

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
東出誠司、西澤美香、川名 尚、保坂憲光、太田嘉則、神田秀俊	新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による単純ヘルペスウイルスの検出	日本性感染症学会誌	21	120 - 127	2010
川名 尚	感染症 単純ヘルペスウイルス	産科と婦人科	77	75-83	2010
松井猛彦、岩田力、勝沼俊雄、南部光彦、岡田賢司、近藤直実	速報 新型インフルエンザ入院例に関する緊急第二次調査報告：基礎疾患のない症例との比較－呼吸器症状を呈した症例を中心に	日本小児アレルギー学会誌	24	155 - 166	2010
岡田賢司	新型インフルエンザワクチンとアナフィラキシー - アナフィラキシーの新しい分類 -	小児科臨床	63	1223 - 1229	2010
岡田賢司	インフルエンザワクチンは吸入か皮下注射か、いずれがベターか	吸入療法	2	62-67	2010
岡田賢司	新型インフルエンザ（パンデミック H1N1 2009）の臨床と治療（小児）	Progress in Medicine	30	23-26	2010
Kurosaki, T., Aiba, Y., Kometani, K. Moriyama, S., <u>Takahashi, Y.</u>	Unique properties of memory B cells of different isotypes	Immunol. Rev.	237	104 - 116	2010
庵原俊昭、中野貴司、落合 仁、渡辺正博、二井立恵、伊佐地真知子	麻疹・風疹血清疫学と麻疹風疹混合 (MR) ワクチンによる抗体反応からみた今後の麻疹および風疹対策.	日本小児科医会会報	39	120 - 123	2010
庵原俊昭	総説 基礎疾患をもつ人への予防接種	日本小児アレルギー学会誌	24	193 - 202	2010

庵原俊昭	ワクチンと免疫	小児保健研究	69	830 - 832	2010
Suzuki J., Goto H., Komase K., Abo H., Fujii K., Otsuki N., Okamoto K.	Rubella virus as a possible etiological agent of Fuchs heterochromic iridocyclitis.	Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol	248	1487 - 1491	2010
Okamoto K. , Fujii K., Komase K.	Development of a novel TaqMan real-time PCR assay for detecting rubella virus RNA.	J. Virol. Methods	168	267 - 271	2010
Yuki, N., Takahashi, Y. , Ihara, T. , Ito, S., Nakajima, T., Funakoshi, K., Furukawa, K., Kobayashi, K. , Odaka, M.	Lack of antibody response to Guillain-Barre syndrome-related gangliosides in mice and men after novel influenza vaccination.	J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry	In press		2011

IV. 研究成果の刊行物・別刷

新しい核酸抽出法を用いた LAMP 法による 単純ヘルペスウイルスの検出

Detection of *herpes simplex virus* DNA by the Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) method combined with a novel nucleic acid extraction method : "Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE)"

東出誠司 ¹⁾	保坂憲光 ¹⁾	太田嘉則 ¹⁾
Satoshi HIGASHIDE	Norimitsu HOSAKA	Yoshinori OTA
川名 尚 ²⁾	西澤美香 ²⁾	神田秀俊 ¹⁾
Takashi KAWANA	Mika NISHIZAWA	Hidetoshi KANDA

性器の単純ヘルペスウイルス (HSV-1、HSV-2) 感染の検出と型判別のために、新規核酸抽出法 Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE 法) と LAMP 法を組み合わせた新しい核酸検出系 PURE-LAMP 法を構築したので報告する。

PURE 法によりピペット操作や遠心操作を行う必要なく、検体ぬぐい液から核酸を抽出し、その抽出液で乾燥状態の LAMP 試薬を溶解し増幅を行うことで目的遺伝子の検出と型判別が 1 時間以内で完了した。ウイルス培養法と比較した結果、新鮮分離株を用いた検出感度では PURE-LAMP 法の方が高感度であった。また、臨床検体 15 検体を用いて特異性についても比較したところ結果は一致した。

PURE-LAMP 法はウイルス分離培養法よりも感度が高く型判別が可能であり、検出までの時間を大幅に短縮できる優れた検査方法であると考えられる。

We report a novel nucleic acid detection/typing system for herpes simplex virus (HSV-1 and HSV-2), using a combination of a nucleic acid isolation method, namely Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE), and the loop-mediated amplification (LAMP) method (PURE-LAMP). Virus nucleic acid was extracted from a swab specimen by the PURE method, and the extract was directly applied to a dry-up LAMP reagent. The whole process from sample preparation to gene amplification and detection/typing was completed within one hour. In a sensitivity study using freshly isolated herpes simplex virus, the sensitivity of the PURE-LAMP method was slightly higher than that of the viral culture. When this system was applied to 15 clinical specimens, which consisted of 5 HSV-1 positive, 5 HSV-2 positive and 5 negative specimens, the results completely agreed with those of the viral culture. From a clinical point of view, the PURE-LAMP method is thought to be very useful, because it is a simple procedure, and results can be obtained in a short time.

Key words : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP), Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE), Genital Herpes, Herpes simplex virus type 1 and type 2

1) 栄研化学株式会社生物化学研究所 : Biochemical Research Laboratory, Eiken Chemical CO., LTD.

2) 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科 : Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University Faculty of Medicine Mizonokuchi Hospital

平成22年3月10日受付、平成22年4月7日掲載決定

(〒329-0114) 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社生物化学研究所 東出誠司

緒言

性器ヘルペスウイルス感染症患者数は STD の定点把握の一つとして 2006 年まで増加傾向にあり、有効な抗ヘルペスウイルス薬があるため臨床的に正確な診断が必要とされている¹⁾。治療には、原因ウイルスである単純ヘルペスウイルス (HSV) の検出だけでなく型判別が再発の予後を推定する上で重要である²⁾。診断には蛍光抗体法やウイルス分離培養法などが用いられているが、蛍光抗体法は感度が低くウイルス分離培養法は時間を要するため実際に適用できる症例は限られている。そのため、短時間での検出が可能で検出感度と特異性が高い遺伝子検査が有効と考えられ、PCR 法や LAMP 法³⁾による検出系とその有用性が報告されてきた^{4)~7)}。しかし、遺伝子検査は煩雑な核酸の抽出・精製工程が必要であり、そのことが検査の簡易・迅速化の障害となり臨床現場での実用化が困難であった。

そこでわれわれは、簡易な核酸抽出法である Procedure for Ultra Rapid Extraction (PURE 法：栄研化学

森ら 論文投稿中)と、迅速で特異性の高い LAMP 法とを組み合わせ、ピペット操作が不要で簡易且つ迅速な HSV-1 と HSV-2 の遺伝子検出および型判別系を構築したので報告する。

対象と方法

1. 検体からの核酸抽出—PURE 法—

PURE 法は、専用容器を用いることにより、従来の遺伝子抽出・精製に必要な煩雑なピペット操作や高速遠心分離操作を行わずに、簡易且つ迅速に核酸を抽出できるように開発された核酸抽出法である。

抽出操作は、アルカリ変性剤を含む前処理容器に検体を添加してウイルスを溶解させた後、ウイルス溶解液を吸着剤入りチューブに添加して攪拌し、LAMP 反応阻害物を吸着剤に吸着させた。その吸着剤入りチューブの側面を押すことにより、乾燥した剤型の LAMP 法試薬 (以下、LAMP 乾燥試薬) を含む反応チューブに直接、核酸抽出液を滴下した (Fig. 1)。

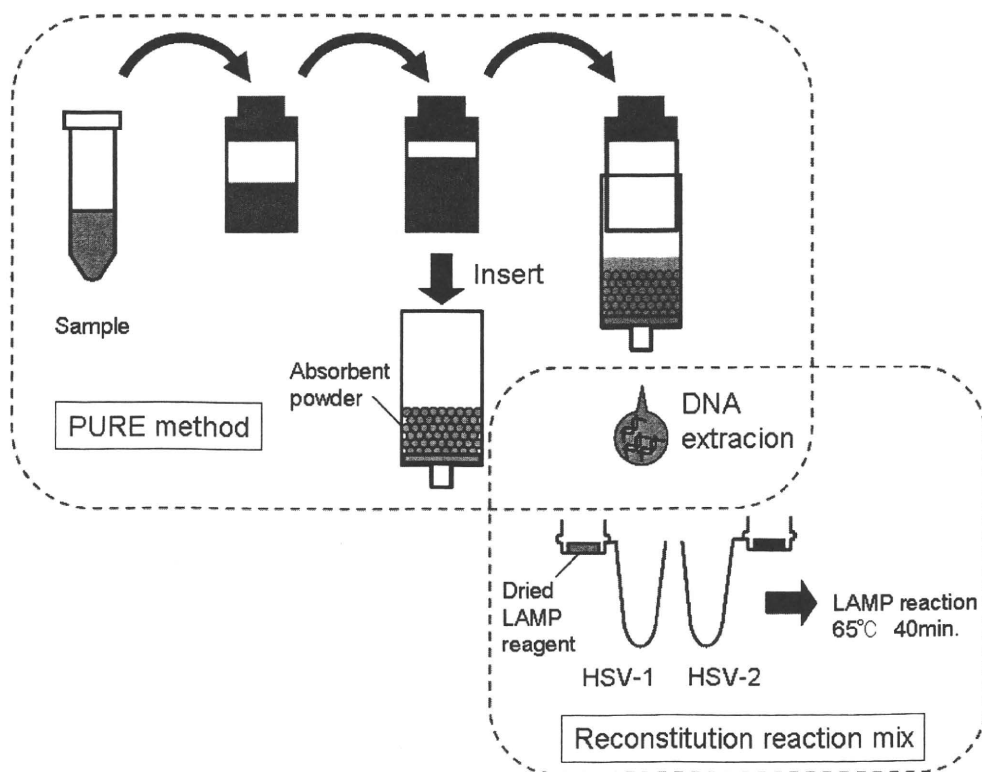


Fig. 1 Schematic diagram illustrating the PURE & LAMP procedure

また、PURE 法の阻害物除去効果を確認するため、核酸抽出を行わずに検体を精製水で 6 倍希釈し直接 LAMP 試薬に添加する方法と比較した (Direct-LAMP 法)。

2. LAMP プライマー

HSV-1 検出用プライマーは、US4 遺伝子領域を標的遺伝子として設計を行った。また、HSV-2 検出用プライマーは、UL10 遺伝子領域を標的遺伝子として設計を行った。プライマーはすべて Primer Explorer Ver. 4.0⁹⁾ を用いて設計した。

3. LAMP 乾燥試薬

LAMP 乾燥試薬は、HSV-1 又は HSV-2 検出用プライマー、基質および酵素を含む LAMP 試薬を、反応チューブの蓋部分で乾燥を行い付着させた。LAMP 乾燥試薬の溶解は、PURE 法によって調製された核酸抽出液を、吸着剤入りチューブから直接 30 μ l 滴下して行った。滴下量については、乾燥試薬の付着したチューブについているラインを目安にすることで定量的に行うことが可能である。

4. LAMP 反応条件と陽性判定基準

Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (テラメックス社) を用い、65 $^{\circ}$ C で 40 分間反応した。判定は、遺伝子増幅による 0.1 以上の濁度上昇が認められた場合を陽性とし、検出された時間を Tt (Threshold time) 値とした⁹⁾。

5. 感度試験

LAMP 法の感度試験には、HSV-1/2 検出系ともに標的遺伝子領域を挿入したプラスミド DNA を用い、その希釈液で乾燥試薬を溶解して 6 重測定し検出限界を測定した。

また、新鮮分離 29 株 (HSV-1 15 株、HSV-2 14 株) の 10 倍希釈系列を作製し、ウイルス培養法との感度比較についても併せて行った。ウイルス培養法は、新鮮分離株の希釈系列を R-66 細胞に 4 ウェルずつ接種して 37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 条件下で培養を行い、細胞に変性が認められた場合 (CPE: cytopathic effect)、陽性と判定した。ウイルス培養法では 4 ウェルすべてに CPE が認められたものを (+)、1~3 ウェルの場合 (±)、未検出を (-)

とした。LAMP 法は、培養法と同一ウイルス量となるように調製したウイルス希釈液を用い、PURE 法にて抽出後、乾燥試薬にて測定を行った。100%の検出率を (+)、100%に満たない検出を (±)、未検出を (-) とした。

6. 臨床検体測定

子宮頸管と外陰部の病変部から採取したぬぐい液 15 例を、精製水に懸濁し検体として用いた。検体はウイルス分離培養後、FITC 標識抗 HSV モノクローナル抗体を用いて蛍光染色し、同定と型の決定を行い、[HSV-1 陽性、HSV-2 陰性] 5 例、[HSV-1 陰性、HSV-2 陽性] 5 例、[HSV-1 陰性、HSV-2 陰性] 5 例と判定された。使用した検体量は、ウイルス分離培養法と PURE-LAMP 法にはいずれも 500 μ l の検体を用いた。

PURE 法で抽出した HSV-1 および HSV-2 核酸抽出液を用いてそれぞれの試薬に対する特異性試験も併せて行った。

成績

1. 感度試験

プラスミド DNA を用いた LAMP 法感度試験では、HSV-1 は 4 コピー/テスト、HSV-2 は 6 コピー/テストまで 100%の検出率であった (Table 1、Fig. 2)。コピー数が減少すると共に検出時間が遅くなったが、40 分以内に増幅が確認された。

Table 1 LAMP sensitivity test

Conc. copies/test	HSV-1		HSV-2	
	Tt	%Positive	Tt	%Positive
0	N.D.	0.0%	N.D.	0%
2	35.0	33.3%	37.4	50%
4	21.3	100%	30.2	66.6%
6	22.8	100%	30.3	100%
8	22.2	100%	28.2	100%
10	19.8	100%	30.2	100%
10 ²	16.6	100%	23.0	100%
10 ³	15.2	100%	20.5	100%
10 ⁴	14.2	100%	19.0	100%
10 ⁵	13.1	100%	16.9	100%
10 ⁶	12.4	100%	16.0	100%

Tt: threshold time; N.D.: Not detected

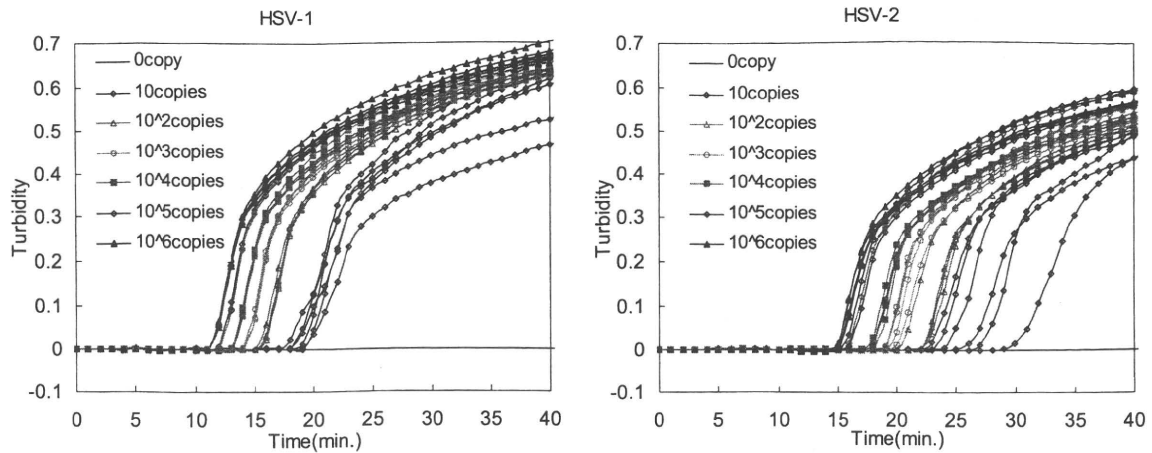


Fig. 2 LAMP amplification curve

新鮮分離株を用いた感度試験では、新鮮分離株 29 株を用いて PURE-LAMP 法 (n=3) とウイルス培養 (n=4) の検出感度を比較した (Table 2)。HSV-1 では、PURE-LAMP 法ではすべての株で 10^{-4} 希釈液まで 100% の検出率であり、ほとんどの株でウイルス培養より PURE-LAMP 法の方が 10~100 倍高い感度を示した。HSV-2 についても同様の結果であり、ほとんどの株で PURE-LAMP 法が培養法と比べて 10~100 倍検出感度が高かった (Table 3)。

2. 臨床検体測定

臨床検体を PURE-LAMP 法と Direct-LAMP 法で比較評価した (Table 4)。Direct-LAMP 法では、HSV-1 陽性 5 検体と HSV-2 陽性 5 検体の内、それぞれ子宮頸管より採取した 1 検体を検出できなかったが、PURE-LAMP 法では検出できた。PURE-LAMP 法の検出結果はウイルス分離培養法の結果と完全に一致した。PURE-LAMP 法の検出時間は HSV-1 で平均 13.6 分、HSV-2 は平均 16.8 分であった。Direct-LAMP 法はすべての検体で PURE-LAMP 法より Tt 値が遅れていた。HSV-1 と HSV-2 の間で交差性も見られなかった。

考 察

従来の核酸抽出法では煩雑なピペット操作や高速遠心分離操作が必要であり、臨床現場での遺伝子検査の実行が困難であったが、今回開発した PURE 法では専用容器

を用いることでピペット操作や高速遠心分離操作なしで簡易且つ迅速に核酸を抽出できる。また LAMP 反応試薬を乾燥試薬にすることで、直接反応試薬に核酸抽出液を添加・溶解して遺伝子増幅反応を開始することが可能になり、試薬準備を簡易にした。LAMP 法に PURE 法を組み合わせることで、子宮頸管あるいは外陰部ぬぐい液検体の HSV-1 と HSV-2 の簡易且つ迅速な遺伝子検出と型判別がより容易になった。鋳型抽出と測定準備に要する時間は 1 検体あたり 10 分以内、LAMP 反応時間が 40 分であるため、検体採取から検出までが 1 時間以内で可能となり、迅速診断として有用な測定法であると考えられる。

試薬性能は、LAMP 法でプラスミド DNA の検出感度が HSV-1 は 4 コピー/テスト、HSV-2 は 6 コピー/テストであり、PCR 法も含め現在報告されている遺伝子検査^{7),10),11)}、のなかでも高感度である。また新鮮分離株の希釈試験の結果から、HSV-1 と HSV-2 の検出に関して PURE-LAMP 法はウイルス培養法と比べて検出感度は同等以上であると考えられた。さらに、PURE-LAMP 法では HSV-1 と HSV-2 間での交差反応性は認められないことから、プライマーの特異性は高く、型判別が可能であることが示唆された。従来の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という欠点があった。一方、ウイルス分離培養法では感度は良いが時間を要する等の欠点があり、迅速に同定と型判別することは困難であった。HSV の型を調べることは、性器ヘルペスの再発の予後を推定

Table 2 Comparison of sensitivity between LAMP and Viral Culture (HSV-1)

No.	Dilution of seed virus	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
1	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
2	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	±	±	-	-	-
3	PURE-LAMP	+	+	+	+	-	-
	Viral culture	+	+	±	±	-	-
4	PURE-LAMP	+	+	±	-	-	-
	Viral culture	±	-	-	-	-	-
5	PURE-LAMP	+	+	±	-	-	-
	Viral culture	+	±	-	-	-	-
6	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
7	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	+	±	-	-	-	-
8	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	±	±	-	-	-	-
9	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	+	-	-	-	-
10	PURE-LAMP	+	+	+	+	±	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
11	PURE-LAMP	+	+	+	+	±	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
12	PURE-LAMP	+	+	+	+	-	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
13	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	+	-	-	-	-	-
14	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	-	-	-	-	-
15	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	±	-	-	-	-	-

+ : LAMP ; detection rate 100%, Viral culture ; CPE * positive 100%
 ± : LAMP ; detection rate less than 100%, Viral culture ; CPE positive less than 100%
 - : LAMP ; not detected, Viral culture ; CPE negative
 * CPE : cytopathic effect

Table 3 Comparison of sensitivity between LAMP and Viral culture (HSV-2)

No.	Dilution of seed virus	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
16	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	+	+	-	-	-
17	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	+	±	-	-	-	-
18	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
19	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	+	±	-	-	-	-
20	PURE-LAMP	+	+	-	-	-	-
	Viral culture	+	-	-	-	-	-
21	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	±	-	-	-	-	-
22	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	+	±	±	-	-
23	PURE-LAMP	+	+	+	±	-	-
	Viral culture	+	+	-	-	-	-
24	PURE-LAMP	+	+	+	+	±	-
	Viral culture	+	+	+	±	±	-
25	PURE-LAMP	+	+	+	+	±	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
26	PURE-LAMP	+	+	±	-	-	-
	Viral culture	+	+	±	-	-	-
27	PURE-LAMP	+	+	+	+	±	-
	Viral culture	+	+	+	±	-	-
28	PURE-LAMP	+	+	+	+	-	-
	Viral culture	+	±	±	-	-	-
29	PURE-LAMP	+	+	+	-	-	-
	Viral culture	±	-	-	-	-	-

+: LAMP ; detection rate 100%, Viral culture ; CPE positive 100%

± : LAMP ; detection rate less than 100%, Viral culture ; CPE positive less than 100%

- : LAMP ; not detected, Viral culture ; CPE negative

Table 4 Comparison of sensitivity and specificity among viral culture, PURE-LAMP and Direct-LAMP using clinical specimens

Type	Patient	Sample	Viral culture result	PURE-LAMP				Direct-LAMP			
				HSV-1		HSV-2		HSV-1		HSV-2	
				Tt	result	Tt	result	Tt	result	Tt	result
HSV-1	541	V	+	14.2	+	N.D.	-	16.9	+	N.D.	-
	542	C	+	12.8	+	N.D.	-	16.2	+	N.D.	-
	567	V	+	12.5	+	N.D.	-	28.5	+	N.D.	-
	568	C	+	14.4	+	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-
	649	V	+	14.2	+	N.D.	-	18.4	+	N.D.	-
HSV-2	317	C	+	N.D.	-	16.8	-	N.D.	-	N.D.	-
	491	V	+	N.D.	-	17.2	-	N.D.	-	30.1	-
	492	C	+	N.D.	-	17.8	-	N.D.	-	33.2	-
	635	V	+	N.D.	-	16.9	-	N.D.	-	25.2	-
	871	V	+	N.D.	-	16.2	-	N.D.	-	23.7	-
negative	471	V	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-
	472	C	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-
	476	C	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-
	526	V	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-
	527	C	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-	N.D.	-

V: specimen from the vulva

C: specimen from the uterine cervix

Tt: threshold time; N.D.: Not detected

する上で有用であり、本試薬を用いることにより型判別が容易になった。

PURE 法の必要性を検証するために、臨床検体を直接 LAMP 反応液に供して HSV DNA を検出する Direct-LAMP 法と PURE-LAMP 法の比較を行った。その結果、Direct-LAMP 法では検出時間の遅れや偽陰性を示す検体が認められたが、PURE-LAMP 法はウイルス分離培養法との判定結果が完全に一致し、臨床検体での検出感度と特異性は培養法と同等と考えられた。このことから、PURE 法では検体由来の阻害物を効率よく除去できたと推察され、したがって本法の対象検体である子宮頸管あるいは外陰部ぬぐい液では PURE 法での前処理が必要であると考えられた。

今回の評価に使用したウイルス培養法陰性検体からは PURE-LAMP 法では HSV-1 と HSV-2 は全く検出されず、ウイルス分離培養法との乖離は見られなかった。しかし、本法は高感度であり、性器に無症候で排泄される少量の HSV DNA を検出する可能性もあるため今後

検体数を増やして検討する必要がある。

以上、簡易且つ迅速な PURE-LAMP 法は検体からの HSV-1 と HSV-2 の検出結果がウイルス分離培養法と一致しており、煩雑な操作が不要であるため臨床現場で使用可能な遺伝子検査法が構築できると考えられる。

本報告は、日本性感染症学会第 22 回学術大会(京都府 2009 年 12 月 13 日)に発表したものに加筆修正したものである。

文献

- 1) 川名 尚: 性器ヘルペスウイルス感染症 (性器ヘルペス). 日性感染症会誌, 2009; 20(1): 45-49.
- 2) 性感染症診断・治療ガイドライン 2008; 病状とその鑑別診断; 潰瘍性病変. 日性感染症会誌, 2008; 19(1) (supp): 18-23.
- 3) Notomi, T, Okayama, H, Masubuchi, H, Yonekawa, T,

- Watanabe, K, Amino, N, et al. : Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 ; 28 : E63.
- 4) Wald, A, Huang, ML, Carrell, D, Selke, S, Corey, L : Polymerase chain reaction for detection of herpes simplex virus (HSV) DNA on mucosal surfaces : comparison with HSV isolation in cell culture. *J. Infect. Dis.* 2003 ; 9 : 1345-1351.
- 5) Enomoto, Y, Yoshikawa, T, Ihira, M, Akimoto, S, Miyake, F, Usui, C, et al. : Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J. Clin. Microbiol.* 2005 ; 43 : 951-955.
- 6) Kaneko, H, Iida, T, Aoki, K, Ohno, S, Suzutani, T : Sensitive and Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Microbiol.* 2005 ; 43 : 3290-3296.
- 7) 塚越静香, 川名 尚, 西澤美香, 金子久俊, 西井 修, 錫谷 達夫 : Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) 法による性器ヘルペス迅速診断. *日性感染症会誌*, 2006 ; 17(1) : 104-109.
- 8) <http://primerexplorer.jp/>
- 9) Mori, Y, Nagamine, K, Tomita, N, Notomi, T : Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 ; 289 : 150-154.
- 10) Julie, B, Andreas, N, Belinda, B, Elise, W, Geoff, H, Tuckweng, K : Detection and subtyping of Herpes simplex virus in clinical samples by LightCycler PCR, enzyme immunoassay and cell culture. *BMC. Microbiology.* 2002 ; 2 : 12-19.
- 11) Heide, R, Ariane, B, Jana, D, Thomas, G, Klaus, K : Clinical Validation of a New Triplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection and Discrimination of Herpes simplex Virus types 1 and 2. *J. Mol. Diagn.* 2008 ; 10 : 361-367.

II. 感染症

8. 単純ヘルペスウイルス

帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科 かわな たかし 川名 尚

筆者が執筆する項目の感染症は、単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus : HSV) であるが、このウイルスは脳、眼、口、皮膚、性器など体全体に感染する。産婦人科領域で問題になるのは性器の感染症「性器ヘルペス」であるので、本稿では性器ヘルペスの診断という立場で論述することにする。

性器ヘルペスを正しく診断することは、この疾患に著効を示す抗ウイルス薬があるので臨床的に特に重要である。また、周産期においては抗ウイルス薬の開発された今日でも約30%の死亡がみられる新生児ヘルペスの予防のために、

感染病態も含めて正しく性器ヘルペスを理解することが必要となる。

性器ヘルペスの症状は多彩である一方で、性器ヘルペス様の症状を呈する他の疾患も多いので正しく診断するには臨床検査が必要となる。

性器ヘルペスの感染病態

HSVは皮膚・粘膜を通してヒトに感染すると感染部位で増殖するとともに知覚神経末端に入る。そして、速やかに知覚神経を上行して知

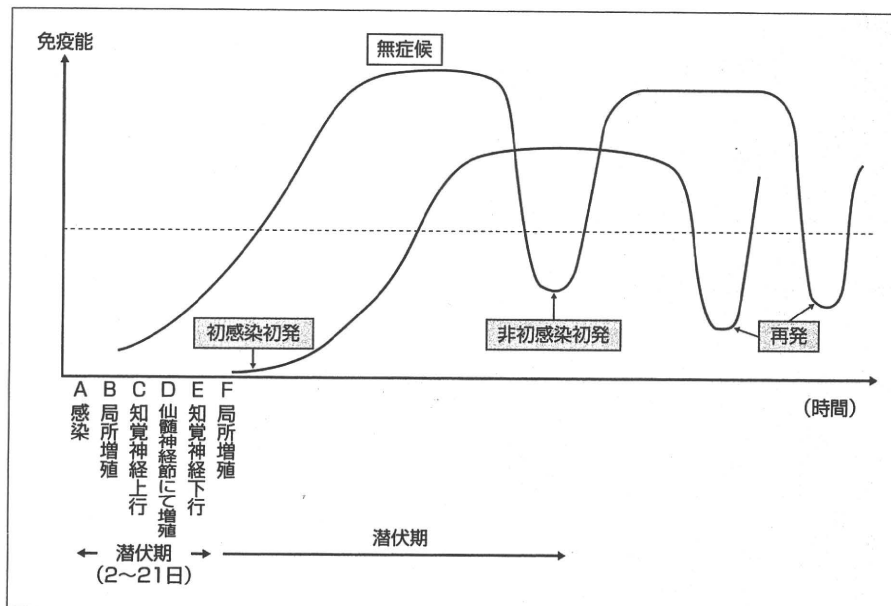


図1 性器ヘルペスの感染病理モデル

覚神経節（仙髄神経節）に潜伏感染する。潜伏感染している HSV は何らかの刺激により再活性化され再び知覚神経を下行し皮膚・粘膜に現れここで増殖して水疱や浅い潰瘍性病変を作る。この際、宿主の免疫（非特異的・特異的）が早期にできれば発症を免れるが、もしできないと発症することになり、この場合は初感染初発とよばれる。無症候に済んだ場合でも後に何らかの状況で免疫が落ちてくると発症することがあり、この場合は非初感染初発とよばれる。後者では発症時にすでに抗体を有しているので鑑別できる。潜伏している HSV が再活性化された場合、全身的・局所的免疫が低下していると再発を繰り返すことになる（図1）。

臨床的には性器ヘルペスは初めて発症する初発と、すでに発症の経験があり繰り返し発症する再発とに分類される。前述のように、初発は



図2 HSV-1による初感染初発

さらに初感染初発と非初感染初発に分けられる。HSVには1型（HSV-1）と2型（HSV-2）があり、性器には両方とも感染する。HSV-2に感染した場合はHSV-1に感染した場合よりはるかに再発しやすい。また、HSV-2は神経向性が強く、髄膜炎や末梢神経麻痺による排尿・排便困難を起ししやすい。このように、感染している HSV の型によって予後が異なるので HSV の型までわかる臨床検査が望ましい。

臨床診断

典型的な場合は、臨床症状から診断は可能であるが、臨床検査により確認することが望ましい。

初発

1. 初感染初発：感染の機会があってから平均3～7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）。一般的にはまず水疱ができこれが破れて潰瘍またはびらんになるが、粘膜面では最初から潰瘍またはびらんとなることが多い。外陰部の疼痛は排尿や椅子に腰かけることもできないほど強く、時に歩行も困難となる。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。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。外陰の病変に尿が触れることによる排尿痛や膀胱内の HSV の感染による膀胱炎症状もみられる。女性では約3割に、男性では約1割に無菌性髄膜炎を併発するとされている。これらの例では、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。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、抗ヘルペスウイルス薬を投与すると約 1 週間でかなり軽快する。初感染の臨床症状は様々で、前述のような強い急性症状を呈するものから無症状のものまである。初感染の約 70% は無症候といわれている。

2. 非初感染初発：発症は初めてであるが、実は無症候のうちすでに知覚神経節に潜伏感染していた HSV が再活性化され発症したものである。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。

筆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¹⁾。

再発

以前に発症したことが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

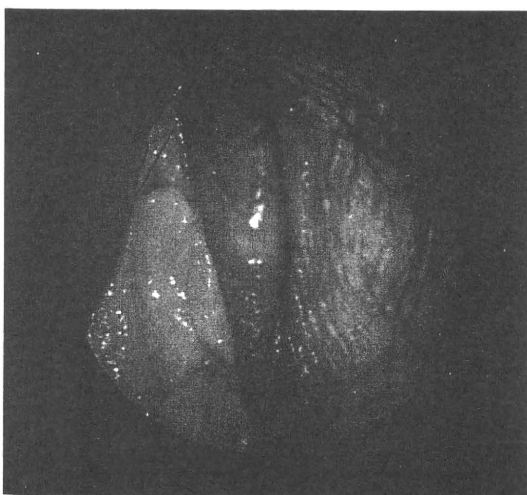


図3 HSV-2 (+) による再発性器ヘルペス

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、時に別の部位や殿部に発症することもある。病変は小水疱や潰瘍性病変が 1～数个出現する(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。再発する前に大腿後面に神経痛様の疼痛があったり、再発する部位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。HSV が再活性化し知覚神経を刺激しているためであろう。再発の頻度は HSV-2 感染例のほうが HSV-1 感染例よりもはるかに多い。HSV-2 感染例では 1 年間で平均 4 回、60% の症例で 6 回、20% は 10 回以上再発するという²⁾。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、再発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 を著しく損ねることになる。このような観点から、抗ヘルペスウイルス薬を持続的に服用し再発を抑制する「再発抑制療法」が開発され、わが国でも保険で可能になった。

HSV の型と臨床型

筆者の経験した 800 例の女性性器ヘルペス患者の臨床型と分離した HSV の型との関係を見ると、全体としては HSV-1 が 41.4%、HSV-2 が 58.6% であり、わが国の女性性器ヘルペスからはかなりの頻度で HSV-1 が分離されることが判明した。

臨床型との関係を見ると初発 545 例のうち 296 例 (54.3%) が HSV-1、249 例 (45.7%) が HSV-2 で HSV-1 のほうがやや多かった。一方、再発型 255 例についてみると HSV-2 が 86.3% であり、大部分は HSV-2 によって発症している。このことは、性器には HSV-1 と HSV-2 が感染

するが、HSV-1よりHSV-2のほうが潜伏感染しやすく、また再活性化されやすいことを意味している³⁾。

広い性器ヘルペスのスペクトラム (表1)

性器ヘルペスといえば上述のような外陰の症状を示すものではあるが、実は外陰に出現する病変は多様であるだけでなく、時に外陰に病変がなく子宮頸部にのみ黄色い壊死性の病変を認めることもある。外陰の非典型的な病変としてピンホール程度のごく小さいもの、片側性のもの、線状のもの、時に深い潰瘍もみられる。外陰に病変がなく、肛門に浅い潰瘍性病変をみることがある。しばしばこのような病変が痔として治療されている。

殿部に水疱性の病変がみられることがあるが、これは性器に感染したHSVの再活性化によることが多い。また、HSVによる膀胱炎もある。まれではあるが、神経症状が前面に出てくる場合もある。その他まったく症状もなく無症候にHSVが排泄されることもある。このように性器のHSV感染は臨床的に広いスペクトラムを

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)	殿部
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
3. 無症候性 HSV 排泄	

有する。

性器ヘルペスの鑑別診断 (表2)

上述のように、性器ヘルペスは様々な形の病変を形成するためにその他の原因によって起きる潰瘍性病変や水疱性病変などと鑑別する必要がある。その代表的な例を挙げると、感染性のもでは性器カンジダ症、細菌性外陰炎、带状疱疹、梅毒の硬性下疳などがある。非感染性のもではよく誤診されるのが急性外陰潰瘍 (Lipschütz 潰瘍) である。本疾患も若い女性に急性に潰瘍が出現し、強い疼痛や発熱があるので性器ヘルペスの初感染初発と酷似しているが、急性外陰潰瘍は潰瘍が深いこと、口腔内アフタが併発したりまたはその既往がみられること、発熱が数日以上続くこと、CRPが陽性、性的接触がないことなどが性器ヘルペスとの鑑別点となる。

その他、筆者に性器ヘルペスとして紹介された患者のなかには接触皮膚炎、硬化性苔癬、Paget 病、プレオマイシン軟膏による潰瘍などがある。性器ヘルペスの肉眼的診断は典型的な例を除いて難しい場合が多い。以前からよくいわれていた「浅い潰瘍性病変が左右対称性に多発する」(kissing ulcer) という教科書的な症例

表2 性器ヘルペスの鑑別診断

外陰の潰瘍・びらんを呈する疾患	
・感染性	性器カンジダ症 細菌性外陰炎 带状疱疹 梅毒
・非感染性	急性外陰潰瘍 (Lipschütz 潰瘍) 接触性皮膚炎 硬化性苔癬 Paget 病 外傷 薬剤性 尋常性天疱瘡

は3割程度しかないといわれている。分娩時に性器ヘルペスを合併した場合は帝王切開が選択されるので、その診断は正確でなければならないが実際はかなり難しい。Gardellaらは、分娩時性器ヘルペスと診断して帝王切開を行ったが、後方視的にみると培養法で26%、感度のよい核酸増幅法を用いても46%しか陽性でなかったと報告している⁴⁾。いかに肉眼的診断が難しいかがわかる。性器ヘルペスの病巣が様々な形を取るうえに上述のような性器ヘルペスに似た症状を示す疾患があるので、臨床検査、なかでも病原診断は必須である。

性器ヘルペスの臨床検査

臨床検査では、HSV感染の証明だけでなく、感染しているHSVが1型なのか2型なのかの型別診断も重要である。臨床検査には病原診断と血清診断がある。

病原診断

これは、HSVそのものかHSV感染細胞に出現する抗原を検出する方法で、HSVそのものの存在を証明するので血清診断より直接的であり確実である。

現在用いることのできる方法は、ウイルスの分離培養、蛍光抗体法によるHSV感染細胞の

検出、PCR法またはLAMP法による核酸増幅法である。その長所と短所を表3に示した。保険適用のあるのは蛍光抗体法であるが、この方法は、病変部を擦過して得た細胞を無蛍光スライドに塗抹してアセトン固定した後、蛍光標識マウスモノクローナル抗体を用いてHSV抗原を証明する方法である。特異度は高いが感度が20~30%と非常に低い。その理由は、性器ヘルペスでは小さい潰瘍性病変であることが多く、感染細胞を十分に採取できないうえに染色の過程で擦過細胞が剥がれ落ちてしまうためである。保険適用はないがウイルスの分離培養法が感度・特異度ともに優れたgold standardであるが、検体の搬送に注意が必要であり培養の結果を得るのに2~7日間もかかるうえに費用もかかるのが欠点である。この点核酸増幅法は、感度・特異度ともに優れているうえに検体の採取・搬送も容易であり、しかも結果は2時間位で出るので優れた方法である。現在、PCR法やLAMP法が開発中である。LAMP法(Loop-mediated isothermal amplification)はわが国で開発された新しい核酸増幅法で、その特徴は一定の温度で核酸を増幅できる点である。したがって、用いる器具も比較的簡易なものでよく、将来ベッドサイドで用いることができる可能性もある。HSV-1とHSV-2を検出するための良好なプライマーがそれぞれ案出されているので、性器ヘルペスの型別迅速診断が可能である⁵⁾。

表3 性器ヘルペスの病原診断法

	ウイルス分離培養法	蛍光抗体法	核酸増幅法 (PCR法・LAMP法)
感度	高	低	高
特異度	高	高	高
検体の保存・搬送	難	容易	容易
時間	2~7日	2時間	2時間
費用	高価	安価	やや高価
長所	感染性の証明 ウイルス株を得る	保険適用	超高感度

分離培養法と核酸増幅法はともに感度・特異度はよいが、前者は生きたウイルスが必要であるので治りかけの病変では陰性になることがあるが、後者はウイルス DNA が少しでもあれば陽性になる点が有利である。一方、後者は感度が非常によいため微量の無症候性排泄なども検出してしまうこともあるので、臨床的な意義を考慮しつつ評価しなければならない。

血清診断

補体結合法や中和法などによる血清診断は、急性期と回復期の2回のペア血清を用いて抗体が陽転するか4倍以上の上昇をもって診断する方法である。しかし、性器ヘルペスの確定診断は上記の病原診断が基本であり、血清診断の臨床的意義は少ない。その理由は、初感染初発では症状が強く一刻も早く診断し抗ヘルペスウイルス療法を始めることが求められるが、急性期

では血清抗体は陰性であり、陽転するまで1～2週間を要するからである。また、再発や非初感染初発では発症時と回復時で抗体の動きはあまりないことが多いため、性器ヘルペスを否定してしまう恐れもあるからである。

しかし、2008年4月より保険適用になったELISA法による免疫グロブリンクラス別抗体測定法は、感度がよだけでなく従来の補体結合法や中和法と違ってきめの細かい血清診断が可能になった(図4)。初感染では発症後最初の1週間位はIgM・IgG抗体とも陰性で、その後IgM抗体が上昇する。次いでIgG抗体が検出できるようになる。IgM抗体は7～10日位で大部分が陽性になる⁶⁾。今回認可されたELISAキットでは、HSV-1抗体とHSV-2抗体の両方とも検出できるがHSVの型の診断はできない。IgG抗体は上昇するが、筆者の経験では風疹などのように急峻に高い値を取ることは

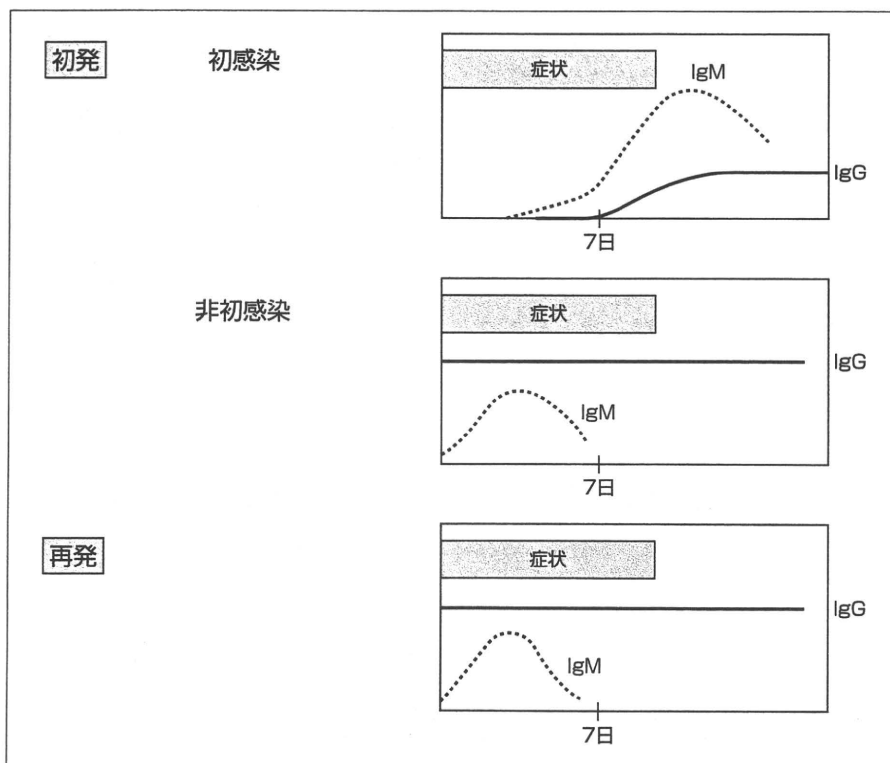


図4 感染病態と血清抗体推移

なさそうである。非初感染初発や再発では発症時から比較的高いIgG抗体が検出され、値の変化は軽度かほとんどない。時にIgM抗体も検出されるが低いことが多い。

血清診断で注意しなければならないことは、外陰に性器ヘルペスを疑わせるような病変がある時にHSVのIgG抗体が検出されたということだけで性器ヘルペスと診断してはならないことである。その理由は、人口の約50%は幼少時にHSV-1に感染しているため、IgG抗体が陽性となっているので当該病変が性器ヘルペスという根拠とはならないのである。ただし、この場合でも高いIgM抗体が検出されればHSVの感染がかなり疑わしくはなる。

型特異的抗体検出法

型特異的抗体とはHSV-1特異的またはHSV-2特異的抗体のことをいう。HSV-1とHSV-2は共通抗原があるため通常の方法では型特異的な抗体の検出はできない。しかし、HSVの表面にある糖蛋白のうちglycoprotein G (gG)といわれるものはHSV-1とHSV-2と抗原的に異なるところが多いので、これらをそれぞれ精製して抗原として用いることにより型特異的な抗体の検出が可能になった。HSV-1は口腔と性器

の両方に感染するが、HSV-2はほとんどが性器の感染であるので、HSV-2特異抗体（以下HSV-2抗体とする）が検出されれば性器の当該病変がHSV-2による性器ヘルペスの可能性が高い。現在は保険適用がないが、性器ヘルペスの診断にはおおいに役立つ。ただし、これらのキットはIgG抗体を検出するので感染の初期にはIgG抗体が出現していないため陰性になるので、初感染の診断には適当ではない。また、gG-1 (HSV-1のgG)はgG-2 (HSV-2のgG)よりも抗原性が弱いようなので抗体検出感度はさらに低下する⁷⁾。

病原診断により感染しているHSVの型を決めると同時に血清抗体を型特異的に検出すると表4のような感染病態まで診断することが可能になる。理想的にはこのレベルの診断をしたい。現在は保険では型特異抗体を調べることができないので、せめてELISA法によりIgM・IgG抗体を検索してその感染病態を明らかにすることが望まれる。

性器ヘルペスの診断の実際 (図5)

外陰、子宮頸部、肛門、殿部などにヘルペス

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		

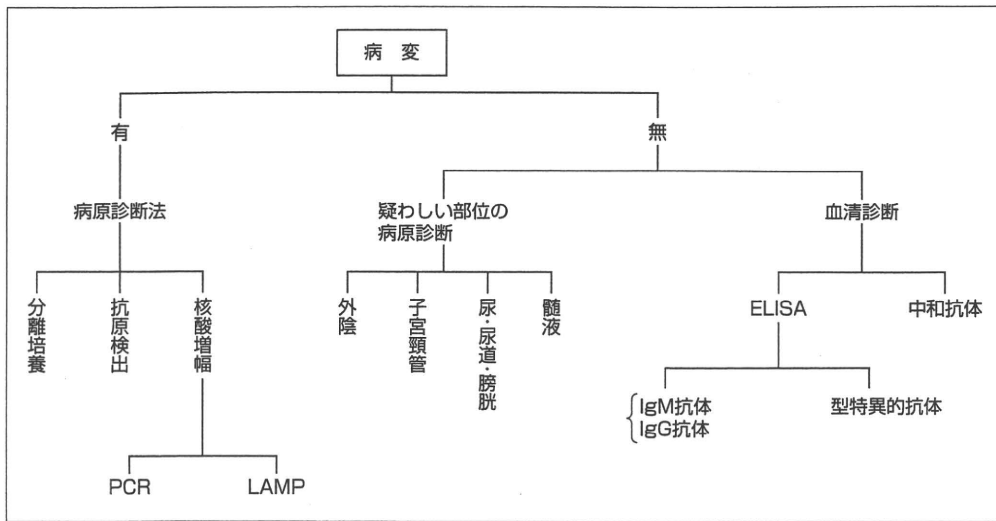


図5 性器ヘルペス診断のプロセス

を疑わせる病変があればまず病原診断を行う。病原診断のため検体を採取する病変がまったくないか、発症してから時間が経ってしまった時は、初発ではIgM抗体の検出を行い高い値の時は診断の参考になる。また、HSV-2抗体が検出された場合は性器ヘルペスの疑いが強くなる。

病変があっても現在保険で行うことができる蛍光抗体法は感度が悪いので、陰性となっても性器ヘルペスが疑わしい場合には血清診断を併用することが勧められる。

性器ヘルペスには非典型的な症状が多いので、見逃さないために次のような場合は一応性器ヘルペスも鑑別診断に加えて検査することが望ましい。

- ①くり返しほぼ同じ部位に病変が出現する。
- ②大腿の後面に違和感や神経痛がある。
- ③潰瘍性や水疱性病変（大きさや数は限らず）がある。
- ④肛門周囲の潰瘍性病変
- ⑤子宮腔部の黄色い壊死性病変
- ⑥原因不明の尿道炎

これらの症状がある時は病変があれば病原診

断がよいが、ない時にはHSV-2抗体の検出を試み、もし陽性の場合は性器ヘルペスの可能性もあるので、そのつもりで臨床的な観察を続けることがよいであろう。

おわりに

現在、精度のよい核酸増幅法による病原診断法や型特異抗体の検出は保険で行えないため、性器ヘルペスを正しく診断することは困難である。そこで、臨床症状による診断がおもになるしかないが、せめて核酸増幅法による病原診断が1日も早く保険で可能になるよう切望している。

●文献●

- 1) 川名 尚：初発性器ヘルペスの感染病態，日産婦会千葉誌 2008；1：10-12.
- 2) Benedetti J, Corey L, Ashley R：Recurrence rates in genital herpes after symptomatic first-episode infection. Ann Intern Med 1994；121：847-854.
- 3) 川名 尚：産婦人科感染症診療マニュアル II 性感染症「単純ヘルペスウイルス」産と婦 2008；75：1490-1498.
- 4) Gardella C, Brown ZA, Wald A, et al：Poor correlation

between genital lesions and detection of herpes simplex virus in women in labor. *Obstet Gynecol* 2005 ; 106 : 268-274.

- 5) 塚越静香, 川名 尚, 西澤美香, 金子久俊, 西井 修, 錫谷達夫: 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* 2006 ; 17 : 104-109.
- 6) 小泉佳男, 川名 尚: 女性性器の単純ヘルペスウイルス初感染における抗体推移に関する研究 *日産婦会誌* 1999 ; 51 : 65-72.
- 7) 西澤美香, 川名 尚, 村田照夫, 西井 修: 女性性器の単純ヘルペスウイルス初感染における型特異的

血清診断に関する研究.

●著者連絡先

〒 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
 川名 尚
