : E7 領域, HPV18 : E6 領域に対し primer を設計した.

HPV6E6F3

5' -CACTGCAGAGATTTATTCATATGC- 3'

HPV6E6B3 5' -CGGTTTGTGACACAGGTAG -
3'

HPV6E6FIP 5
-GAAATTCTAGGCAGCAGCGG-CAGCTAAAGGTCTGTTTC
G- 3' (B1-B2c)

HPV6E6BIP 5
-GACACTTTGATTATGCTGGATATGCCACCGAATTAGCAGC
TCTA- 3' (F1c-F2)

HPV11E6F3 5' -GTAAGATGCCTCCACGT -
3'

HPV11E6B3 5' -CTAAGCAACAGGCACAGC -
3'

HPV11E6FIP 5
-CCTGCAAAACACGCCTGAA-GACCAGTTGTGCAAGACG -
3' (B1-B2c)

HPV11E6BIP 5
-ACTGACCACCGCAGAGATAT-AAGGGAAAGTTGTCTCGC -
3' (F1c-F2)

HPV16E7F3 5' -CAGAGACAACCTGATCTCTACTG
- 3'

HPV16E7B3 5' -GGCACACAATTCCTAGTGT -
3'

HPV16E7FIP 5
-GTAATGGGCTCTGTCCGGTTC-AGCTCAGAGGAGGAGGAT
- 3' (B1-B2c)

HPV16E7BIP 5
-TGCAAGTGTGACTCTACGCTT-GCCCATTAACAGGTCTTC
G - 3' (F1c-F2)

HPV18E6F3

5' -AAAACTAACTAACTGGGTTA - 3'

HPV18E6B3 5' -ACTTGTGTTTCTCTGCGT -
3'

HPV18E6FIP 5
-AGGTGTCTAAGTTTTTCTGCTGG-TTTATTAATAAGGTGC
CTGCG - 3' (B1-B2c)

HPV18E6BIP 5
-CGACGATTTCAACATAGCTGG-GTTGGAGTCGTTCTCTG
TC - 3' (F1c-F2)

● LAMP プロトコール :

Mixture (全量 20 μl)

2×Reaction mix (Loopamp DNA 増幅試薬キ
ット : 栄研)

40 pmol FIP, BIP

5 pmol F3, B3

8U Bst polymerase

DW + Sample 5 μl

↓
63°C, 120分
↓

増幅 DNA 検出方法

- 1) アガロースゲル電気泳動法による確認
- 2) リアルタイム濁度測定装置 LA-200 (TERAMECS)による濁度測定

C. 研究結果

特異性

設定した HPV LAMP プライマーの特異性を検索するために、13種の HPV 型の DNA に対して反応性を調べたところ、HPV6 プライマーは HPV6DNA と、HPV11 プライマーは HPV11DNA と、HPV16 プライマーは HPV16DNA と、HPV18 プライマーは HPV18DNA のみに反応し、他の型は増幅しなかった。電気泳動でラダーパターンを取った。(図1)

感受性

おのおのの LAMP プライマーの検出感度は、それぞれ 100 コピー/チューブであった。LAMP 反応時間と real-time PCR ウイルス量の関係: LAMP 反応時間とウイルス量は相関関係がみられた

臨床検体検討

尖圭コンジローマ 21 例中、18 例に HPV-6、3 例に HPV-11 を検出し、混合感染はなかった。ポーエン様丘疹症 2 例のうち 1 例において HPV-16 を検出した。real-time PCR の結果に完全に一致した。平均反応時間は約 59 分であった(表1)。

D. 考察

E6/7 領域にプライマーを設定し、LAMP 法による HPV-6, 11, 16, 18 特異的 DNA 増幅法を確立できた。基礎検討にて特異性、感度を確認した後、臨床検体として外陰部隆起性病変の組織検体を対象に検討したが、LAMP 法

は PCR, real-time PCR とほぼ同等の高い感度で増幅することができた。交差性はなく、臨床検体の解析においても信頼性が高いことが確認された。

平均検出時間は 59 分 9 秒で、検出時間とウイルス量は線形関係にあり、定量的付加価値を有すると言える。LA-200 による濁度測定によっても臨床検体の解析で十分な感度が確認された。アガロースゲル電気泳動の省略は、検査の簡略化、迅速化の面で有用と思われる。

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

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hagiwara M, Sasaki H, Matsuo K, Honda M, Kawase M, Nakagawa H: Loop-mediated isothermal amplification method for detection of human papillomavirus type 6, 11, 16, and 18. *J Med Virol*:79(5):605-15, 2007.
- 2) 本田まりこ: 皮膚感染症。岡部信彦編 小児感染症学。診断と治療社、東京 104-9, 2007
- 3) 本田まりこ: 単純疱疹、帯状疱疹。太田 健、奈良信雄編、今日の診断基準。南江堂、東京、843-6, 2007
- 4) 本田まりこ: 性器ヘルペスの診断・治療: 新しい展開。泌尿器外科、20(臨増)471-2, 2007
- 5) 本田まりこ: 再発性ヘルペスの再発抑制療法。宮地良樹編、WHAT'S NEW in 皮膚科学