

(ii) 腔トリコモナス症(*Trichomonas vaginalis* infection)

鞭毛を有する腔トリコモナス原虫(*Trichomonas vaginalis*, TV)による感染症で、性行為により感染することが多い。その他の感染経路(下着、タオル、検診台、浴槽)も知られている。年齢分布は20~60代まで幅広くみられる。感染のリスクとして性的活動だけでなく腔の自浄作用の低下もある。TVは腔内のグリコーゲンを消費し、その結果乳酸桿菌の減少、乳酸の減少、pHの上昇を招き、腔の生態系が破壊され、他の細菌、例えば臭いの原因となる嫌気性菌や大腸菌、球菌の増殖を来す。60%に細菌性腔症がみられるという。

典型的な症状は、多量の泡状で悪臭の強い黄緑色の膿状帯下とそれに伴う外陰の掻痒感である。TVの量が多いと腔に斑状の発赤がみられ、コルポスコープで観察すると子宮腔部が莓状にみえることがある。腔のpHは5.0以上である。診断は腔分泌物のwet mountによる鏡検で活発に動くトリコモナスを検出して行う。TVが証明できないが疑わしい時は腔トリコモナス培地による培養が有用である。腔トリコモナス症を合併している妊婦ではPROMのリスクが高くなるといわれている。治療にはTVは腔内だけでなく尿路への感染の可能性もあるのでメトロニダゾール500mg/日、分2、10日間の経口投与が用いられる。外国ではメトロニダゾール1.5g~2.0g単回投与も行われている。治療の判定は、次回月経後にTVの消失を確認して行う。パートナーも同時に同様な方法で治療することが大切である。本剤の投与中、飲酒によりアスタピユース様作用が現れることがあるので投与中~投与3日後までは禁酒させる。本剤は胎盤通過性があるので妊婦には経口剤を避け腔錠を用いる。

(iii) 性器カンジダ症(*Genital candidiasis*)

性器のカンジダ症は多くの女性が一度は経験する頻度の高い疾患である。外陰の掻痒感を主訴として来院することが多く、外陰炎と腔炎は合併することが多く外陰腔カンジダ症(*Vulvovaginal candidiasis*)と呼ばれることが多い。症状は外陰の掻痒感や灼熱感と帯下である。典型的な帯下は酒粕状であるが漿液性や濃厚な場合もある。腔前庭や大小陰唇の発赤がみられ、腔壁には斑状に白色帯下が付着することが多い。子宮腔部は正常である。腔内容物は白色で酒粕状、粥状、ヨーグルト状である。pHは4.5以下の正常範囲である。診断は腔分泌物を生食または10%苛性カリを用いて検鏡して仮性菌糸や分芽胞子を証明することにより行うが証明されなくても疑わしい場合は培養を行う。一般には連日通院を原則として腔洗浄後にイミダゾール系抗真菌薬を含有する腔錠(100mg/錠、1日1錠)を6日間投与する。通院困難な例では腔洗浄後、週1回含有量の多い腔錠の投与を行う。同時にイミダゾール系抗真菌薬を含有する軟膏やクリームを外陰に塗布する。症状の消失をもって治療とする。年間4回以上再発を繰り返す例では、抗生物質の投与の有無、糖尿病の有無など腔の環境を変化させる要因を検索すると共に自己の腸管からのカンジダ感染や性交パートナーからの性的感染についても検討する。(外陰の症状を主とする疾患の項を参照されたい)。

(iv) 細菌性腔炎(*Bacterial vaginitis*)

連鎖球菌、ブドウ球菌、大腸菌などが増殖し乳酸桿菌を主体とする腔の生態系を破壊し炎症を起こした状態で性成熟女性にみられる。本疾患では多量の膿性帯下やそれに伴った腔の灼熱感がある。腔内には多量の膿性の分泌物があり、腔壁は発赤することもある。pHは5以上で乳酸桿菌はみられない。後述する萎縮性腔炎はエストロゲン効果が乏しいため基底細胞が優位であるが、本疾患では表層細胞が優位である。細菌性腔症との相異は本疾患では炎症性変化が強く白血球増多がみられる点である。多量の膿性帯下はしばしば子宮頸部の淋菌やクラミジア・トラコマチスの感染でもみられるのでこれらを除外する。治療は腔洗浄後、抗生物質含有の腔錠を7~10日間用いる。

(v) 萎縮性腔炎(Atrophic vaginitis)

萎縮性腔炎は、エストロゲン欠乏に基づく腔上皮の炎症性変化である。エストロゲンの欠乏と共に腔壁は菲薄になりグリコーゲン量も減少する。その結果乳酸の産生が減少し腔のpHが上昇する。この結果大腸菌などが増殖し乳酸桿菌が消失する。多くの場合は性交が契機となる。症状としては少量の不正出血、腔入口の灼熱感、性交痛などである。腔壁は薄く時に出血斑を認める。腔内容は少量のことが多くその性状は血性、漿液性、膿性である。検鏡すると多数の白血球と傍基底細胞がみられ、乳酸桿菌の代わりにグラム陰性の桿菌がみられる。

萎縮性腔炎は、高齢者だけでなく産褥婦やエストロゲンを抑える薬剤の使用者や両側卵巢摘除例にもみられる。治療はエストロゲン含有腔錠や経口剤抗生物質含有腔錠の投与を2週間行う。

### まとめ

帯下を主訴とする腔炎の特徴について Monif の Textbook を中心に他の論文を参考にしつつ改変したものを示した(表 E-7-1)-1)。

#### 《参考文献》

1. 性感染症 診断・治療ガイドライン2006. 日本性感染症学会誌 2006; 17巻
2. Monif GRG, Baker DA. Infectious diseases in Obstetrics and Gynecology. Parthenon publishing, 2004.
3. Curtis MG, Overholt S, Hopkins MP. Glass' office Gynecology 6ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2006
4. Berek & Novak's. Gynecology 14ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

〈川名 尚\*〉

---

\*Takashi KAWANA

\*Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University School of Medicine University Hospital, Mizonokuchi, Kanagawa

Key words : Vulvar infection · Vaginal infection · Pathogenesis · Diagnosis · Treatment

索引語 : 外陰の感染症, 腔の感染症, 病態, 診断, 治療

---

主な性感染症の病因, 病態, 診断, 治療

## 性器ヘルペス

川名 尚

Genital herpes

Takashi Kawana

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Teikyo University Faculty of Medicine, Mizonokuchi Hospital

### Abstract

Genital herpes (GH) is the second leading cause of sexual transmitted disease in women and the third in men. About 40 % of female genital herpes is caused by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and the remaining by type-2 (HSV-2). Fifty four percent of primary female GH was caused by type-1, whereas 86 % of recurrent cases by type-2. For rapid diagnosis of GH, LAMP (loop-mediated isothermal amplification), HSV DNA nuclear amplification method developed in Japan, was applied and favorable results were obtained. We compared three gG based type specific antibody kits (Platteria, HerpeSelect and Captia). Among these, Platteria was shown to be most sensitive and specific.

**Key words:** genital herpes, herpes simplex virus type 1 and 2, LAMP, type specific antibody kit

### 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) の感染によって発症する代表的なウイルス性性感染症である。性感染症の中で女性では性器クラミジア感染症に次いで第2位に、男性では淋菌感染症に次いで第3位に位置する重要な疾患である。

HSVは、感染後知覚神経節に潜伏感染し時々再活性化して再び皮膚粘膜に出現し、これが感染源となって感染が広まっていく。潜伏感染しているHSVを排除できる薬剤はなく、しかも恐らく潜伏感染は一生続くと考えられている。

このような独特な感染病理のため、性器ヘルペスはしばしば再発することが特徴的であり、繰り返す再発によって心身の大きなストレスになることが多い。現在いかに再発を制御するかが性器ヘルペスにおける最大の課題であり、このために開発された継続的に抗HSV薬を服用する再発抑制療法は、頻繁に再発を繰り返す性器ヘルペス患者には福音となった。

### 1. 性器ヘルペスの疫学

性器クラミジア感染症や淋菌感染症のような抗生物質が有効な性感染症が2002年をピークに減少傾向に転じたのに対し、性器ヘルペスは若い女性を中心に増加の傾向にある(図1)。男

帝京大学医学部附属溝口病院 産婦人科

0047-1852/09/¥40/頁/JCLS

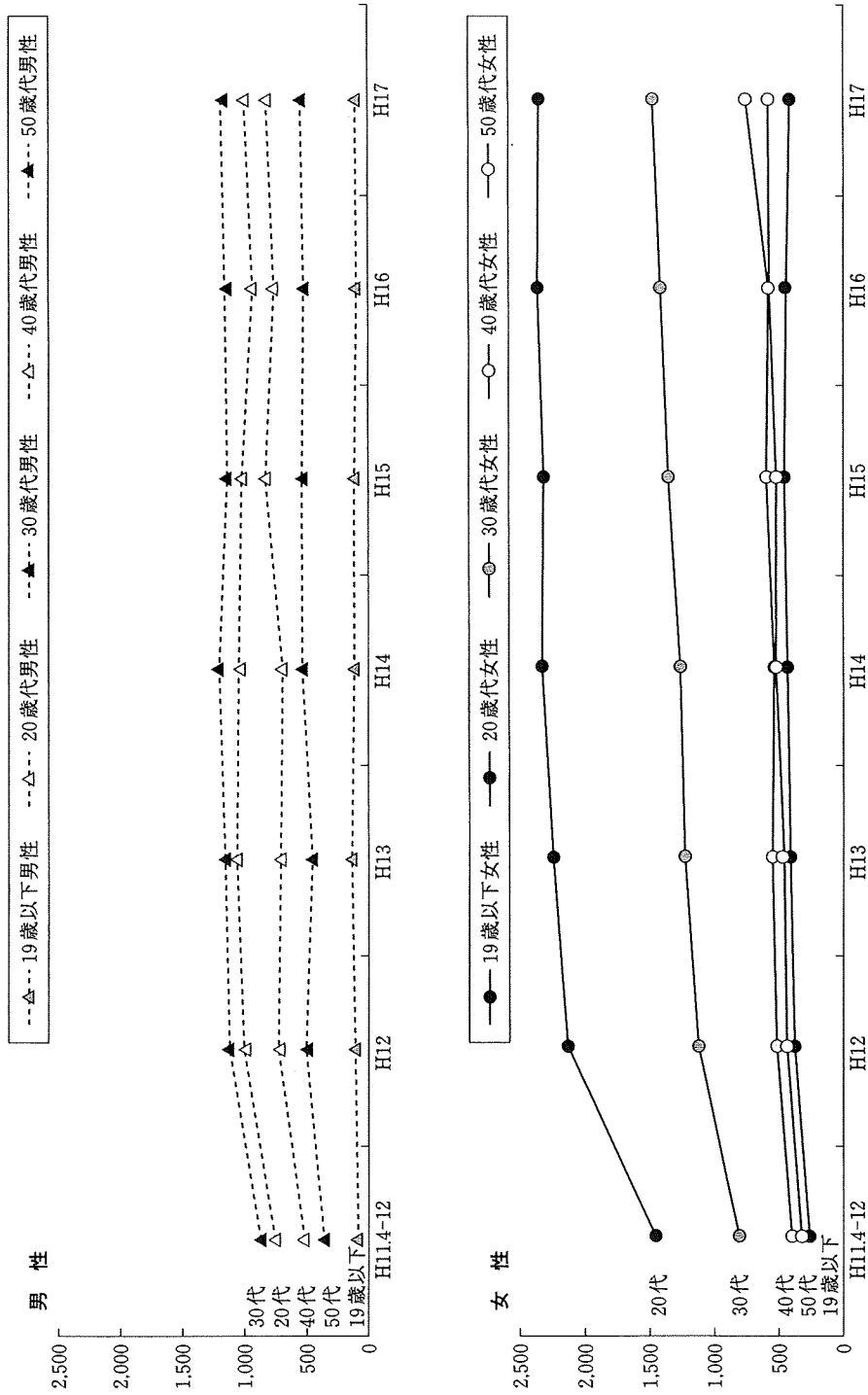


図1 年齢別にみた性器ヘルペスウイルス感染症報告数の年次推移  
 (厚生労働省, 感染症発生動向調査)

性より女性の方が約2倍多い。この増加傾向には次のような要因が関係している。まず前述のとおり、HSVはヒトに感染すると比較的速やかに知覚神経を上行し知覚神経節に潜伏感染する。潜伏感染しているHSVは、しばしば再活性化されて知覚神経を下行して皮膚・粘膜に現れ、ここで増殖して主に水疱性・潰瘍性病変を形成する。皮膚・粘膜に出現しても必ずしも発症することではなく、無症候でHSVを排泄することも多い。潜伏感染しているHSVは、宿主の免疫によって排除されることはないので一生続くことになる。こうして生涯にわたり感染源となる。この点が他の性感染症と大きく異なる点である。

次の要因は、一般人口におけるHSVに対する抗体保有率がこの30年間で激減していることである。20歳代の抗体保有率は1970年代では80%強であったが、この10年間では50%を下回っている。HSVは接触感染が主な感染様式であるが、成人してからヒトとヒトが濃厚に接触するのは性的接触による場合が多いので、抗体(免疫)のない成人がHSVに感染しているヒトと性的接触すれば感染することになる。抗体のない成人が増えているので、性的活動が活発になれば性器のHSV感染例も増えることになる。

最も重要な点は、HSV感染を完治させる方法がなく、しかし再発を繰り返すのであるから性器ヘルペスの症例は減ることはなく常に蓄積されることである。

我が国における性器ヘルペスは年間7万例程度と推計されているが、無症候のものを入れると20万例以上になると著者は考えている。

なお、厚生労働省の感染症発生動向調査によると、性器ヘルペスは2006年以降次第に減少傾向にあるが、これは2006年より性器ヘルペスについては初発のみを登録し再発は登録しないことになったためであり、決して性器ヘルペスが減少しているのではない。

## 2. 臨床症状

臨床的には性器ヘルペスは初めて発症する初発と繰り返し発症する再発に分類されている。



図2 HSV-1による初感染例

初発は、更に初感染初発と非初感染初発に分けられる。前者は初めての感染によって、後者は既に無症候で感染していたHSVの再活性化によって初めて発症する場合をいう。

### a. 初 発

#### 1) 初感染初発

感染の機会があってから平均3-5日(2-21日)の潜伏期の後に発症することが多い。女性では比較的突然に外陰部に浅い潰瘍や水疱が出現する。病変の数は数個から無数のものまでである(図2)。両側のソケイ部のリンパ節の腫脹圧痛はほぼ必発である。約6-7割に発熱、全身倦怠感などの全身症状を伴う。男性では亀頭や陰茎にかけてかゆみや違和感を伴った直径1-2mmの複数の水疱が出現し、第3-5病日から水疱が破れて融合し、円形の有痛性の浅い潰瘍となり1週間前後に最も重症化する。その間ソケイ部のリンパ節の腫脹や尿道分泌物もみられる。

オーラルセックスが一般的に行われるようになったため口腔咽頭の感染もみられる一方で、口唇ヘルペスが感染源となることもしばしばみられている。髄膜刺激症状のため頭痛や項部硬直、時に羞明感を訴える。また、Elsberg 症候群として知られている仙骨神経根神経障害を併発し、排尿排便困難となり、時に尿閉に至ることもある。髄膜刺激症状や Elsberg 症候群は明らかに 1 型感染例より 2 型感染例に多く、性器における 2 型の向神経性がうかがわれる。初感染初発では発症時に HSV 抗体が陰性で 2-3 週後に陽転する。無治療でも約 2-3 週間で自然治癒するが、抗 HSV 薬を投与すると約 1 週間でかなり軽快する。

## 2) 非初感染初発

発症は初めてであるが、無症候のうちに既に知覚神経節に感染していた HSV が再活性化され発症したものである。したがって、発症時に既に HSV 抗体 (IgG 抗体) が陽性である。症状は前述の初感染と同様であるが、病変の数はより少なくソケイリンパ節の腫脹の頻度も少ない。発熱などの全身所見はみられず治癒までの期間も短く、全体としてより軽症であることが多い。

著者の経験した初発例のうち HSV-1 による場合は約 20% が、HSV-2 による場合は約 40% が非初感染初発であった。

### b. 再 発

以前に発症したことのある例が再び発症した場合を再発としている。知覚神経節に潜伏感染している HSV の再活性化によって発症する。大体同じ部位に再発することが多いが、時に別の部位や臀部に発症することもある。病変は小さい水疱や潰瘍性病変が 1-数個出現する (図 3)。発熱することもなくソケイリンパ節が腫脹することは少ない。多くは 1 週間以内に自然治癒する。男性でも再発時には初感染とはほぼ同じ部位にまたは臀部や大腿部に水疱性あるいは浅い潰瘍性病変を形成するが、症状は軽く 1 週間程度で治る。再発する前に大腿後面に神経痛様の疼痛があったり、再発する局所に違和感を感じるなどの前兆が約 30-50% の患者にみられる。再発の頻度は HSV-2 感染例の方が HSV-

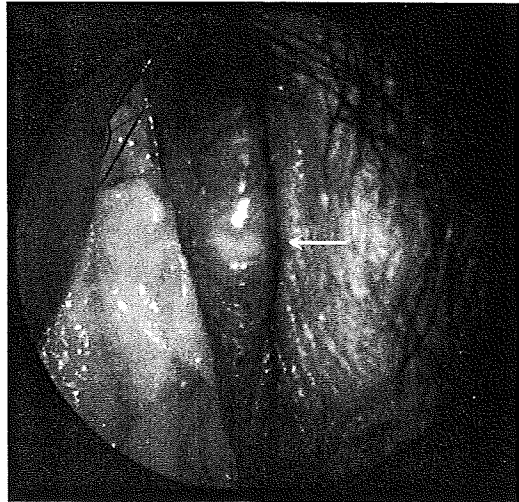


図 3 HSV-2 による再発性器ヘルペス

1 感染例よりもはるかに多い。再発回数は時とともに次第に減少する例のある一方で、あまり変わらないものや逆に増えるものなどのあることが知られている。再発の契機となるのは、心身の疲労、風邪などの発熱、女性では月経などが多く、これらのことが全身や局所の免疫能の低下をもたらすからではないかと考えている。

再発を繰り返す患者にとっては、肉体的ばかりでなく精神的にも大きなストレスとなり QOL (quality of life) を著しく損ねることになる<sup>1)</sup>。このような観点から、抗 HSV 薬を継続的に服用し再発を抑制する「再発抑制療法」が開発され、本療法は我が国でも保険で可能になった。

### c. 多彩な臨床症状

HSV の独特な感染病理によって性器ヘルペスの臨床症状は多彩となる。むしろ典型的な症例は少ないといわれている。その諸相を表 1 に示した。

外陰に病変がある場合の典型的な例は前述した。非典型的な例としてはうっかりすると見逃しやすいピンホールの極く小さい病変、片側に発症するもの、潰瘍の形が円形でなく線状のもの、浅い潰瘍でなく深いものなどがある。診断に困るのは外陰に病変のない場合である。しばしば肛門に潰瘍性病変が、臀部に水疱性病変がみられることがある。女性では外陰に病

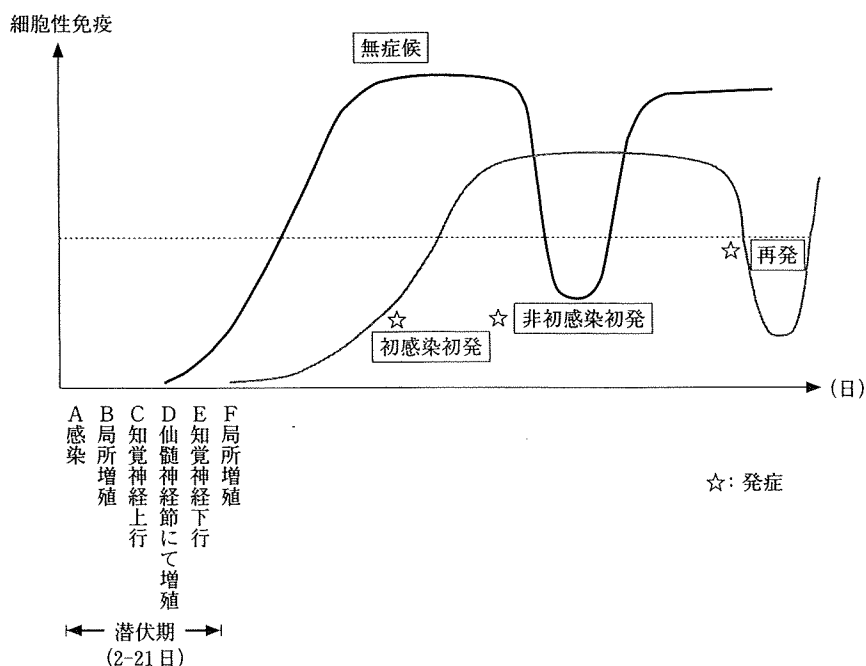


図4 経時的にみた性器ヘルペスの感染病理

表1 性器の単純ヘルペスウイルス感染のスペクトラム

1. 外陰の病変のあるもの	1) 典型例	浅い潰瘍, 円形, 多発・対称性
	2) 非典型例	a) ピンホール      b) 片側・多発 c) 線状                  d) 深い潰瘍
2. 外陰に病変のないもの	1) 肛門	
	2) 臀部	
	3) 子宮頸管炎	
	4) 尿道炎	
	5) Elsberg 症候群	
	6) 再発性髄膜炎 (Mollaret)	
	7) 外陰痛	
	8) 全身症状 (性器ヘルペス症候群)	
3. 無症候性 HSV 排泄	1) HSV-2 抗体陽性者	
	2) HSV-1 抗体陽性者の一部	

変がなく子宮頸部に病変がみられることがある。尿道炎という形をとることもある。末梢神経障害としての排尿障害や大腿後部の神経痛や違和感など、神経障害が唯一の症状のこともある。

再発性の髄膜炎もみられる。

無症候性に HSV が排泄されることも多いようである。HSV-2 抗体陽性者の多くは後述のように HSV-2 を性器に排出している。まれではあるが、上半身に再発型病変を呈することもあり全身性の疾患となることもある。Obara らは HSV-2 が頸、胸、腰、仙髄の神経節に広く検出されると報告しているが、この全身的な広がりを説明するものであろう<sup>2)</sup>。以上のように性器ヘルペスは広いスペクトラムをもっている。

### 3. 感染病理

#### a. 経時的にみた性器ヘルペスの感染病理 (図4)

著者は HSV の感染から発症までの経時的な流れを次のように考えている。皮膚や粘膜の微小な傷から HSV に感染すると、まず局所で増殖する。間もなく知覚神経末端に入り知覚神経を上行して知覚神経節 (仙髄神経節) にて増殖するとともに潜伏感染する。これが再活性化され再び知覚神経を下行してその支配領域の皮膚・

表 2 HSV の分離部位と型

		1 型	2 型	合計
性 器	女性	233(40.9%)	336(59.1%)	569(100%)
	男性	1(7.1%)	13(92.9%)	14(100%)
	合計	234(40.1%)	349(59.9%)	583(100%)
非性器	口唇	24	0	24
	顔	3	1	4
	眼	5	0	5
	上半身皮膚	2	0	2
	合計	34(94.7%)	1(2.6%)	35(100%)

粘膜, 時に子宮頸管に出現する. この際, 宿主の自然免疫能の強い場合や免疫が速やかに産生されていると症状は出ないで無症候に終わるが, 免疫のできていない宿主では HSV が増殖し発症することになる(初感染初発). 無症候ですんだ宿主も免疫の低下が起こると発症する(非初感染初発). その後宿主の免疫の低下に伴って再発を繰り返す. 後述するように 2 型感染例は 1 型感染例より再発しやすいが, これは免疫反応の起こり方や免疫反応からの逃避の能力の違いによるものではないかと考えている.

#### b. HSV の型と臨床型

HSV には抗原的に一部異なる 1 型と 2 型の 2 つの型がある. 1 型と 2 型では培養細胞での増殖能の違いなど, 生物学的な違いがある. 最も興味深いことはヒトにおけるその自然感染部位の違いで, 米国からの報告では 1 型は眼, 口, 脳など上半身に, 2 型は性器などの下半身に感染するという棲み分けが行われているというものであった<sup>3)</sup>. 著者も我が国で同じ検討を行ったところ米国と少し違うことがわかった. 眼, 口, 顔などの上半身から分離した株はほとんどすべて 1 型であったが, 女性性器から分離した株は 1 型が 40%, 2 型が 60% という結果になった(表 2). このデータから, 我が国では女性の性器ヘルペスは 1 型によることもかなりあることがわかったが, 1 型は口に由来する可能性が高いことから, オーラルセックスあるいは唾液を介して感染した可能性が高いと考えられる. 実は, 性器ヘルペスは 2 型の感染によって起き

表 3 臨床分類と HSV の型

	1 型	2 型	合計
初発	296(54.3%)	249(45.7%)	545(100%)
再発	35(13.7%)	220(86.3%)	255(100%)
合計	331(41.4%)	469(58.6%)	800(100%)

るといわれていた米国では, 最近 1 型による性器ヘルペスが激増していると報告されている<sup>4)</sup>. その理由の一つに, エイズを恐れるあまりオーラルセックスがより一層頻繁に行われるようになったことがあげられている. 一方, 見方を変えると 2 型はほとんど性器からしか分離されていないので, 2 型は性器に親和性が高く性器と性器の接触により感染すると考えられる.

表 3 は, 著者の経験した 800 例の女性性器ヘルペス患者について, その臨床型と分離した HSV の型との関係をみたものである. 全体としては 1 型が 41.4%, 2 型が 58.6% であり, 我が国の女性性器ヘルペスからはかなりの頻度で 1 型が分離されることが判明した.

臨床型との関係をみると初発 545 例のうち 296 例(54.3%)が 1 型であり, 249 例(45.7%)が 2 型であった. 初発では 2 型よりむしろ 1 型の方が多かった. 一方, 再発 255 例についてみると 2 型が 86.3% であり大部分は 2 型によって発症している.

すなわち, 女性性器に関しては 1 型と 2 型が感染するが 1 型より 2 型の方が潜伏感染しやす



表4 性器ヘルペスの感染病態

臨床分類	発症時の血清抗体			感染 HSV	感染病態	型別でない HSV 抗体に よる分類
	型別でない HSV 抗体	型別抗体による				
		HSV-1 抗体	HSV-2 抗体			
初発	-	-	-	HSV-1	HSV-1 初感染	初感染
	-	-	-	HSV-2	HSV-2 初感染	
	+	+	-	HSV-1	HSV-1 非初感染初発	非初感染
	+	-	+	HSV-2	HSV-2 非初感染初発	
	+	+	-	HSV-2	HSV-2 初感染	
	+	+	+	HSV-2	HSV-2 非初感染初発	
再発	+	+	-	HSV-1	HSV-1 の再発	再発
	+	-	+	HSV-2	HSV-2 の再発	再発
	+	+	+	HSV-2		

く、また再活性化されやすいことを意味している。このことは男性についても同じで、男性の再発型でもほとんどが2型の感染である。

このように性器ヘルペスには1型と2型の感染があり、初感染と再活性化があるのでこれらの組み合わせを感染している HSV の型と発症時の型特異的抗体の検出で整理すると表4のように9種類になる。この感染病態を決定するには、感染している HSV の型と型特異的抗体の測定が必須である。

#### c. 無症候性ウイルス排泄者

HSV に感染してもその70%は無症候であるといわれている。しかし、このような症状のなかった人でも HSV を性器に排泄することがわかっている。Waldらは血清抗体を調べることによって2型に感染していることがわかっているが性器の症状の全くない男女53人について94日間毎日性器から検体をとって調べたところ、なんとその70%強の人に HSV が排泄されていて、その頻度は月に1度くらいであったというのである<sup>5)</sup>。この研究では、性器ヘルペスの症状のある例でも調べているが、こちらの方はやや頻度は高いもののそれほどの差はみられていない。HSV の排泄の頻度は月に1度程度ではあるが、HSV に免疫のない人がこういうときに運悪く性的接触があると感染することになる。ただ、ウイルスの排泄の頻度がこの程度なので

性器ヘルペスの症例が爆発的に増えることはない。

#### 4. 性器ヘルペスの診断

性器ヘルペスの症状は多彩であるため性器ヘルペスであるのに他の疾患と誤ったり、逆に性器ヘルペスでない疾患を性器ヘルペスとしてしまうことがしばしばみられる。したがって、臨床検査により診断を確立する必要がある。

性器ヘルペスでは血清診断は難しく病原診断が必須である。現在保険で行うことのできる蛍光抗体法による病原検出検査は、性器ヘルペスのような病変が小さい場合は非常に感度が悪い。

最近、遺伝子増幅法である PCR 法や LAMP 法(loop-mediated isothermal amplification)が開発されている。田中らは、新たに設計したプライマーを用いた real-time PCR 法を開発した<sup>6)</sup>。著者らは我が国で開発された遺伝子増幅法である LAMP 法を性器ヘルペスの診断に応用している。LAMP 法は PCR 法と違って等温で反応が進むので器械は簡単な構造でよく、感度・特異度は PCR 法に劣らず、しかも臨床の現場で使える可能性がある。現在までの結果は良好で将来性が期待できる<sup>7)</sup>。次に型特異的抗体を測定するには、HSV の表面にあるグリコプロテインの G(gG) を抗原として用いるキットによらなければならない。1型と2型には共通抗原がある

が、gGには1型と2型で抗原性の違いがあるからである。現在我が国で広く用いられているHSV抗体測定キットは1型抗体も2型抗体も検出してしまふので、型特異的抗体測定には用いられない。世界的に市販されている型特異的抗体キットであるHerpeSelect、Captia、Platteriaについて著者らはその精度について検討してきた。いずれもIgG抗体を測定するキットである。2型抗体についてはPlatteriaの感度がやや良かった。一方、1型抗体についてはPlatteria>HerpeSelect>Captiaの順で感度が良かった<sup>8)</sup>。

現在は保険適用はないが、型特異的な診断が保険で行えるようになることを切に希望している。

## 5. 性器ヘルペスの治療

治療の原理は、抗単純ヘルペスウイルス剤(抗HSV剤)によってHSVの増殖を抑え宿主の免疫力により治癒に導くことである。

HSVは感染すると速やかに仙髄神経節に潜伏感染してしまっていて、現在用いられている抗HSV剤はこれを排除することができない。したがって抗HSV剤で一応治療しても多くの場合、特に2型では再発することは免れない。現在、我が国で用いられている抗HSV剤はアシクロビル(ゾビラックスなど)、バラシクロビル(バルトレックス)で、これらは経口投与が可能である。ビダラビン(アラセナAなど)は軟膏として用いられている。

### a. 初発性器ヘルペス

バラシクロビル500mg/錠を1日2回投与するか、アシクロビル200mg/錠を1日5回投与する。投与日数であるが通常5-7日間程度で症状はかなり改善されるが、完治しないときは更に延長する。著者は外陰の症状が改善されても、特に初感染の場合は7-10日間は服用した方がよいと考えている。その理由は、仙髄神経節でのHSVの増殖を極力抑えておくことが将来の再発の頻度を減らすのに役立つ可能性があるからであり、米国のCDCのガイドラインでも7-10日間の投与を勧めている<sup>9)</sup>。治療は抗HSV剤の全身投与で十分であり、一般的には局所の抗

HSV剤軟膏塗布は不要である。

### b. 再発性器ヘルペス

#### 1) 発症時治療

再発は症状も軽く病変も小さいので投与日数は短くてよい。バラシクロビル500mg/錠を1日2回かアシクロビル200mg/錠を1日5回服用する。再発したらなるべく早く服用することが望ましく、24時間以内に開始することが勧められる。24時間以内に受診することが難しい場合も多いので、あらかじめ薬を渡しておくことも行われる。投与期間は3-5日間程度でよいことが多い。

再発する前に大腿後面の神経痛様の疼痛や外陰部の違和感などの前兆を感じる患者においては、前兆のあったときに服用すると発症しないですむことが多い。

また、病変が小さく症状もごく軽い再発の場合はビダラビンやアシクロビルの軟膏の塗布でもよい。

#### 2) 再発抑制療法

頻繁に再発を繰り返す患者は、再発時の身体的な障害だけではなくいつ再発するのかわからないという不安、性的パートナーや家族などへの感染に対する不安など精神的な負担も大きくQOLが損なわれている。これに対してアシクロビル、バラシクロビルなどの抗ウイルス剤を毎日服用する再発抑制療法が開発された<sup>10)</sup>。2006年9月より我が国でもバラシクロビル錠(500mg)1錠を1日1回服用による本療法が保険適用となった。本療法は、再発するまでの期間を有意に延長させ、また再発しても症状が軽くなることだけでなく性的パートナーへの感染率を有意に減少させることが証明されている。保険で行う場合は、おおむね年6回以上再発する患者が対象となる本療法は、患者のQOLの改善が目的であるので治療の目標を患者とよく話し合う。服用期間は取りあえず1年間を目標とする。長期に服用するので副作用が心配されるが、時に胃腸障害、頭痛を訴える例はあるものの本療法による特有な有害事象は知られていない。本薬剤による胎児毒性は低くFDAの薬剤胎児危険度はBランクに分類されているが、

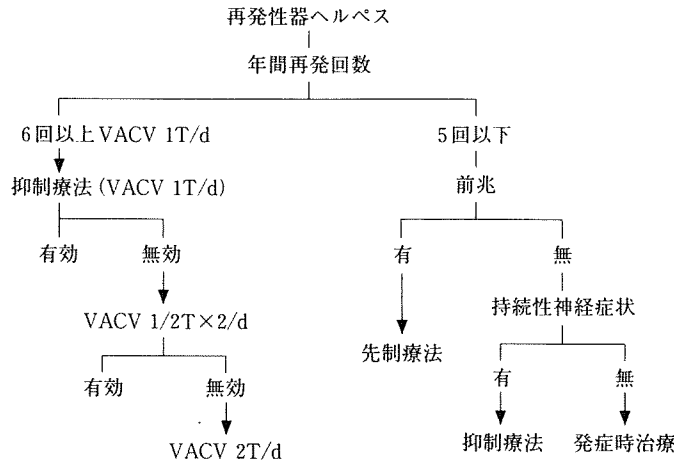


図5 再発性器ヘルペスの治療法の選択(川名)

抑制療法中に妊娠した場合は服薬を中止することになっている。現在まで抑制療法中に妊娠・分娩した例に異常児は生まれていない。長期に服用するため本剤に耐性ウイルスの出現が危惧されるが、実際はそのようなことはない。

著者の再発性器ヘルペスの治療法の選択を図5に示した。まず年間の再発回数が6回以上で患者の希望があれば抑制療法を行う。バラシクロビル(VACV)1錠1日1回の服用で始める。この方法で服用中に再発してしまう場合は1/2錠を1日2回にすると、血中濃度の日内変動の差が小さくなるので再発しなくなる例が多いようである。年間再発回数が5回以下の場合は発症時治療が原則であるが、持続性に坐骨神経痛症状を訴える場合などは抑制療法の適応があると考えている。再発抑制療法に対しては患者ごとにその姿勢が異なる。発症時の症状が非常に軽いときは既婚者で中年の女性は抑制療法を必ずしも希望しないが、未婚者で新しい恋人がで

きたような女性ではパートナーへの感染を恐れてその希望は強い。抑制療法を1年間行った後の再発の頻度がどうなるかは、患者にとって大きな関心事である。抑制療法後に再発回数が減少したという報告もある一方、不変であったとの報告もある。確かに再活性化されたHSVの増殖を抑えておけば知覚神経節におけるHSVの量は次第に減少していく可能性はあるので、中止した後の再発回数は減少することもあり得る。この点は今後の大きな課題と考えている。

おわりに

性器ヘルペスの制御には抑制療法によりHSVの排泄を抑えること、型特異的抗体の測定によりパートナーにHSV-2感染のあることを知らせること、そして、コンドーム推奨が重要であるとの提言がある<sup>14)</sup>。

性器ヘルペスが若い女性を中心に増加しつつある現在、傾聴すべき提言であろう。

■ 文 献

- 1) Patel R, et al: Impact of suppressive antiviral therapy on the health related quality of life of patients with recurrent genital herpes infection. Sex Transm Infect 75(6): 398-402, 1999.
- 2) Obara Y, et al: Distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 genomes in human spinal ganglia studied by PCR and in situ hybridization. J Med Virol 52(2): 136-142, 1997.
- 3) Nahmias AJ, et al: Clinical aspects of infection with herpes simplex viruses 1 and 2. In: The Human Herpesviruses: An Interdisciplinary Perspective, and Management(ed by Nahmias AJ, et al), p3-9. Elsevier, New York, 1981.

- 4) Roberts CM, et al: Increasing proportion of herpes simplex virus type 1 as a cause of genital herpes infection in college students. *Sex Transm Dis* 30: 797-800, 2003.
- 5) Wald A, et al: Reactivation of genital herpes simplex virus type 2 infection in asymptomatic seropositive persons. *N Engl J Med* 342(12): 844-850, 2000.
- 6) 田中道子ほか: Real-time PCR 法による生殖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 3 日, 富山.
- 7) 塚越静香ほか: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法による生殖器ヘルペス迅速診断. *日性感染症誌* 17(1): 104-109, 2006.
- 8) 西澤美香, 川名 尚: 新しい単純ヘルペスウイルス型特異抗体キット PLATELIA HSV の評価. 第 49 回日本臨床ウイルス学会, 2008 年 6 月 14 日, 名古屋.
- 9) CDC: Sexually transmitted diseases treatment guidelines 2002. *MMWR Recomm Rep* 51(RR-6): 1-78, 2002.
- 10) Leone PA, et al: Valacyclovir for episodic treatment of genital herpes: a shorter 3-day treatment course compared with 5-day treatment. *Clin Infect Dis* 34: 958-962, 2002.
- 11) Hook EW, Leone P: Time to translate new knowledge into practice: a call for a national genital herpes control program. *J Infect Dis* 194(1): 6-7, 2006.

# Serologic and Genotypic Analysis of a Series of Herpes Simplex Virus Type 1 Isolates From Two Patients With Genital Herpes

Kenichi Umene,<sup>1\*</sup> Takashi Kawana,<sup>2</sup> and Yasuyuki Fukumaki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Human Environmental Science, Department of Nutrition & Health Science, Fukuoka Woman's University, Fukuoka, Japan

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Mizonokuchi Hospital, Teikyo University, Kawasaki, Japan

<sup>3</sup>Division of Human Molecular Genetics, Center for Genetic Information, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, Fukuoka, Japan

Herpes simplex virus type 1 (HSV-1) has been reported increasingly as a cause of genital herpes, although HSV-1 is usually associated with orolabial herpes. In the present study, serum specimens and materials for viral isolation were obtained serially from two patients with recrudescing HSV-1 genital infections to study serology and molecular epidemiology. Recurrent episodes, during which HSV-1 was isolated, were followed by an increase in the level of anti-HSV-1 antibody, suggesting a booster effect from re-exposure to viral antigens and the possible usefulness of the variation in the level of anti-HSV-1 antibody to diagnose recurrence. While genotypes of HSV-1 isolates obtained from one patient were different from those from the other patient, genotypes of sequential HSV-1 isolates obtained from the same patient were the same, implying that the recrudescing genital lesions of the two patients could be attributed to endogenous recurrence of a latent virus. Sera from one patient neutralized HSV-1 isolates obtained from the other patient as well as HSV-1 isolates obtained from the same patient. An HSV-1 isolate obtained during a later episode in one patient was neutralized by sera taken before/during the later episode of the same patient, as effectively as an HSV-1 isolate obtained during an earlier episode in the same patient; thus, in these two cases, HSV-1 was assumed to have multiplied during recurrence despite the presence of an anti-HSV-1 antibody that could neutralize experimentally HSV-1. **J. Med. Virol.** 81:1605–1612, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** recurrence; antibody; RFLP; hypervariable region; molecular epidemiology

## INTRODUCTION

Herpes simplex virus (HSV) is a ubiquitous human pathogen that is classified into two serotypes, HSV-1 and HSV-2. HSV-1 is the usual cause of oro-labial herpes, while HSV-2 is usually acquired as a genital infection. Typical HSV infection proceeds through three stages of primary infection, latency, and recurrence; hence, HSV has the ability to reactivate periodically, resulting in a productive infectious virus. Clinical and sub-clinical reactivation of HSV with resultant viral shedding is related with the transmission of HSV; thus, anti-viral therapy is expected to reduce the frequency and degree of viral shedding and to lower the transmission rate [Sacks et al., 2004]. Genital herpes, a disease marked by recurrent ulcerative lesions, is one of the most prevalent sexually transmitted diseases [Geretti, 2006; Gupta et al., 2007]. HSV-2 is the most common cause, but recent reports suggest that an increasing percentage of genital herpes is caused by HSV-1 [Kawana et al., 1982; Sucato et al., 1998; Haddow et al., 2006]. HSV-1 genital infection is less likely to recur than that caused by HSV-2 [Reeves et al., 1981; Lafferty et al., 1987].

The two HSV strains are differentiated usually by analyzing DNA when they are unrelated epidemiologically; hence, transmission of a strain can be traced [Buchman et al., 1978, 1979; Chaney et al.,

Grant sponsor: Ministry of Education, Science, Technology, Sports and Culture of Japan (partially supported).

\*Correspondence to: Kenichi Umene, Faculty of Human Environmental Science, Department of Nutrition & Health Science, Fukuoka Woman's University, Fukuoka 813-8529, Japan. E-mail: umene@fwu.ac.jp

Accepted 26 May 2009

DOI 10.1002/jmv.21581

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

1983; Sakaoka et al., 1995; Umene, 1998a,b]. Differences in DNA detected between HSV strains using restriction endonuclease (RE) are divided into two types: restriction fragment length polymorphism (RFLP) and "common-type variation" [Umene et al., 1984; Umene, 1998a,b]. RFLP, which is due mostly to the gain or loss of an RE cleavage site, is stable and serves as a physical marker of the HSV genome in genetic and epidemiological studies [Buchman et al., 1978; Chaney et al., 1983; Sakaoka et al., 1994; Umene and Kawana, 2000]. The other type variation ("common-type variation") is located in fragments containing tandemly repeated sequences and is also called a hypervariable region [Umene and Yoshida, 1989; Maertzdorf et al., 1999]. Reiterated sequences in "common-type variation" have a tendency to be more variable than other sequences, and this property of reiteration makes way for a beneficial marker when attempting to differentiate HSV-1 strains [Umene and Yoshida, 1989; Umene, 1998a,b; Maertzdorf et al., 1999]. The use of a "common-type variation" as a marker should be avoided if the copy number of reiterations changes so rapidly that it would not be feasible to trace the strain back to the source. The "common-type variation," reiteration VII within the protein-coding regions of genes US10 and US11, proved sufficiently stable to differentiate HSV-1 strains [Umene and Yoshida, 1989; Maertzdorf et al., 1999; Remeijer et al., 2001, 2002; Umene and Kawana, 2003].

HSV can cause recrudescence lesions and the responsible viruses are postulated to derive from two sources: (i) a virus that remains in the body following primary infection (endogenous recurrence), in which case the genomic profiles of HSV isolates would be the same; (ii) re-infection with exogenous virus (exogenous re-infection), in which case the genomic profiles of HSV isolates would be different [Buchman et al., 1979; Sakaoka et al., 1995; Umene et al., 2007].

Primary infections with HSV are followed by the production of antibodies to the viral antigen: IgM antibodies are produced transiently, while IgG antibodies persist. HSV infections recur in spite of host immune responses to the virus [Whitley and Miller, 2001; Koelle and Corey, 2003; Ramachandran and Kinchington, 2007]. Although the possible role of antibodies against viral antigens in the development of recurrent lesions was explored, differences of opinion remain regarding the relationship between the level of anti-HSV antibody and recurrent HSV infection. The present report describes the serologic status of two patients with recrudescence HSV-1 genital infections and genotypes of a series of HSV-1 isolates obtained from each patient.

## METHODS

### Serologic Studies

Samples were assayed using two enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, the Herpes Simplex IgG detection kit and Herpes Simplex IgM detection kit

(Denka Seiken, Tokyo, Japan), which detect IgG and IgM antibodies to HSV, respectively, according to the manufacturer's instructions [Kawana et al., 1995; Hashido et al., 1997; Kumaki et al., 2001]. Antibody index values were calculated by dividing the optical density values for test specimens by the average of the optical density values for the standard pooled human serum containing low-titer IgG and IgM-type antibody to HSV, respectively. Two other ELISA kits, HerpeSelect-1 ELISA and HerpeSelect-2 ELISA (Focus Technologies, Inc., Cypress, CA), which detect IgG antibodies to glycoproteins G of HSV-1 and HSV-2, respectively, were used to distinguish serologically between HSV-1 and HSV-2 [Geretti, 2006]. Index values were calculated by dividing specimen optical density values by the mean of the cut-off calibrator absorbance values. Neutralizing antibodies of a patient were assayed using HSV-1 isolates obtained from the same and the other patient (Tables I and II) [Kawana et al., 1982].

### HSV-1 Isolation and Extraction of HSV-1 DNA

Specimens for herpes simplex viral culture were obtained by swabbing with cotton applicators, and separate swabs were used to sample the cervix, vulva, and anal areas of patients (Tables I and II) [Kawana et al., 1982]. Specimens were inoculated onto cultures of Vero cells, which were examined daily for a cytopathic effect. Working stocks of HSV-1 isolates were made on Vero cells in Eagle's MEM supplemented with 2% fetal bovine serum at a low multiplicity of infection [Umene et al., 1984]. A Vero cell monolayer infected with HSV-1 stock was collected by low-speed centrifugation and viral DNA was extracted by the method of Hirt [Umene and Kawana, 2000].

### Polymerase Chain Reaction (PCR) and Sequencing

PCR to amplify the region encompassing the reiteration VII region was carried out using a pair of primers: 5'-GTGGGTTGGGCTTCCGGTGG-3' (nucleotide number 12,032–12,051) and 5'-CCAGAGACCCAGGGTACC-3' (12,288–12,307), as described [Umene et al., 2007] [the nucleotide numbering system was a short unique region of HSV-1 strain 17, McGeoch et al., 1985]. The nucleotide sequences of HSV-1 isolates C81–C88, corresponding to the short unique region between 12,073 and 12,276 of strain 17, were submitted to DDBJ/EMBL/GenBank. The accession numbers are AB426482 to AB426489.

## CASE REPORTS

### Case 1

A 40-year-old woman (patient 1), without a previous history of genital herpes infection, presented with an uncomfortable vulvar ulcer with palpable inguinal lymph nodes (1st day in Table I). Serologic tests and attempts at viral isolation were carried out. When she

TABLE I. Patient 1

Days	Antibody to HSV						HSV-1 isolation		
	ELISA (index value)				Neutralization		Derivation of materials	Viral culture <sup>f</sup>	Isolate no.
	IgG <sup>a</sup>	IgM <sup>b</sup>	Anti-HSV-1 <sup>c</sup>	Anti-HSV-2 <sup>d</sup>	HSV-1 <sup>e</sup>	Titers			
1	0.4	0.33	0.06	0.02	C81 C84 (C85) (C88)	≤4 ≤4 ≤4 ≤4	Vulva Cervix	+ +	C81 C82
3							Vulva Cervix	+ +	
6							Vulva	+	
8							Vulva Cervix	+ -	
13							Vulva Cervix	- -	
31	21.9	9.78	1.61	0.07	C81 C84 (C85) (C88)	45 32 32 32	Vulva Cervix	- -	
80	11.3	4.39	1.02	0.05	C81 C84	23 32	Vulva Cervix	- -	
157	8.0	4.21	0.54	0.03	C81 C84 (C85) (C88)	11 11 16 11	Vulva Cervix	- -	
227	28.6	3.19	1.03	0.03	C81 C84 (C85) (C88)	64 45 90 90	Vulva Cervix	+ -	C83
230							Vulva Cervix	- -	
237	82.2	2.64	2.32	0.03	C81 C84	>128 >128	Vulva Cervix	- -	
290	29.1	2.84	1.51	0.04	C81 C84	90 128	Vulva Cervix	- -	
414	18.8	2.62	2	0.03	C81 C84 (C85) (C88)	23 23 23 45	Vulva Cervix	+ -	C84
419	63.1	2.46	4.11	0.05	C81 C84 (C85) (C88)	45 45 45 80	Vulva Cervix	- -	

<sup>a</sup>Herpes Simplex IgG detection kit (Denka Seiken) [Kumaki et al., 2001].

<sup>b</sup>Herpes Simplex IgM detection kit (Denka Seiken) [Kumaki et al., 2001].

<sup>c</sup>HerpeSelect-1 ELISA (Focus Technologies, Inc.) [Geretti, 2006].

<sup>d</sup>HerpeSelect-2 ELISA (Focus Technologies, Inc.) [Geretti, 2006].

<sup>e</sup>HSV-1 isolates obtained from patient 2 are indicated in parentheses.

<sup>f</sup>A positive culture result (+) or a negative culture result (-) are indicated for each viral culture attempt.

visited the hospital (1st day), serology for antibodies to HSV was negative and viral culture was positive for HSV-1 isolates (C81 and C82), which were obtained from materials taken on the 1st day from the vulva and cervix (Table I). On the 31st day, the anti-HSV antibody values of both IgG and IgM classes were positive, and the anti-HSV-1 antibody value was positive but anti-HSV-2 was not; hence, the episode on the 1st day was assumed to be the primary HSV-1 infection [Kalimo et al., 1977; Hashido et al., 1997]; thereafter, the levels of antibodies decreased gradually (on the 80th and 157th days). On the 227th day, she complained of recrudescence genital lesions, and HSV-1 isolate C83 was obtained (Table I): the level of anti-HSV-1 antibody increased on the

237th day (10 days later). On the 414th day, she visited the hospital because of recrudescence genital lesions, and HSV-1 isolate C84 was obtained (Table I): the level of anti-HSV-1 antibody increased on the 419th day (5 days later).

## Case 2

An 18-year-old woman (patient 2), with a previous history of genital herpes infection, presented with multiple vulvar vesicles without palpable inguinal lymph nodes (1st day in Table II), and HSV-1 isolates (C85 and C86) were obtained. On the 1st day, IgG and anti-HSV-1 antibody values were positive, albeit low,

TABLE II. Patient 2

Days	Antibody to HSV				HSV-1 isolation				
	ELISA (index value)			Neutralization		Derivation of materials	Viral culture <sup>f</sup>	Isolate no.	
	IgG <sup>a</sup>	IgM <sup>b</sup>	Anti-HSV-1 <sup>c</sup>	Anti-HSV-2 <sup>d</sup>	HSV-1 <sup>e</sup>				Titers
1	1.9	0.31	1.06	0.04	(C81) (C84) C85 C88	≤4 4 4 ≤4	Vulva Cervix	+ +	C85 C86
6							Vulva Cervix	- -	
13	85.0	0.43	6.08	0.08	(C81) (C84) C85 C88	45 45 64 45			
20							Vulva Cervix	- -	
169	10.0	0.32	1.75	0.04	(C81) (C84) C85 C88	23 23 11 11	Cervix Anal areas	+ +	C87 C88
178	105.0	0.35	6.75	0.04	(C81) (C84) C85 C88	>128 128 >128 >128	Cervix Anal areas	- -	
272	17.8	0.29	2.26	0.05			Vulva Cervix	- -	
286							Vulva Cervix	- -	
370	10.3	0.48	1.93	0.11			Vulva Cervix Anal areas	- - -	
391							Vulva Cervix	- -	

<sup>a</sup>Herpes Simplex IgG detection kit (Denka Seiken) [Kumaki et al., 2001].

<sup>b</sup>Herpes Simplex IgM detection kit (Denka Seiken) [Kumaki et al., 2001].

<sup>c</sup>HerpeSelect-1 ELISA (Focus Technologies, Inc.) [Geretti, 2006].

<sup>d</sup>HerpeSelect-2 ELISA (Focus Technologies, Inc.) [Geretti, 2006].

<sup>e</sup>HSV-1 isolates obtained from patient 1 are indicated in parentheses.

<sup>f</sup>A positive culture result (+) or a negative culture result (-) are indicated for each viral culture attempt.

and no significant increase in the level of IgM was seen on the 13th day (12 days later), although a marked increase in IgG and anti-HSV-1 antibody was shown in comparison with that on the 1st day; hence, the episode on the 1st day was thought to be recrudescence of HSV-1 infection. The levels of IgG and anti-HSV-1 antibody on the 169th day were lower than on the 13th day. On the 169th day, she visited the hospital with recrudescence of genital lesions, and HSV-1 isolates (C87 and C88) were obtained (Table II): the level of anti-HSV-1 antibody increased on the 178th day (9 days later).

## RESULTS

### Analyses of DNA of Sequential HSV-1 Isolates

Four HSV-1 isolates of C81–C84 were obtained sequentially from patient 1, and the other four isolates of C85–C88 were from patient 2 (Tables I and II). Analyses of the DNA of HSV-1 isolates obtained sequentially from the same individual are useful to determine whether recrudescence of lesions are attributable to endogenous recurrence or exogenous re-infection

[Buchman et al., 1979; Sakaoka et al., 1995; Umene et al., 2007]. DNA of eight HSV-1 isolates C81–C88 was analyzed with respect to RFLP and reiteration VII.

A set of 20 RFLP markers, which are distributed widely on the HSV-1 genome and used to classify HSV-1 isolates into genotypes, was defined previously (Table III) [Umene and Kawana, 2000]. These RFLP markers can be identified by Southern hybridization analyses of the DNA of HSV-1 isolates digested with each RE of *Bam*HI, *Kpn*I, and *Sal*I [Umene et al., 1984; McGeoch et al., 1988]. Southern hybridization analyses of the 20 RFLP markers were performed, and RFLP profiles were the same between HSV-1 isolates obtained from the same patient. In previous studies, HSV-1 isolates were classified into a number of genotypes based on the state of the 20 RFLP markers, and genotypes were defined. The genotypes of four isolates, C81–C84, from patient 1 were the same as genotype F35 defined previously [Umene and Kawana, 2000; Umene et al., 2007]. Four isolates of C85–C88 separated from patient 2 did not belong to any genotype defined previously, and the genotype of C85–C88 was named F85 in the present study (Table III).



TABLE III. RFLPs Used for Differentiation of HSV-1 Isolates

Name	Definition	RFLPs <sup>a</sup>		
		<i>EcoRI</i> probe	C81–C84 (F35 <sup>b</sup> )	C85–C88 (F85 <sup>c</sup> )
VR11	Gain of the <i>SalI</i> site between fragments I and C (and F)	J	+	+
VR25	Loss of the <i>SalI</i> site between fragments Z and H'	D	+	–
VR24	Loss of the <i>KpnI</i> site between fragments Z and E	D	–	–
VR23	Gain of the <i>KpnI</i> site on fragment E generating two fragments of 5.5 and 5.7 kbp	D	+	–
VR21	Loss of the <i>BamHI</i> site between fragments A' and A	D	–	–
VR22	Gain of a <i>BamHI</i> site on fragment A generating two fragments of 1.7 and 9.5 kbp	D	–	–
VR3	Loss of the <i>KpnI</i> site between fragments Ma and Mb	F	+	+
VR5	Smaller <i>SalI</i> N fragment of 4.8 kbp instead of 5.0 kbp	F	–	–
VR6	Gain of the <i>BamHI</i> site between fragments W and K'	O	+	+
VR7	Loss of the <i>BamHI</i> site between fragments D and H	A	–	+
VR61	Smaller <i>BamHI</i> O fragment of 3.7 kbp instead of 3.9 kbp	A	–	–
VR8	Loss of the <i>SalI</i> site between fragments K and C'	A	+	–
VR64	Gain of a <i>KpnI</i> site on fragment Aa generating two 5.0 kbp fragments	A	–	–
VR9	Loss of the <i>KpnI</i> site between fragments Aa and Ab	A	–	+
VR67	Larger <i>SalI</i> T fragment of 4.0 kbp instead of 3.7 kbp	A	–	–
VR73	Gain of a <i>SalI</i> site on fragment Q generating two fragments of 3.5 and 0.6 kbp	I	+	–
VR10	Gain of the <i>KpnI</i> site between fragments Ab and Y	I	+	+
VR72	Loss of the <i>KpnI</i> site between fragments T and O	I	+	–
VR93	Gain of a <i>KpnI</i> site on fragment F generating two fragments of 6.9 and 3.5 kbp	H	–	–
VR94	Loss of the <i>KpnI</i> site between fragments F and K	H	–	–

<sup>a</sup>Twenty RFLPs were defined previously and are arranged in the order on the HSV-1 genome [McGeoch et al., 1988; Umene and Kawana, 2000].

<sup>b</sup>Four isolates of C81–C84 from patient 1 were classified into genotype F35 defined previously [Umene and Kawana, 2000].

<sup>c</sup>Four isolates of C85–C88 from patient 2 did not belong to any genotype defined previously, and the genotype of C85–C88 was named F85 in the present study.

The “common-type variation” of reiteration VII is a beneficial marker for the differentiation of HSV-1 isolates [Umene and Yoshida, 1989; Maertzdorf et al., 1999; Remeijer et al., 2001, 2002; Umene and Kawana, 2003; Roest et al., 2004]. DNA regions encompassing reiteration VII of C81–C88 were amplified by PCR, and nucleotide sequences of PCR-amplified DNA fragments were determined (Fig. 1). Nucleotide sequences of C81–C84 from patient 1 were the same, and those of C85–C88 from patient 2 were also the same. Nucleotide sequences of C81–C84 were different from those of C85–C88 (Fig. 1). The results obtained in this study concerning RFLP and reiteration VII of C81–C88 suggested that the sources of HSV-1 isolates obtained from the same patient were the same; hence, the recrudescence genital lesions of patients 1 and 2 were thought to be attributable to endogenous recurrence, not exogenous re-infection.

#### Neutralizing Antibodies to HSV-1 Isolates

HSV-1 isolates were obtained successfully in the present study from patients from whom sera were drawn; thus, the neutralizing antibody in sera could be tested with HSV-1 isolate from the same patient (Tables I and II). Titers of neutralizing antibodies were examined using HSV-1 isolates, C81 and C84, which were obtained from patient 1 on the 1st and 414th days, respectively (Table I), and C85 and C88, obtained from

patient 2 on the 1st and 169th days, respectively (Table II).

Neutralizing antibody values in patient 1 appeared to be negative on the 1st day; however, they were positive for HSV-1 isolates from patients 1 (C81, C84) and 2 (C85, C88) on the 31st day (30 days later) (Table I). C84 obtained on the 414th day (the later episode) was neutralized by sera taken between the 31st and 414th days, as well as C81 obtained on the 1st day (the earlier episode); hence, C84 was supposed to have multiplied despite the presence of an antibody that could neutralize experimentally C84.

The level of neutralizing antibodies in patient 2 was low on the 1st day; however, a marked increase was shown for HSV-1 isolates from patients 1 (C81, C84) and 2 (C85, C88) on the 13th day (12 days later) (Table II). C88 obtained on the 169th day (the later episode) was neutralized by serum taken on the 13th day (156 days before the separation of C88), as well as C85 obtained on the 1st day (the earlier episode), suggesting the multiplication of C88 despite the presence of an antibody that could neutralize experimentally C88.

#### DISCUSSION

HSV reactivation occurs in the presence of anti-HSV serum antibody and the relationship between HSV recurrence and the level of anti-HSV antibody is controversial. First, a difference of opinion over the level

```

Strain 17      GGATCCCGACGCGGGCCCGAGCGTATGCTCCATGTTGTGGGGAGAAGG      12120
               BamHI
C81-C84      GGATCCCGACGCGGGCCCGAGCGTACCGCTGCATCTTGTGGGGAGAAGG      12120
               BamHI
C85-C88      GGATCCCGACGCGGGCCCGAGCGTATGCTCCATCTTGTGGGGAGAAGG      12120
               BamHI

GGTCTGGGCTCGCCAGGGGGGCATACTTGCCCGGGCTATACAGACCCGCGAGCCGTACGT      12180

GGTCTGGGCTCGCCAGGGGGGCATACTTGCCCGGGCTATACAGACCCGCGAGCCGTACGT      12180

GGTCTGGGCTCGCCAGGGGGGCATACTTGCCCGGGCTATACAGACCCGCGAGCCGTACGT      12180

GGTTTCGCGGGGGGTGCGTGGGGTCCGGGGCTCCCGGGGAGACCGGGGCTCCCGGGGAGAC      12240

GGTTTGCGGGGGGTGCGTGGGGTCCGGGGCTCCCGGGGAGGCGGGGCTCCCGGGG-----      12236

GGTTTCGCGGGGGGTGCGTGGGGTCCGGGGCTCCCGGGG-----      12218

CGGGGCTCCCTGGGAGACCGGGGTTGTCGTGGATCC      12276
               BamHI

-----TTGTCGTGGATCC      12236+13
               BamHI

-----CTCCCTGGGAGACCGGGGTTGTCGTGGATCC      12218+31
               BamHI
    
```

Fig. 1. Nucleotide sequences of a region encompassing reiteration VII of HSV-1. Nucleotide sequences of strain 17 (standard strain), isolates C81–C84 (F35 genotype), and isolates C85–C88 (F85 genotype). The nucleotide numbering system is the short unique region of strain 17 [McGeoch et al., 1985]. Nucleotide sequences recognized by *Bam*HI are single underlined. Nucleotides of HSV-1 isolates C81–C88 different from the corresponding nucleotides of strain 17 are double underlined. Each copy of 18-bp tandem repeats of reiteration VII is underlined by a dotted or broken line.

of anti-HSV antibody before/during recurrence was seen. Antibody titers were lower among those in whom herpes labialis was induced by experimental exposure to ultraviolet radiation compared to those who were exposed but did not develop lesions [Spruance et al., 1995], suggesting an association of a low antibody level with recurrence; however, individual susceptibility to recurrent herpetic facial infections did not correlate with changes in antibody levels in another study [Zweerink and Stanton, 1981]. Vaccination with recombinant HSV-2 glycoprotein had no significant influence on the subsequent frequency of genital herpes reactivation, although high levels of HSV-2-specific neutralizing antibodies were induced [Corey et al., 1999]. In the present study, the level of anti-HSV-1 antibody during a recurrent episode increased in patient 1 (157th to 227th days in Table I) and decreased in patient 2 (13th to 169th day in Table II) with inconsistent variation patterns.

Second, there was disagreement as to the level of anti-HSV antibody after recurrence. No increase in the titer

of neutralizing antibodies following recurrence was detected in a study of individuals suffering from recurrent herpes labialis [Douglas and Couch, 1970], while multiple sera collected over 13 years from a sufferer of recurrent herpes labialis in another study revealed a gradual increase in neutralizing antibody titers [Ratner et al., 1980]. Titers of HSV-neutralizing antibody were revealed to be higher among patients with frequent herpes labialis than history-negative, HSV-seropositive control patients, consistent with a model in which antibody levels are driven by antigen load [Spruance et al., 1995]. In the present study, the level of serum anti-HSV-1 antibody increased after recurrence and HSV-1 isolation (Tables I and II), suggesting a boost of existing immune responses. The variation in the level of anti-HSV-1 antibody was considered potentially useful to diagnose recurrence.

Occasionally, molecular fingerprinting of serial genital HSV isolates has yielded more than one HSV strain [Koelle and Corey, 2003]. Genomes of both HSV-1 and HSV-2 were detected widely in human spinal

ganglia [Obara et al., 1997], and both HSV-1 and HSV-2 isolates were obtained from an individual with genital herpes infections [Sakaoka et al., 1995; Sucato et al., 1998]. Studies of sequence diversity between HSV-1 and HSV-2 isolates revealed evidence of recombination, which requires the co-existence of two viral genomes; hence, co-infection by genetically distinct strains is suggested as an important aspect in HSV epidemiology [Bowden et al., 2004; Norberg et al., 2004, 2007]. The separation of HSV isolates with different genomic profiles from the same individual suffering from genital herpes has been reported; that is, (i) 2 of 8 cases of HSV-2 genital infections [Buchman et al., 1979], (ii) 1 of 63 cases of HSV-2 genital infections [Sakaoka et al., 1995], and (iii) 2 of 13 cases of HSV-1 genital infections [Roest et al., 2004] were demonstrated to be attributable to exogenous re-infection by analyzing RFLP or a hyper-variable region ("common-type variation"). Since HSV-1 isolates from the same patient were not differentiated in either RFLP (Table III) or reiteration VII (a hyper-variable region) (Fig. 1), recrudescence genital lesions in the patients analyzed in the present study were supposed to be ascribable to endogenous recurrence of a latent virus, not exogenous re-infection with other strains.

After natural, wild-type infections, viral pathogens are supposed ordinarily to elicit immune responses that lessen the severity and transmissibility of subsequent infection with the same viral type; however, prior HSV infection did not prevent subsequent HSV infection [Whitley and Miller, 2001; Koelle and Corey, 2003; Ramachandran and Kinchington, 2007]. It is assumed that natural viral infection might protect against subsequent infection with the same viral genotype (usually due to endogenous recurrence of a latent virus) more effectively than with a different genotype (generally attributable to exogenous re-infection with other strains). As HSV-1 isolates obtained from patient 1 (F35) were different from those from patient 2 (F85) (Table III, Fig. 1), decreased serologic reactivity resulting from a difference in genotype seemed unlikely. Genotypes of HSV-1 isolates obtained from patient 1 (F35) were different from those from patient 2 (F85) (Table III, Fig. 1). HSV-1 isolates obtained from patients 1 (C81, 84) and 2 (C85, C88) were neutralized similarly by sera drawn from each patient (Tables I and II); thus, in these two patients, sera from one patient appeared to be able to neutralize HSV-1 isolates from the other patient as well as from the same patient.

Serologic type conversion of an HSV-1 to an HSV-2 epitope was shown to result from single amino acid substitution on an HSV-1 molecule [Kimmel et al., 1990], and the lack of reactivity of several HSV-2 clinical isolates to anti-HSV-2 monoclonal antibodies was attributable to single frameshift mutations [Liljeqvist et al., 1999]; hence, it is possible that a single mutation produced in the genome of an HSV clone could affect the serologic reactivity of the HSV clone. Although HSV-1 isolates obtained from the same patient in the present study were the same in RFLP and reiteration VII, other

variations produced in the genome of an HSV-1 clone might cause a difference in serologic reactivity. An HSV-1 clone with a variation, as a result of which the HSV-1 clone is neutralized less effectively by sera taken before/during a later episode in a patient, is supposed to multiply preferentially during the later episode in the same patient. In the present study, an HSV-1 isolate obtained during a later episode was shown to be neutralized by sera taken before/during this episode from the same patient, as effectively as an HSV-1 isolate obtained during an earlier episode in the same patient (Tables I and II); thus, the majority of HSV-1 clones present during a later episode was assumed not to have a variation that could render an HSV-1 clone more resistant to sera drawn before/during the later episode in the same patient.

HSV-1 is thought to have replicated during recurrence in these two patients despite the existence of an antibody that could neutralize experimentally HSV-1; hence, HSV-1 antibody seems to offer little, if any, protection against HSV-1 recurrence, suggesting the necessity of developing an immunologic strategy for HSV vaccination with consideration of HSV-encoded immune evasion functions directed at the humoral response [Whitley and Miller, 2001; Koelle and Corey, 2003; Ramachandran and Kinchington, 2007].

## REFERENCES

- Bowden R, Sakaoka H, Donnelly P, Ward R. 2004. High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant co-infection. *Infect Genet Evol* 4:115–123.
- Buchman TG, Roizman B, Adams G, Stover BH. 1978. Restriction endonuclease fingerprinting of herpes simplex virus DNA: A novel epidemiological tool applied to a nosocomial outbreak. *J Infect Dis* 138:488–498.
- Buchman TG, Roizman B, Nahmias AJ. 1979. Demonstration of exogenous genital reinfection with herpes simplex virus type 2 by restriction endonuclease fingerprinting of viral DNA. *J Infect Dis* 140:295–304.
- Chaney SMJ, Warren KG, Kettlys J, Zbitnue A, Subak-Sharpe JH. 1983. A comparative analysis of restriction enzyme digests of the DNA of herpes simplex virus isolated from genital and facial lesions. *J Gen Virol* 64:357–371.
- Corey L, Langenberg AGM, Ashley R, Sekulovich RE, Izu AE, Douglas JMJ, Handsfield HH, Warren T, Marr L, Tyring S, DiCarlo R, Adimora AA, Leone P, Dekker CL, Burke RL, Leong WP, Straus SE. 1999. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection. *J Am Med Assoc* 281:331–340.
- Douglas RG, Jr., Couch RB. 1970. A prospective study of chronic herpes simplex virus infection and recurrent herpes labialis in humans. *J Immunol* 104:289–295.
- Geretti AM. 2006. Genital herpes. *Sex Transm Infect* 82:iv31–iv34.
- Gupta R, Warren T, Wald A. 2007. Genital herpes. *Lancet* 370:2127–2137.
- Haddow LJ, Dave B, Mindel A, McPhie KA, Chung C, Marks C, Dwyer DE. 2006. Increase in rates of herpes simplex virus type 1 as a cause of anogenital herpes in western Sydney, Australia, between 1976 and 2003. *Sex Transm Infect* 82:255–259.
- Hashido M, Inouye S, Kawana T. 1997. Differentiation of primary from nonprimary genital herpes infections by a herpes simplex virus-specific immunoglobulin G avidity assay. *J Clin Microbiol* 35:1766–1768.
- Kalimo KOK, Marttila RJ, Granfors K, Viljanen MK. 1977. Solid-phase radioimmunoassay of human immunoglobulin M and immunoglobulin G antibodies against herpes simplex virus type 1 capsid, envelope, and excreted antigens. *Infect Immun* 15:883–889.

- 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.
- Kawana T, Hashido M, Koizumi Y. 1995. Class-specific antibody response in acyclovir-treated and adenine arabinoside-treated patients with primary genital herpes simplex virus infection. *Microbiol Immunol* 39:795–799.
- Kimmel KA, Dolter KE, Toth GM, Levine M, Glorioso JC. 1990. Serologic type conversion of a herpes simplex virus type 1 (HSV-1) to an HSV-2 epitope caused by a single amino acid substitution in glycoprotein C. *J Virol* 64:4033–4036.
- Koelle DM, Corey L. 2003. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 16:96–113.
- Kumaki S, Villa A, Asada H, Kawai S, Ohashi Y, Takahashi M, Hakozaki I, Nitani E, Minegishi M, Tsuchiya S. 2001. Identification of anti-herpes simplex virus antibody-producing B cells in a patient with an atypical RAG1 immunodeficiency. *Blood* 98:1464–1468.
- Lafferty WE, Coombs RW, Benedetti J, Critchlow C, Corey L. 1987. Recurrences after oral and genital herpes simplex virus infection: Influence of site of infection and viral type. *N Engl J Med* 316:1444–1449.
- Liljeqvist J-Å, Svennerholm B, Bergström T. 1999. Herpes simplex virus type 2 glycoprotein G-negative clinical isolates are generated by single frameshift mutations. *J Virol* 73:9796–9802.
- Maertzdorf J, Remeijer L, Van Der Lelij A, Buitenwerf J, Niesters HGM, Osterhaus ADME, Verjans GMGM. 1999. Amplification of reiterated sequences of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genome to discriminate between clinical HSV-1 isolates. *J Clin Microbiol* 37:3518–3523.
- McGeoch DJ, Dolan A, Donald S, Rixon FJ. 1985. Sequence determination and genetic content of the short unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Mol Biol* 181:1–13.
- McGeoch DJ, Dalrymple MA, Davison AJ, Dolan A, Frame MC, McNab D, Perry LJ, Scott JE, Taylor P. 1988. The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69:1531–1574.
- Norberg P, Bergström T, Rekabdar E, Lindh M, Liljeqvist J-Å. 2004. Phylogenetic analysis of clinical herpes simplex virus type 1 isolates identified three genetic groups and recombinant viruses. *J Virol* 78:10755–10764.
- Norberg P, Kasubi MJ, Haarr L, Bergström T, Liljeqvist J-Å. 2007. Divergence and recombination of clinical herpes simplex virus type 2 isolates. *J Virol* 81:13158–13167.
- Obara Y, Furuta Y, Takasu T, Suzuki S, Suzuki H, Matsukawa S, Fujioka Y, Takahashi H, Kurata T, Nagashima K. 1997. Distribution of herpes simplex virus types 1 and 2 genomes in human spinal ganglia studied by PCR and in situ hybridization. *J Med Virol* 52:136–142.
- Ramachandran S, Kinchington PR. 2007. Potential prophylactic and therapeutic vaccines for HSV infections. *Curr Pharm Des* 13:1965–1973.
- Ratner JJ, Sanford BA, Smith KO. 1980. A serological study of herpes simplex virus type 1 antibody over a 13-year period. *Dermatology* 161:227–232.
- Reeves WC, Corey L, Adams HG, Vontver LA, Holmes KK. 1981. Risk of recurrence after first episodes of genital herpes: Relation to HSV type and antibody response. *N Engl J Med* 305:315–319.
- Remeijer L, Maertzdorf J, Doornenbal P, Verjans GMGM, Osterhaus ADME. 2001. Herpes simplex virus 1 transmission through corneal transplantation. *Lancet* 357:442.
- Remeijer L, Maertzdorf J, Buitenwerf J, Osterhaus ADME, Verjans GMGM. 2002. Corneal herpes simplex virus type 1 superinfection in patients with recrudescence herpetic keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:358–363.
- Roest RW, Carman WF, Maertzdorf J, Scouler A, Harvey J, Kant M, van der Meijden WI, Verjans GMGM, Osterhaus ADME. 2004. Genotypic analysis of sequential genital herpes simplex virus type 1 (HSV-1) isolates of patients with recurrent HSV-1 associated genital herpes. *J Med Virol* 73:601–604.
- Sacks SL, Griffiths PD, Corey L, Cohen C, Cunningham A, Dusheiko GM, Self S, Spruance S, Stanberry LR, Wald A, Whitley RJ. 2004. Introduction: Is viral shedding a surrogate marker for transmission of genital herpes? *Antiviral Res* 63S1:S3–S10.
- Sakaoka H, Kurita K, Iida Y, Takada S, Umene K, Kim YT, Ren CS, Nahmias AJ. 1994. Quantitative analysis of genomic polymorphism of herpes simplex virus type 1 strains from six countries: Studies of molecular evolution and molecular epidemiology of the virus. *J Gen Virol* 75:513–527.
- Sakaoka H, Aomori T, Gouro T, Kumamoto Y. 1995. Demonstration of either endogenous recurrence or exogenous reinfection by restriction endonuclease cleavage analysis of herpes simplex virus from patients with recrudescence genital herpes. *J Med Virol* 46:387–396.
- Spruance SL, Evans TG, McKeough MB, Thai L, Araneo BA, Daynes RA, Mishkin EM, Abramovitz AS. 1995. Th1/Th2-like immunity and resistance to herpes labialis. *Antiviral Res* 28:39–55.
- Sucato G, Wald A, Wakabayashi E, Vieria J, Corey L. 1998. Evidence of latency and reactivation of both herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 in the genital region. *J Infect Dis* 177:1069–1072.
- Umene K. 1998a. Herpesvirus: Genetic variability and recombination. *Fukuoka: Touka Shobo*, 345 p.
- Umene K. 1998b. Molecular epidemiology of herpes simplex virus type 1. *Rev Med Microbiol* 9:217–224.
- Umene K, Kawana T. 2000. Molecular epidemiology of herpes simplex virus type 1 genital infection in association with clinical manifestations. *Arch Virol* 145:505–522.
- Umene K, Kawana T. 2003. Divergence of reiterated sequences in a series of genital isolates of herpes simplex virus type 1 from individual patients. *J Gen Virol* 84:917–923.
- Umene K, Yoshida M. 1989. Reiterated sequences of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) genome can serve as physical markers for the differentiation of HSV-1 strains. *Arch Virol* 106:281–299.
- Umene K, Eto T, Mori R, Takagi Y, Enquist LW. 1984. Herpes simplex virus type 1 restriction fragment polymorphism determined using Southern hybridization. *Arch Virol* 80:275–290.
- Umene K, Yamanaka F, Ohashi S, Koga C, Kameyama T. 2007. Detection of differences in genomic profiles between herpes simplex virus type 1 isolates sequentially separated from the saliva of the same individual. *J Clin Virol* 39:266–270.
- Whitley RJ, Miller RL. 2001. Immunologic approach to herpes simplex virus. *Viral Immunol* 14:111–118.
- Zweierink HJ, Stanton LW. 1981. Immune response to herpes simplex virus infections: Virus-specific antibodies in sera from patients with recurrent facial infections. *Infect Immun* 31:624–630.