

図1 性器ヘルペスウイルス感染症

性器ヘルペスは2006年以降、現象傾向に見えるが、これは再発例を登録しなくなったためで減少したのではない。2009年、2010年の数値は発生動向調査IDWRの月報報告数を合計したもの。2011年は9月までの月報報告数を1.33倍したもの。

(IDWR 感染症発生動向調査月報より)

性器クラミジア感染症や淋菌感染症は2002年をピークに明らかに減少傾向にあるため性感染症は減っているとの見方がある。性器ヘルペスも2006年以後、減少傾向にあるが³⁾、これは2006年より初発例のみを登録し、再発例を登録しないことになったためと考えられる。性器ヘルペスの中で再発の占める割合は5割以上はあるため再発を登録しなくなれば半分近くに減るはずであるが、2010年には2005年の8割位までにしか減っていない(図1)。男性に比べ女性のほうが1.5倍位多いが³⁾、これは世界的にも同じ傾向にある。女性性器は粘膜面が男性性器よりも広く、感染しやすいからではないかと考えている。

年齢分布を見ると、性器ヘルペスは他の性感染症と違って40代以上の高齢者にもかなりの初

発例の報告があるが³⁾、その多くは、若い時代に感染し潜伏していたHSVが再活性化したことによるのではないかと考えている。

2. 性器ヘルペスにおける1型と2型の分布

1968年、HSVには抗原的に一部異なる1型と2型があることが発見されたとき、もっとも注目されたことは、2型は性器などの下半身に、1型は口・眼などの上半身に感染するという棲み分けが行われているということであった²⁾。それ以後、欧米では性器ヘルペスは2型の感染によるということになってしまった。しかし、筆者が³⁾1976年に、わが国の女性性器ヘルペスについて検討したところ、何と43%も1型が検出されたのであった³⁾。ところが最近になって、欧米諸国から若い女性を中心に1型による性器ヘルペスが急増してい

HSV-1 (herpes simplex virus, type 1; 単純ヘルペスウイルス1型)

HSV-2 (herpes simplex virus, type 2; 単純ヘルペスウイルス2型)

るという報告が相次いでいる^{4) 5)}。これらの論文の筆者らはその理由として、HIV感染が拡まりつつある欧米では性器による性交を避け、オーラルセックスが頻繁に行われるようになったこと、さらに、その背景に若年層のHSVの抗体保有率の減少をあげている。

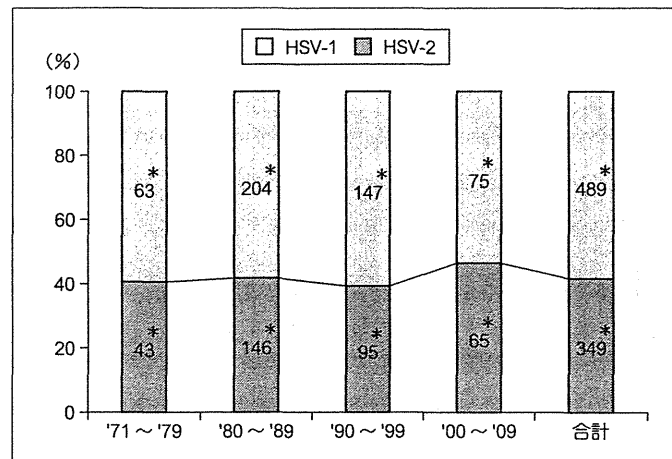


図2 女性性器ヘルペスにおけるHSV型の年次推移

* 症例数

この40年間、女性性器のヘルペスの型の分布はあまり変わっていない。
 HSV-1：単純ヘルペスウイルス1型、HSV-2：単純ヘルペスウイルス2型
 (筆者作成)

表1 わが国におけるHSV-1, HSV-2抗体保有率の変化

年	対象	HSV-1	HSV-2	N	
1970	男性	75.3%	10.2%	71	橋戸
	女性	80.6%	9.9%	88	
1977	妊婦	67.3%	6.8%	205	川名
1989	妊婦	50.0%	6.7%	90	橋戸
	CSW	75.7%	78.6%	70	
1993	男性	54.4%	1.8%	105	橋戸
	女性	59.6%	1.2%	158	
1996	妊婦	51.0%	7.2%	417	川名
1998	妊婦	50.0%	4.0%	50	蒔田
2002	男性	40.0%	2.0%	145	熊本
	女性	43.0%	8.0%	54	
2003~5	女子学生	34.0%	5.9%	323	川名

HSV抗体保有率は急激に減少している。

HSV-1：単純ヘルペスウイルス1型、HSV-2：単純ヘルペスウイルス2型
 CSW：commercial sex worker

(筆者作成)

前述の如く、わが国の状況はと言うと、筆者の研究では1970年代に1型による女性性器ヘルペスが43%もあったが、その後の30年を10年ごとにまとめて1型と2型の分布を見たところ、この40年間、女性性器ヘルペスの約40%は1型によるもので、ほとんど変化がみられていない(図2)。しかし、若い年代のHSV抗体保有率は明らかに低下しており、この傾向は欧米と同じである。1970年代は80%以上の女性がHSV抗体を有していたが、2000年に入ると、若い女性の40%しかHSV抗体が陽性ではない(表1)。言い換えると、60%以上の若い女性がHSVに対する免疫がないためHSVの初感染の候補者となり得る。HSVの感染はおもに接触感染であるが、成人してからの濃厚な接触は性的接触であることを考えると、今後、若い女性の性器ヘルペスが増える可能性を示唆しているように思う。

わが国の2型に対する抗体保有率は5~10%であり、世界的にみると低いほうである。2型の抗体保有率は性的活動の指標と考えている学者が多いが、もし本当ならば、今までのわが国は性的活動があまり活発ではなかったということになる。もっとも、現在の若い世代の性的活動はかなり活発であるため、今後はこれらの傾向は変化する可能性がある。

III 性器ヘルペスの臨床と感染病理

1. 性器ヘルペスの臨床

HSVは皮膚・粘膜をとお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。すみやかに知覚神経を上行して知覚神経節(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、ふたた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。臨床的には性器ヘルペスは、初めて発症する初発と、くり返し発症する再発に分類されている。初発はさら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、後者はすでに感染してい

たHSVの再活性化によって初めて発症したものである。

(1) 初 発

① 初感染初発

感染の機会があつてから平均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~無数のものまでである。

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、ときに歩行も困難となる。外陰だけでなく子宮頸部からも60~70%にHSVが検出される。両側の鼠径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ともなう⁶⁾。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。髄膜刺激症状のため、頭痛や項部硬直、ときに羞明感を訴える。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、とき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、2型の神経向性がうかがわれる。

初感染初発では発症時にHSV抗体が陰性で2~3週後にIgM(免疫グロブリンM)抗体が陽転する。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さまざまで、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である。初感染の約70%は無症候と言われている。

男性の場合は感染の機会があつてから2~10日間の潜伏期の後、性器にかゆみや違和感をともなった直径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週間前後にもっとも重症化する。その間、鼠径リンパ節の腫脹や尿道分泌物もみられる。病変は亀頭、陰茎体部に多い⁷⁾。

② 非初感染初発

発症は初めてであるが、無症候のうちに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。したがって、発症時にすでにHSV抗体(IgG [免疫グロブリンG] 抗体)は陽性である。症状は前述の初感染と同様であるが、一般的にはより軽く、病変の数はより少なく、鼠径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いことが多い。

(2) 再発

以前に発症したことのある例がふたた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。病変は小水疱や潰瘍性病変が1～数个出現する。発熱することもなく、鼠径リンパ節が腫脹することも少ない。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2型感染例のほうが1型感染例よりもはるかに多い。再発の契機となるのは、心身の疲労、風邪などの発熱、女性では月経や妊娠などが多く、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。再発する部位は大体同じであるが、ときに反対側や臀部、大腿部に発症する。男性の場合は初感染時とほぼ同じ部位に、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、症状は軽く治癒までの期間も1週間と短い。

再発をく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 (quality of life) 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、本療法はわが国でも保険で可能になった。

性器ヘルペスの典型的な例は前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にはさまざまな形がある。たとえば、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、ときに深い潰瘍もみられる。外陰に病変がなくとも、肛門の浅い潰瘍性の小病変をみることがある。臀部に水疱性病変がみられることがあり、子宮腔部に黄色い壊死性病変がみられることもある。また、HSVによる無菌性の膀胱炎や尿道炎もある。まったく症状もなくHSVが排泄されることもある。このように、性器の単純ヘルペスウイルス感染はさまざまな病変を呈するが、一方で、同じような形の病変でありながら性器ヘルペスではない疾患があるため、病原診断による確定診断が必須である。

2. 性器ヘルペスの感染病理

性器ヘルペスの感染病理を以下のように考えている(図3)。性器の小さな傷などに侵入したHSVはまず局所で増殖する。そこですみやかに知覚神経末端から神経に入り、上行して知覚神経節や自律神経節に入る。ここで増殖した後、一部はふたたび知覚神経を下行し外陰に現れる。このとき、特異的、非特異的(自然)免疫能が低いと発症する(初感染初発)。一方、免疫能が高いと発症を抑えてしまうが知覚神経節にはHSVが潜伏しているため、のちに何らかの原因で免疫能が低下すると発症してしまう(非初感染初発)。

どちらの場合も、発症する前にすでに潜伏感染が成立していると考えられ、発症時に来院し、ただちに抗ウイルス薬を用いて治療を行っても潜伏しているHSVは排除できないため、治療を如何に早く行っても潜伏しているHSVの再活性化による将来の再発は防げない。初感染初発と非初感染初発は潜伏期の長さの違いとして説明できるのではないかと考えている。

筆者が診察した性器ヘルペスの病型について見ると初発514例のうち、初感染初発が295例(57%)、非初感染初発が219例(43%)で、非初感染初発がかなり多いことがわかった(表2)。

IgG (免疫グロブリンG)

74 (802)

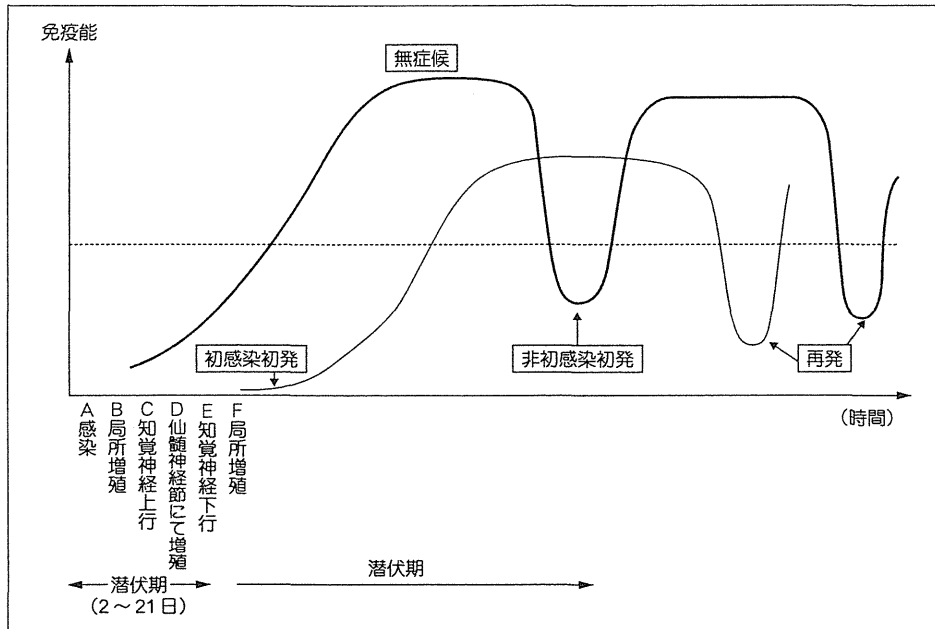


図3 性器ヘルペスの経時的感染病理モデル(仮説)

HSVは性器に感染後、仙髄神経節に潜伏感染し、これが時間経過とともに知覚神経を下行し性器に出現し発症する。発症には免疫能の低下が関連している。

(筆者作成)

表2 性器ヘルペスの感染病態の分布(1973～2009年)

		分離 HSVの型	例数
初発 514	初感染 295 (57%)	HSV-1 HSV-2	204 (69.1%) 91 (30.8%)
	非初感染 219 (43%)	HSV-1 HSV-2	81 (36.9%) 138 (63.0%)
再発 228		HSV-1 HSV-2	27 (11.8%) 201 (88.2%)
計 742		HSV-1 HSV-2	312 (42.0%) 430 (58.0%)

初発ではHSV-1のほうが多いが、再発ではHSV-2が圧倒的に多い。

HSV-1：単純ヘルペスウイルス1型、HSV-2：単純ヘルペスウイルス2型

(筆者作成)

3. 性器ヘルペスにおける1型と2型の違い

(1) 感染病理の違い

初発例では初感染初発の295例のうち、204例(69.1%)が1型、91例(30.8%)が2型であっ

たのに対し、非初感染初発219例では1型が81例(36.9%)、2型が128例(63%)となり、1型と2型の占める割合が逆転している。2型による初発例の60%は非初感染初発であるというこ

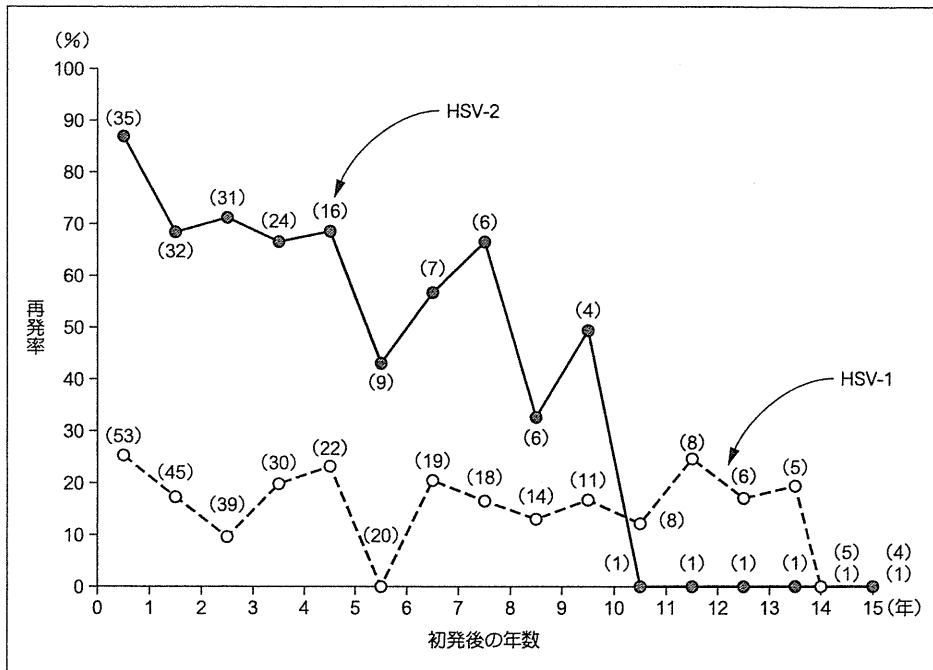


図4 女性性器におけるHSV-1またはHSV-2初感染例の年次別再発率
 HSV-2感染例の90%が1年以内に再発するが、HSV-1感染例では20%程度である。
 HSV-1：単純ヘルペスウイルス1型、HSV-2：単純ヘルペスウイルス2型

(筆者作成)

表3 HSV-1とHSV-2の初感染例の臨床症状

	HSV-1	HSV-2	p
発熱 (37℃以上)	55.6% $\left[\frac{110}{198} \right]$	50.7% $\left[\frac{75}{148} \right]$	0.367
ソケイリンパ節 腫脹と圧痛	87.9% $\left[\frac{167}{189} \right]$	78.8% $\left[\frac{115}{145} \right]$	0.24
潰瘍が多発	71.1% $\left[\frac{150}{211} \right]$	37.7% $\left[\frac{57}{151} \right]$	< 0.001

性器の無数の潰瘍形成はHSV-1による場合が多い。

HSV-1：単純ヘルペスウイルス1型、HSV-2：単純ヘルペスウイルス2型

(筆者作成)

とである(表2)。

一方、再発例では228例中201例(88.2%)が2型であり、1型は27例(11.8%)であった。初感染初発では1型が70%で2型が30%であっ

76 (804)

たものが、再発では1型が10%、2型が90%という分布になっている。このことは、2型のほうが再発しやすいことを示唆している。そこで、1型と2型の初感染の例についてその後の再発率を

追跡調査したところ、2型の90%以上が1年以内に再発しているのに対し、1型では20%程度しか再発していないことがわかった(図4)。これらのことは、性器のHSV感染では1型と2型の感染病理の違いを示している。

(2) 臨床的な違い

① 初感染例の臨床症状について見たところ、全身症状としての発熱、局所症状としての鼠径リンパ節の腫脹は同程度であったが、病変が両側性に10個以上多発する症例は1型のほうが有意に多かった(表3)。

② 性器ヘルペスのときに無尿や排尿力の減退などの排尿障害をとまうことがみられる(Elsberg症候群と呼ばれている)が、これは単に排尿時に尿が病変部に触れるための疼痛によるだけでなく、自律神経障害によると考えられている。この頻度を1型と2型の初発例で比べると、1型感染例が0.9%であったのに対し、2型感染例は13.5%と圧倒的に高い頻度であった。このことは、2型のほうが向神経性が強いことを示唆している。

(3) 血清抗体反応の違い

初感染後、再発する例について1型感染例と2型感染例の血清抗体の推移を見たところ、興味深いことに、1型感染例では再発によりIgG抗体が急上昇するがピークに達した後、低下する例のあることがわかった。これに対し、2型感染例では再発をくり返してもこのような抗体の上昇と下降はなく、ほぼ一定の値を持続していた。大胆な推測ではあるが、抗体が減少することは抗原刺激がなくなることを考えると、性器の感染では1型は2型よりも排除されやすいのではないかと思われる。

以上のように、女性性器に関する限り1型と2型感染の臨床経過が異なるため、性器ヘルペスの診断において感染しているHSVが1型か2型を決めることは是非行うべきと考えている。

IV 診断についての現状

性器ヘルペスの診断は臨床診断と臨床検査によって行われる。

1. 臨床診断

前述のような症状があれば診断しやすい。ただ、従来から言われている多発性・対称性に出現する潰瘍性病変のような典型的な例はむしろ少ない。一方、性器ヘルペス以外でも急性外陰潰瘍やBehçet病などでも潰瘍性病変を呈するし、性器カンジダ症や接触皮膚炎などでも浅い潰瘍性病変を呈するなど、紛らわしい疾患も多い。そこで、臨床診断は誤診が多く、臨床検査を行うべきであると多くのガイドラインには記載されている⁸⁾。

2. 臨床検査

臨床検査には病原診断と血清診断がある。

(1) 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ある。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法、蛍光抗体法によるHSV感染細胞の検出、PCR (polymerase chain reaction) 法またはLAMP (loop-mediated isothermal amplification) 法による核酸増幅法である。

保険適用のある蛍光抗体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抗原を証明するものである。特異度は高いが感度が20～30%と非常に悪い。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上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。しかし、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日間もかかる上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上に検体の採取・搬送も容易であり、しかも結果は短時間で出るためまことに優れた方法で、分離培養法よりも感度がよいとされている。外国ではPCR法が開発されている。わが国では

PCR (polymerase chain reaction)

LAMP (loop-mediated isothermal amplification)

LAMP 法が開発された。

LAMP 法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。そのため、用いる器具も比較的簡易なものでよく、ベッドサイドで用いることもできる。最近、検体採取より 2 時間以内で結果が出せる簡易迅速診断キットが市販された(栄研化学)⁹⁾。このキットの感度は分離培養法と同等であり、しかも HSV の型も判定できる優れたものである。早急に LAMP 法が一般臨床で手軽に保険で行えるようになることを願っている。

(2) 血清診断

① 免疫グロブリンクラス別抗体検出

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、血清診断は難しい。しかし、ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法による免疫グロブリンクラス別抗体測定法を用いると、従来の補体結合法や中和法と違って血清診断がある程度可能になった。

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 抗体が急上昇する。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¹⁰⁾。わが国で市販されている ELISA キット(デンカ生研)では 1 型抗体と 2 型抗体の両方とも検出できる。ただ、初発の中に非初感染初発が 20% 位あり、これらの例では IgM 抗体が検出されないのに注意を要する。

② 型特異的抗体検出法

感染している HSV が 1 型か 2 型かは型特異抗体を検出することで診断できる。1 型と 2 型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 の表面にある糖タンパクのうち glycoprotein G (gG) は 1 型と 2 型で抗原的に異なるところが多いため、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。1 型は口腔と性器の両方に感染するが、2 型はほとんどが

性器の感染であるため、2 型特異抗体が検出されれば性器の当該病変が 2 型による性器ヘルペスの可能性が高い。現在は保険適用はないが、性器ヘルペスの診断には大いに役立つ。

ただし、これらのキットは IgG 抗体を検出するため感染の初期には IgG 抗体が出現せず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 (1 型の gG) は gG-2 (HSV-2 の gG) よりも抗原性が弱いようなので、1 型の感染では抗体検出感度はさらに低下するので注意が必要である¹¹⁾。

以上のように、病原診断と型特異的血清診断はすでに確立しているのが、わが国では保険診療ではできない。世界のレベルから大変遅れてしまっていることは残念である。

V 性器ヘルペスの治療

性器ヘルペスの治療は抗ヘルペスウイルス薬の全身投与により HSV の増殖を抑制し、病期の短縮を目指す。性器に感染した HSV は短い時間のうちに仙髄神経節に移行し、ここで増殖を続け、ふたたび知覚神経節を下行して、外陰だけでなく子宮頸管にも病変を形成する。このような感染病理を考慮すると、外陰の病変に軟膏などを塗布する局所療法だけでは十分ではないことがわかる。

抗ヘルペスウイルス薬としてヌクレオシドアナログが開発され有効な治療薬として効果をあげている。わが国では、アシクロビル (ACV)、バラシクロビル (VACV) が用いられる。いずれも HSV の増殖を抑制し治癒までの期間が短縮され著効を示すが、病型により投与量や期間が異なっている。ACV は血中濃度を維持するために 1 日 5 回服用する必要があったが、VACV は ACV のプロドラッグで腸管からの吸収がよいため 1 日 2 回でよく、治療しやすくなった。

性感染症学会のガイドラインに記載されている現在わが国で用いられている薬剤の投与量と期間を表 4 に示した⁷⁾。

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

ACV (アシクロビル)

78 (806)

gG (glycoprotein G)

VACV (バラシクロビル)

表4 性器ヘルペスの治療

	薬剤と投与方法	投与期間
初発	バラシクロビル 500mg 1日2錠分2, またはアシクロビル 200mg 1日5錠分5 <重症例>	5～10日間
	静注用アシクロビル 5mg/kg 1日3回点滴静注	5～7日間 その後、経口で 追加計10日間
再発	バラシクロビル 500mg 1日2錠分2, またはアシクロビル 200mg 1日5錠分5 <軽症例>	5日間
	3%ピダラビン軟膏 } 5%アシクロビル軟膏 } 1日数回塗布	5～10日間
再発抑制療法	バラシクロビル 500mg 1日1回	3カ月～ 症例による

性器ヘルペスの治療にはアシクロビルまたはバラシクロビルの経口投与が用いられる。臨床型により量や期間が異なる。(文献7より)

1. 初 発

一般に初発(特に初感染初発)は症状が強く、病変が広く、治癒までの時間もかかる。現在の薬剤は潜伏感染状態のHSVを排除することができないため、抗ヘルペスウイルス薬によって治療してもその後の再発は免れない。髄膜炎を合併したり、外陰の病変が広く、排尿痛が強く日常生活が困難な場合、末梢神経麻痺による尿閉などを合併する場合は入院し、経静脈投与が薦められる。

日本性感染症学会のガイドラインでは、VACV 500mg×2/日またはACV 200mg×5/日を5～10日間経口投与する。5日間でもよいが症状に応じて10日間まで延長することになっている。初発性器ヘルペスの投与期間について年代順に並べたものが表5であるが、年代とともに次第に長くなっているようである。CDC(米国疾病予防管理センター)のガイドライン⁸⁾ではVACV 1,000mg×2/日と、わが国の倍量を経口投与し、期間も7～10日間としている。性器ヘルペスの世界的リーダーのひとりであるCoreyは、VACV

500～1,000mg×2/日の10～14日間の投与を薦めている¹²⁾。

筆者は、一見、外陰症状が治癒しても10日間は投与している。その理由は、初感染例にACV 200mg×5/日を5日間またはVACV 500mg×2/日を5日間の投与におけるHSVに対する効果を経時的にHSVの培養を行って、その陰転化率を見たところ、第5病口では1型、2型感染例の10%以上がなお陽性であり、5日間の投与では不十分である例があった(図5)。もうひとつの理由は、仙髄神経節におけるHSVの増殖は外陰病変が治癒してからもなお続いている可能性があるため、これを抑えておくことは潜伏HSV量を減らすことになり、したがって、将来の再発の頻度を減らすことができるのではないかと考えているからである。

2. 再 発

再発例は一般に症状が軽いため投与期間は5日間と短い。再発の治療は、発症してから1日以内、できれば6時間以内に投薬すると有意な治療効果

表5 初発性器ヘルペスの抗ウイルス療法

報告者	年度	1日量	投与期間	報告誌
European guideline	2001	ACV 200mg×5 VACV 500mg×2	5日間	Inter J STD & AID
Patel R	2002	ACV 200mg×5 VACV 500mg×2	5～10日間	JID
Kimberlin D	2004	ACV 200mg×5 VACV 1,000mg×2	7～10日間	N Engl J Med
Corey L	2008	ACV 200mg×5 VACV 500～1,000mg×2	10～14日間	Sex, Trans, Dis, ed by Holmes KK
CDC	2010	ACV 200mg×5 VACV 1,000mg×2	7～10日間	MMWR
日本性感染症学会	2011	ACV 200mg×5 VACV 500mg×2	5～10日間	日本性感染症学会誌
筆者	2009	VACV 500mg×2	10日間	

初発性器ヘルペスに対する抗ウイルス薬の投与量と期間は少しずつ異なっている。

CDC：米国疾病予防管理センター，ACV：アシクロビル，VACV：バラシクロビル

(筆者作成)

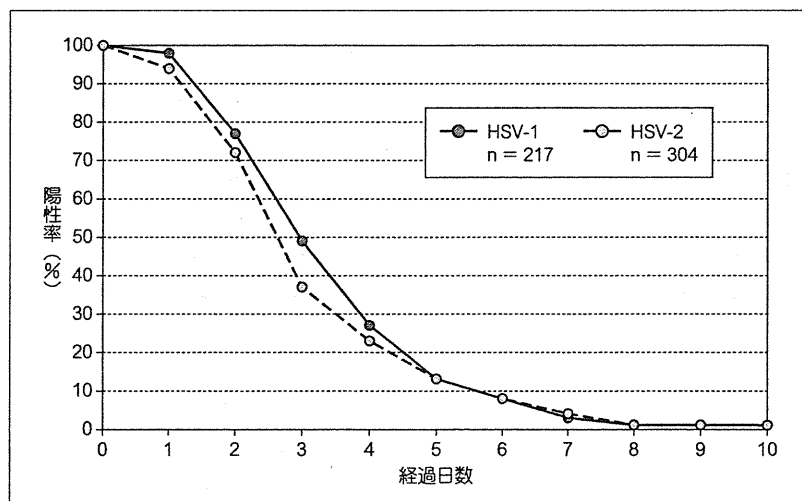


図5 ACVまたはVACV治療による経時的陰転率

100%陰転化には8日以上を要する。

ACV：アシクロビル，VACV：バラシクロビル

HSV-1：単純ヘルペスウイルス1型，HSV-2：単純ヘルペスウイルス2型

(筆者作成)

が得られるため、あらかじめ患者に薬剤を渡しておいて、再発の前兆があったときに服用させると発症しないことも多い (patient initiated treat-

80 (808)

ment：先制療法) ので外国ではしばしば行われているが、わが国では保険の適用はない。

前述のCDCのガイドラインではVACA 500

mg×2/日を3日間の投与でもよいとしている。Coreyは500mg×2/日の3日間投与、さらに1,000mg×2/日を1日で投与する短期療法でもよいとしている。HSVの再活性化により発症する再発は外陰の病変は軽度でも、実はHSVの排泄は広い範囲におきているため抗ウイルス薬の経口投与による全身療法がよく、局所の軟膏療法は推奨されていない¹³⁾。

3. 再発抑制療法

くり返す再発は患者に肉体的負担だけでなく精神的に大きなストレスとなり、QOLが低下する¹⁴⁾。症状は軽くても再発すると、パートナーや家族に感染させるのではないかと心配もある。そこで、再発を抑制するべく持続的に抗ウイルス薬を服用する抑制療法 (suppressive treatment) が開発された。この療法を年6回以上、再発する症例に用いたところ、約3カ月間では再発しないものが約70%であったのに対し、プラセボ群ではわずかに約10%で有意な差があったとしている。また、再発までの平均日数がプラセボ群では20日であったのに対し112日以上であったと、再発抑制効果を示した¹⁵⁾。抑制療法中でも再発することはあるが、その症状は一般的に軽い。さらに、抑制療法を行ったときにはHSVの排泄も抑えられる結果、パートナーへの感染率も約75%抑えられることが証明されている¹⁶⁾。

すなわち本療法により、患者本人にとっては再発を減らすことによりQOLが改善されるだけでなく、他人へ感染させるのではないかと不安もある程度解消できる。副作用が心配になるが、現在のところ、長期に服用しても問題となる副作用は知られていない。

わが国では年6回以上(2カ月に1回)再発をくり返す症例について、VACV 500mg 1日1回服用する再発抑制療法が保険適用になっている。抑制療法中に再発する例があるが、この場合は1日2錠の治療量に3~5日間戻す。抑制療法中でも再発を頻繁にくり返す場合は1日の血中濃度をなるべく一定に保つことを目的として、1回250mg 1日2回または1回1,000mgを1日1回投与することが薦められている。

2006年9月から本療法は始まっているが市販後調査は終了しており、わが国でも諸外国と同様の治療効果と、長期にわたる服用による副作用の状況などの報告が待たれる。本療法が認可された当初は年6回以上の再発例にのみ保険が認められたが、このしぼりは、外国で行われた本療法の有効性を証明した治験が年6回以上の再発例について行われたこと、わが国での臨床経験がなく副作用の発現を心配したこと、薬剤の乱用を防ぎ、本療法が適正に行われるようにすることなどを考慮した結果であった。

しかし、2006年のCDCのガイドラインでは、本療法は再発回数が年6回以内の例や再発の症状が軽い例でも有意義であるばかりでなく、HSVの排泄を抑制するため他人への感染のリスクを減らせることもあることから、これらも考慮した上で、再発時のみ服用する発症時療法にするか、抑制療法にするか、患者と相談することを薦めている。

抑制療法の適応は再発の頻度で決めるのではなく、再発時の重症度、再発による精神的ダメージの程度、パートナーへの感染に対する不安なども考慮すべきであろう。再発をくり返す患者は発症時治療よりも抑制療法を好むものが多いという報告もある¹⁷⁾。ただ、年に6回以上、再発する患者と年1~2回しか再発しない患者では当然、状況が異なってくると考えられるため、一律に抑制療法を薦めるべきではないであろう。

本療法を行えば再発の頻度は激減するものの、いつまで続けるべきかを患者から尋ねられる。この判断においては、本療法を中止したときの再発の頻度がどのように変わるかが大切である。6年間のACVによる抑制療法を行った後の再発率を治療の前と比較検討した研究では、37%の症例が75%以上減少し、35%が35~75%減少したが、28%の例では変わらなかったと言う¹⁸⁾。しかし、この報告の考察で述べているように、自然経過でもこのような変化があり得るため抑制療法の結果とは一概には言えない。現状では確立した見解はないようである。

筆者は、性器ヘルペスの再発のリスク因子には仙髄神経節に潜伏感染しているHSVの量と宿主

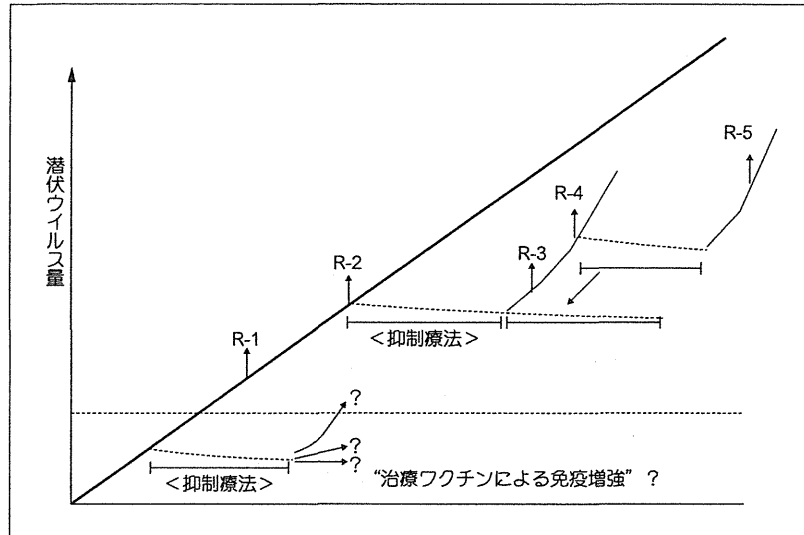


図6 再発抑制療法の病態に関する作業仮説(初感染)

再発抑制療法はHSVの量が増えないうちに開始したほうがよいのではないか。

(筆者作成)

の免疫力が関連していると考えている。現在の保険診療のように年6回以上の再発例を適応とすることは、言ってみれば、かなりの量のHSVの量が知覚神経節に潜伏感染するまで待ってから始めるということになっているのではないかと思う。潜伏感染しているHSVの排除はVACVではできないため抑制療法を中止すれば再活性化により再発をくり返すであろう。そこで、HSVの量が増えないうちに抑制療法を開始するほうがよいのではないか、特に、2型感染例は早い時期から始めるほうがよいのではないかと個人的に考えている。Handsfieldも筆者と同じように、早期に抑制療法を始めることを提案している¹⁹⁾。

これを薦めるもうひとつの理由は、2型感染後、再発は1年以内に多く、ウイルスの排泄も多いという報告があるため、この時期にHSVの増殖を抑えておくのがよいと思うからである。

以上のようなことから筆者は、2型初感染例にはなるべく早い時期から抑制療法を始めることのほうが結果的にはより効果的ではないかと考えている。そして、将来的には特異的な免疫を高めるワクチン療法を同時に追加するとよいのではないかと考えている(図6)。

VI 性器ヘルペスの予防

性器ヘルペスの蔓延には無症候性ウイルス排泄者の存在が主役となっている。このような感染経路を遮断するには、性活動を始める前にワクチン戦略によりHSVの感染を予防することが賢明である。すでに2型の表面にあるglycoprotein Dを用いたコンポーネントワクチンが製造され、臨床治験が行われた²⁰⁾。その結果、HSVに対する抗体のない女性では約40%に2型の感染が予防できることが示された。この結果を受けて大規模な臨床研究が行われ、その結果が最近発表された²¹⁾。今回の研究では残念ながら、前回の試験の追試はできず、1型の感染を35%防いだのみであった。この結果から、ワクチン戦略にはさらなる改良が必要であることが判明した。

VII まとめ

現在の性器ヘルペスの診療において改善すべき点として、診断の面では核酸増幅法による病原診断と型特異的抗体検出の早急な保険適応が望まれる。治療の面では初感染においては10日以上での投薬が必要と考える。抑制療法については年6回

以上の症例に限るのではなく、再発症状の重いもの、再発に対しての精神的なストレスが強いものなど、患者のQOLの改善を目的にすべきであろう。抑制療法の開始時期は再発の感染病理に基づいた戦略を考えるべきではないか。

文 献

- 1) 厚生労働省 性感染症の発生動向調査 2010.
- 2) Nahmias AJ, Dowdle WR: Antigenic and biologic differences in herpesvirus hominis. *Prog Med Virol* **10**: 110-159, 1968.
- 3) Kawana T, Kawaguchi T, Sakamoto S: Clinical and virological studies on genital herpes. *Lancet* **2** (7992): 964, 1976.
- 4) Cowan FM, Copas A, Johnson AM, et al: Herpes simplex virus type 1 infection: a sexually transmitted infection of adolescence? *Sex Transm Infect* **78** (5): 346-348, 2002.
- 5) Tran T, Druce JD, Catton MC, et al: Changing epidemiology of genital herpes simplex virus infection in Melbourne, Australia, between 1980 and 2003. *Sex Transm Infect* **80** (4): 277-279, 2004.
- 6) Kawana T, Kawagoe K, Takizawa K, et al: Clinical and virologic studies on female genital herpes. *Obstet Gynecol* **60** (4): 456-461, 1982.
- 7) 性器ヘルペス. 性感染症 診断・治療ガイドライン 2011. 日本性感染症学会誌 **22**(1):65-69, 2011.
- 8) Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2010. *MMWR* **159** (RR-12): 20-25, 2010.
- 9) 川名尚, 土屋裕子, 西井修ほか: LAMP法に簡易核酸抽出法(PURE法)を組み合わせたPURE-LAMP法による単純ヘルペスウイルスの簡易迅速検出法の臨床評価. *産婦人科の実際* **61** (1):119-125, 2012.
- 10) 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. *日本産科婦人科学会雑誌* **51** (2): 65-72, 1999.
- 11) 西澤美香, 川名尚, 村田照夫ほか: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. *日本性感染症学会誌* **16** (1): 97-103, 2005.
- 12) Corey L, Wald A: Genital herpes. Holmes K, et al (ed.). *Sexually Transmitted Diseases*. McGraw Hill, New York, NY. p399-437, 2008.
- 13) Tata S, Johnston C, Huang ML, et al: Overlapping reactivations of herpes simplex virus type 2 in the genital and perianal mucosa. *J Infect Dis* **201** (4): 499-504, 2010.
- 14) Rand KH, Hoon EF, Massey JK, et al: Daily stress and recurrence of genital herpes simplex. *Arch Intern Med* **150** (9): 1889-1893, 1990.
- 15) Patel R, Bodsworth NJ, Woolley P, et al: Valacyclovir for the suppression of recurrent genital HSV infection: a placebo controlled study of once daily therapy. *International Valacyclovir HSV Study Group. Genitourin Med* **73** (2): 105-109, 1997.
- 16) Corey L, Wald A, Patel R, et al: Once-daily valacyclovir to reduce the risk of transmission of genital herpes. *N Engl J Med* **350** (1): 11-20, 2004.
- 17) Romanowski B, Marina RB, Roberts JN: Patients' preference of valacyclovir once-daily suppressive therapy versus twice-daily episodic therapy for recurrent genital herpes: a randomized study. *Sex Transm Dis* **30** (3): 226-231, 2003.
- 18) Fife KH, Crumacker CS, Mertz GJ, et al: Recurrence and resistance patterns of herpes simplex virus following cessation of > or = 6 years of chronic suppression with acyclovir. *Acyclovir Study Group. J Infect Dis* **169** (6): 1338-1341, 1994.
- 19) Handsfield HH, Warren T, Werner M, et al: Suppressive therapy with valacyclovir in early genital herpes: a pilot study of clinical efficacy and herpes-related quality of life. *Sex Transm Dis* **34** (6): 339-343, 2007.
- 20) Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, et al: Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* **347** (21): 1652-1661, 2002.
- 21) Belshe RB, Leone PA, et al: Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med* **366** (1): 34-43, 2012.

Distinct cellular pathways select germline-encoded and somatically mutated antibodies into immunological memory

Tomohiro Kaji,¹ Akiko Ishige,¹ Masaki Hikida,⁶ Junko Taka,¹ Atsushi Hijikata,² Masato Kubo,³ Takeshi Nagashima,⁴ Yoshimasa Takahashi,⁷ Tomohiro Kurosaki,⁵ Mariko Okada,⁴ Osamu Ohara,² Klaus Rajewsky,^{8,9} and Toshitada Takemori¹

¹Laboratory for Immunological Memory, ²Immunogenomics, ³Signal Network, ⁴Cellular Systems Modeling, and ⁵Lymphocyte differentiation, RIKEN Research Center for Allergy and Immunology, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

⁶Center for Immunoregulatory Technology and Therapeutics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

⁷Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

⁸Program in Cellular and Molecular Medicine, Children's Hospital, and Immune Disease Institute, Harvard Medical School, Boston, MA 02115

⁹Immune Regulation and Cancer, Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine, 13092 Berlin, Germany

One component of memory in the antibody system is long-lived memory B cells selected for the expression of somatically mutated, high-affinity antibodies in the T cell-dependent germinal center (GC) reaction. A puzzling observation has been that the memory B cell compartment also contains cells expressing unmutated, low-affinity antibodies. Using conditional Bcl6 ablation, we demonstrate that these cells are generated through proliferative expansion early after immunization in a T cell-dependent but GC-independent manner. They soon become resting and long-lived and display a novel distinct gene expression signature which distinguishes memory B cells from other classes of B cells. GC-independent memory B cells are later joined by somatically mutated GC descendants at roughly equal proportions and these two types of memory cells efficiently generate adoptive secondary antibody responses. Deletion of T follicular helper (Tfh) cells significantly reduces the generation of mutated, but not unmutated, memory cells early on in the response. Thus, B cell memory is generated along two fundamentally distinct cellular differentiation pathways. One pathway is dedicated to the generation of high-affinity somatic antibody mutants, whereas the other preserves germ line antibody specificities and may prepare the organism for rapid responses to antigenic variants of the invading pathogen.

In T cell-dependent B cell responses, activated B cells migrate into the B cell follicles where they proliferate, with a fraction of cells undergoing Ig class switch recombination (CSR; Coffey et al., 2009; Pereira et al., 2010). Although some of the activated cells mediate the primary antibody response through differentiation into plasma cells, others are recruited into the germinal center (GC) reaction (Pereira et al., 2010). This is accompanied by up-regulation of the transcriptional repressor Bcl6, on which GC B cell differentiation depends (Dent et al., 1997; Ye et al., 1997). Bcl6 up-regulation is also required for the differentiation of follicular (FO) T helper (Tfh) cells. These cells are critical for the selection of B cells expressing high-affinity antibodies in the GC environment (Crotty, 2011).

Within the GC, B cells undergo massive proliferation accompanied by CSR and somatic hypermutation (SHM) of their rearranged Ig V region genes, a process in which cells preferentially survive which have acquired mutations that increase antibody affinity for the immunizing antigen (Rajewsky, 1996). This selection process critically depends on antigen presented to the B cells by FO DCs in the GC microenvironment and, in turn, presented by the B cells in the form of antigenic peptides to antigen-specific Tfh cells, resulting in the delivery of

CORRESPONDENCE

Toshitada Takemori:
mttoshi@rcai.riken.jp
OR

Klaus Rajewsky:
klaus.rajewsky@mdc-berlin.de

Abbreviations used: ASC, antibody-secreting cell; CG, chicken γ -globulin; CSR, class switch recombination; ES, embryonic stem; FO, follicular; GC, germinal center; MZ, marginal zone; NIP, (4-hydroxy-5-iodo-3-nitrophenyl)acetyl; NP, (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl; PNA, peanut agglutinin; qRT-PCR, quantitative RT-PCR; SHM, somatic hypermutation.

© 2012 Kaji et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms>). After six months it is available under a Creative Commons license (Attribution-Noncommercial-Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

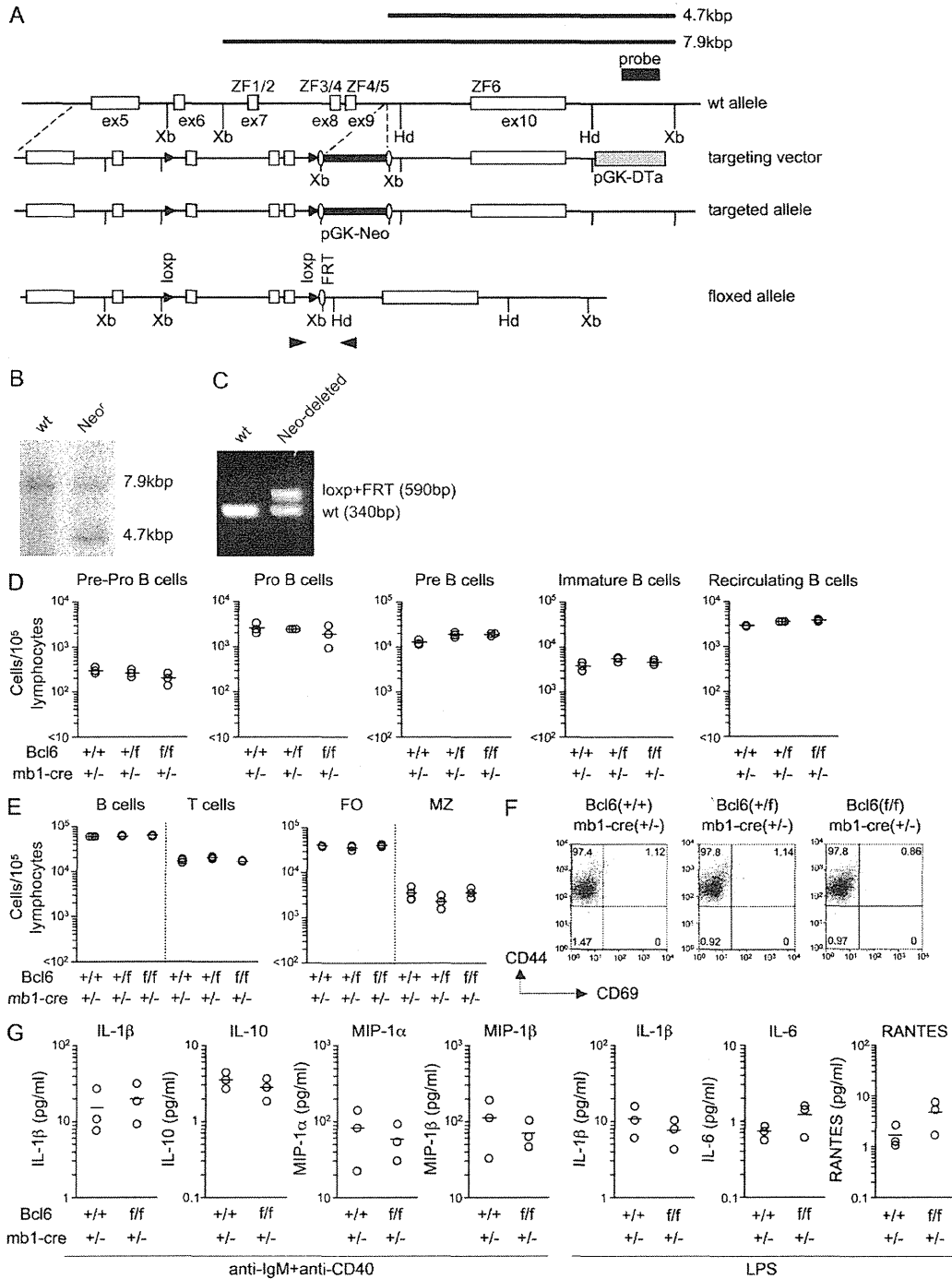


Figure 1. Targeted insertion of loxP sites into the *Bcl6* gene. (A). A DNA fragment which contains exons 7–9 of the *Bcl6* gene was flanked by loxP sites (solid triangles) with an FRT-flanked pGK-Neo cassette inserted next to it. The pGK-Neo cassette was removed from the mouse germline by breeding heterozygous mice to FLPe-expressing deleter mice. Xb, XbaI site; Hd, HindIII site. (B) Southern blot analysis of XbaI digested genomic DNA from a WT and a targeted ES clone using the probe depicted by the thick bar in A. (C) Removal of the pGK-Neo cassette in a heterozygous floxed mouse was confirmed by genomic PCR. Location of the primer set is indicated by the two arrowheads on the bottom of A. (D–G) *Bcl6*^{lox} mice were crossed to *mb1-cre* mice. Conditional *Bcl6*-deletion in B cells does not affect BM B cell development (D), B cell numbers in the spleen (E), and B cell characteristics before immunization (F and G). BM cells and splenocytes were prepared from *Bcl6*^{+/+} (+/+), *Bcl6*^{+/-} (+/f), and *Bcl6*^{f/f} (f/f) mice heterozygous for *mb1-cre* (*n* = 3). The frequency of B cell subsets in BM (D) and T and B cells in the spleen (E) was analyzed by FACS. Each symbol represents the number of cells in an individual mouse. Bars represent the mean number for

survival signals for the B cells involved (Victora et al., 2010). The selected high-affinity GC cells are then believed to differentiate into memory B and long-lived plasma cells, a large fraction of which express somatically mutated Ig V region genes and which persist for long periods of time after termination of the GC response (Rajewsky, 1996; Tarlinton, 2006).

Although the precursor-product relationship of GC and memory B cells seems firmly established, a puzzling observation has been that not all memory B cells carry somatic mutations in their Ig V regions (Takahashi et al., 2001; Blink et al., 2005; Anderson et al., 2007; Zotos et al., 2010). In addition, ICOS blockade early in the immune response caused a reduction in the frequency of mutated memory and GC B cells but did not affect total memory B cell numbers (Inamine et al., 2005). These findings led to the view that some memory cells emerge from the early GC reaction (Good-Jacobson and Shlomchik, 2010) or may even be GC independent, as unmutated memory cells can be generated in irradiated mice reconstituted with Bcl6-deficient BM (Toyama et al., 2002).

However, Bcl6 germline deletion causes multiple immunological dysfunctions, such as arrested Tfh and conventional DC development (Crotty, 2011; Ohtsuka et al., 2011), as well as aberrant macrophage function (Mondal et al., 2010). Furthermore, Bcl6 germline deletion causes a prominent inflammatory disease owing to overexpression of Th2 cytokines (Ye et al., 1997; Dent et al., 1997) and affects the properties of B cells before immunization (Shaffer et al., 2000). Thus, there is no evidence for a GC-independent pathway of memory cell generation under physiological conditions. Moreover, even if such a pathway exists, its timing in the response and impact on B cell memory, and the properties of the participating cells remain elusive.

To obtain a comprehensive understanding of the population dynamics underlying GC-independent and -dependent memory B cell development under physiological conditions, we deleted Bcl6 in the B or T cell lineage through a conditional Bcl6 allele and complemented these experiments by antibody-mediated ablation of the GC response in genetically intact animals. Focusing on antigen-specific IgG1-expressing memory cells, which can be conveniently isolated and distinguished from GC B cells by the level of CD38 expression (Ridderstad and Tarlinton, 1998; Takahashi et al., 2001), we then pursued the fate of these cells in the T cell-dependent immune response and characterized their properties, genetic signature, life span, and functional activity.

Our work not only provides definitive evidence for a GC-independent pathway of memory cell generation under physiological conditions but also a comprehensive view of the strikingly distinct population dynamics underlying GC-independent and -dependent memory B cell development with the help of distinct T cell subsets. The two classes of memory

cells establish the memory compartment jointly and at comparable frequencies and attain functional maturation through distinct though related transcriptional programs.

RESULTS

Bcl6 deletion in B cells impairs GC but not memory B cell development

We established mutant mice carrying a loxP-flanked *Bcl6* exon 7–9 allele (*Bcl6^{flf}*), with these exons encoding the Bcl6 zinc finger (ZF) domains ZF1 to ZF5 (Fig. 1). As the ZF domains are critical for Bcl6 function (Basso and Dalla-Favera, 2010), deletion of exons 7–9 is predicted to cause a complete loss of the capacity of Bcl6 to repress transcription of target genes.

Whereas mice with *Bcl6* deletion in the germline exhibit aberrant B cell development in the BM and an activated phenotype in naive splenic B cells (Shaffer et al., 2000; Duy et al., 2010), the conditional deletion of *Bcl6* in B cells had no effect on B cell numbers, phenotype, or cytokine production after stimulation through the B cell receptor or Toll-like receptor (Fig. 1). To dissect IgG1 memory B cell development, *Bcl6^{flf}* mice were crossed with mice in which a cre cDNA is knocked into the *Cy1* locus (*Cy1-cre*; Casola et al., 2006). We immunized the compound mutants and control mice with chicken γ -globulin (CG) coupled to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl (NP-CG) and tracked NP-specific/IgG1⁺ memory (CD38⁺/peanut agglutinin [PNA]^{low}) and GC (CD38^{low}/PNA⁺) B cells in the spleen of immunized mice by multicolor flow cytometry (Fig. S1; Takahashi et al., 2001). GC reactions have been reported to persist for a long time after immunization (Dogan et al., 2009). Indeed, we found that approximately one fourth of the NP-specific/IgG1 B cells consisted of GC B cells 150 d after immunization (Fig. S1).

Bcl6 protein expression is limited to the GC stage of B cell differentiation (Basso and Dalla-Favera, 2010). Bcl6 was brightly stained in the nuclei of PNA^{high}/CD38⁺ and CD38^{dull} B cells at day 7 after immunization, supporting the notion that the transition of GC B cells from a CD38^{high} to a CD38^{dull} phenotype occurs early in the immune response (Shinall et al., 2000). Contrarily, Bcl6 was not detected in the nucleus of WT memory B cells (unpublished data). The conditional deletion of *Bcl6* reduced the number of NP-specific/IgG1⁺ GC B cells in the spleen at days 7 and 40 after immunization to <2% of controls (Fig. 2A). Early GC B cells were also deleted in the mutant mice (unpublished data). In striking contrast, the number of memory B cells was unaffected. These results suggest that Bcl6 expression in B cells is essential for GC but not memory B cell development.

To confirm this possibility, we crossed the *Bcl6^{flf}* mice with mice expressing Cre recombinase from the *mb-1* locus and thus from early on in B cell development (Hobeika et al., 2006). Cre-mediated recombination in WT mice was detected

each group. (F) Representative FACS plots of splenic B cells with expression of CD44 and CD69 (activated B cell phenotype). Numbers in the plots indicate the percentage of cells in quadrants. (G) The levels of cytokines in culture supernatants produced by splenic B cells upon stimulation with anti-IgM and anti-CD40 mAb or LPS for 3 d (see Materials and methods). Bars represent means for each group. The data are representative of two independent experiments in D–G.

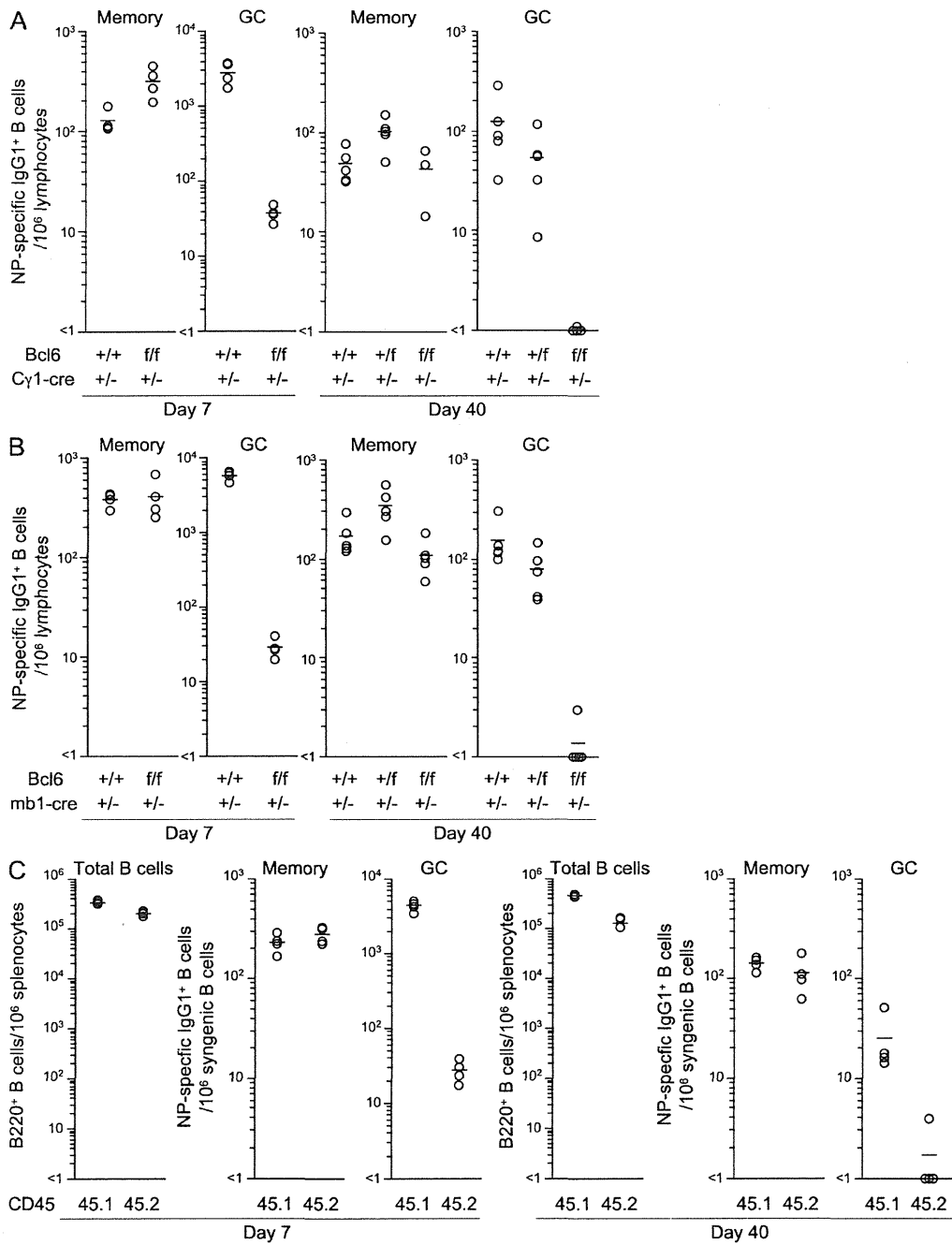


Figure 2. IgG1⁺ memory B cells develop independently of the GC reaction. Splenocytes were recovered from Bcl6^{-/-}, Bcl6^{+^{fl}}, and Bcl6^{fl/fl} mice heterozygous for Cγ1-cre (A) or mb1-cre (B) at day 7 or 40 after immunization with NP-CG in alum and NP-specific/IgG1⁺ memory and GC B cells were enumerated from 10⁶ cells within the lymphocyte gate (see Materials and methods). Circles represent the number of cells in individual mice (n = 3–5). Bars indicate the mean number in each group. (C) BM cells from Bcl6^{fl/fl} mice heterozygous for mb1-cre (CD45.2⁺) and CD45.1⁺ WT or heterozygous mb1-cre mice were mixed 1:1 and transferred into CD45.2⁺Rag-1^{-/-} mice (n = 4). After 8 wk, the recipient mice were immunized with NP-CG. Splenocytes were stained with anti-CD45.1 mAb to distinguish the WT (45.1) and conditional Bcl6 KO (45.2) compartments at days 7 and 40 after immunization. The number of B cells and NP-specific memory and GC B cells in individual spleens was determined as in A. Data are representative of two (A) and three (B and C) independent experiments. See also Fig. S1.

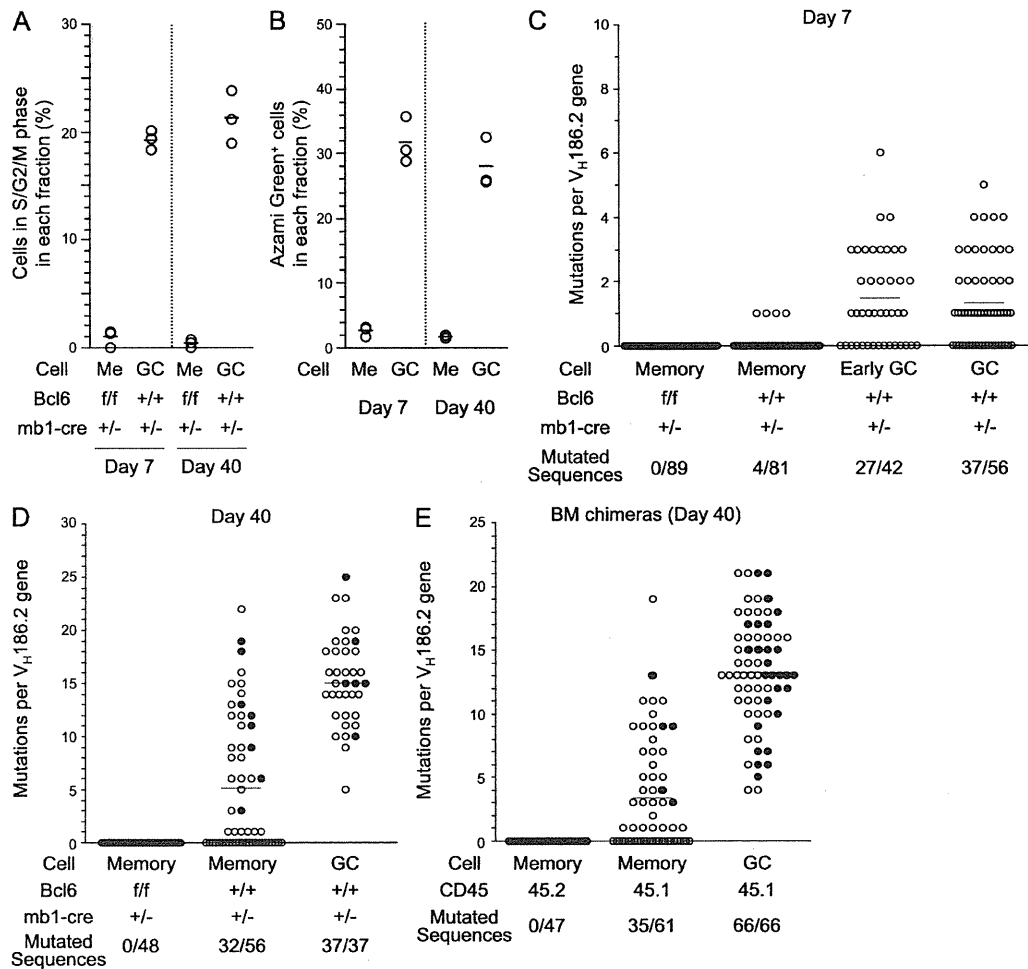


Figure 3. The cell cycle position and V_H186.2 gene mutations in NP-specific memory and GC B cells. (A) DNA content in memory (Me) and GC B cells in conditional Bcl6-deficient (Bcl6^{f/f}/mb1-cre^{+/-}) and control (Bcl6^{+/+}/mb1-cre^{+/-}) mice at days 7 and 40 after immunization with NP-CG. Each symbol represents the percentage of positive cells in an individual mouse ($n = 3$). Data are representative of three independent experiments. (B) The cell cycle position of memory B cells (Me) and GC B cells (GC) in FUCCI transgenic mice ($n = 3$) at indicated times. Each symbol represents the percentage of cells positive for Azami Green in an individual mouse. Data are representative of three (day 7) and two (day 40) independent experiments. (C and D) Single NP-specific/IgG1⁺ memory and GC B cells were purified from the pooled spleens of Bcl6^{+/+} (+/+) and Bcl6^{f/f} (f/f) mice heterozygous for mb1-cre ($n = 6-13$) at day 7 (C) or day 40 (D) after immunization and subjected to RT-PCR to amplify rearranged V_H186.2-C γ 1 cDNA for sequencing (see Materials and methods). (E) CD45.1⁺ (45.1) WT memory and GC B cells and CD45.1⁻ (45.2) Bcl6-deficient memory B cells were purified as single cells from pooled spleens of BM chimeras ($n = 9$) at day 40 after immunization and their V_H genes were sequenced as in C. Number of mutated clones/number of V186.2 genes sequenced are also shown in C-E. Circles represent the number of mutations in individual clones. Closed circles represent W33L clones.

in >98% of BM and splenic B cells, but not in prepro-B and CD4⁺ T cells (unpublished data). The conditional deletion of *Bcl6* through mb1-cre essentially abolished the early development of IgG1⁺ GC B cells in the spleen on day 5 after immunization (unpublished data). This in turn resulted in an ~200-fold reduction in the number of GC B cells on day 7 after immunization, compared with the controls (Fig. 2 B). We also generated mixed BM chimeras by transferring BM cells of congenic CD45.1⁺ WT and CD45.2⁺ conditional Bcl6-deficient mice into irradiated Rag-1^{-/-} mice and immunized the animals with NP-CG 8 wk after reconstitution. In the

chimeric mice, Bcl6-deficient B cells did not generate GC B cells (Fig. 2 C), confirming that Bcl6 expression in B cells is essential for GC B cell development.

In contrast, the number of IgG1⁺ memory B cells was again comparable in Bcl6-deficient (Bcl6^{f/f}/mb1-cre^{+/-}) and control mice (Bcl6^{+/+}/mb1-cre^{+/-}) at days 7 and 40 after immunization (Fig. 2 B). In BM chimeric mice, memory B cells derived from WT and conditional Bcl6-deficient mice coexisted at almost equal frequency in the spleen (Fig. 2 C), suggesting that GC-dependent and -independent pathways of memory cell generation operate side by side.

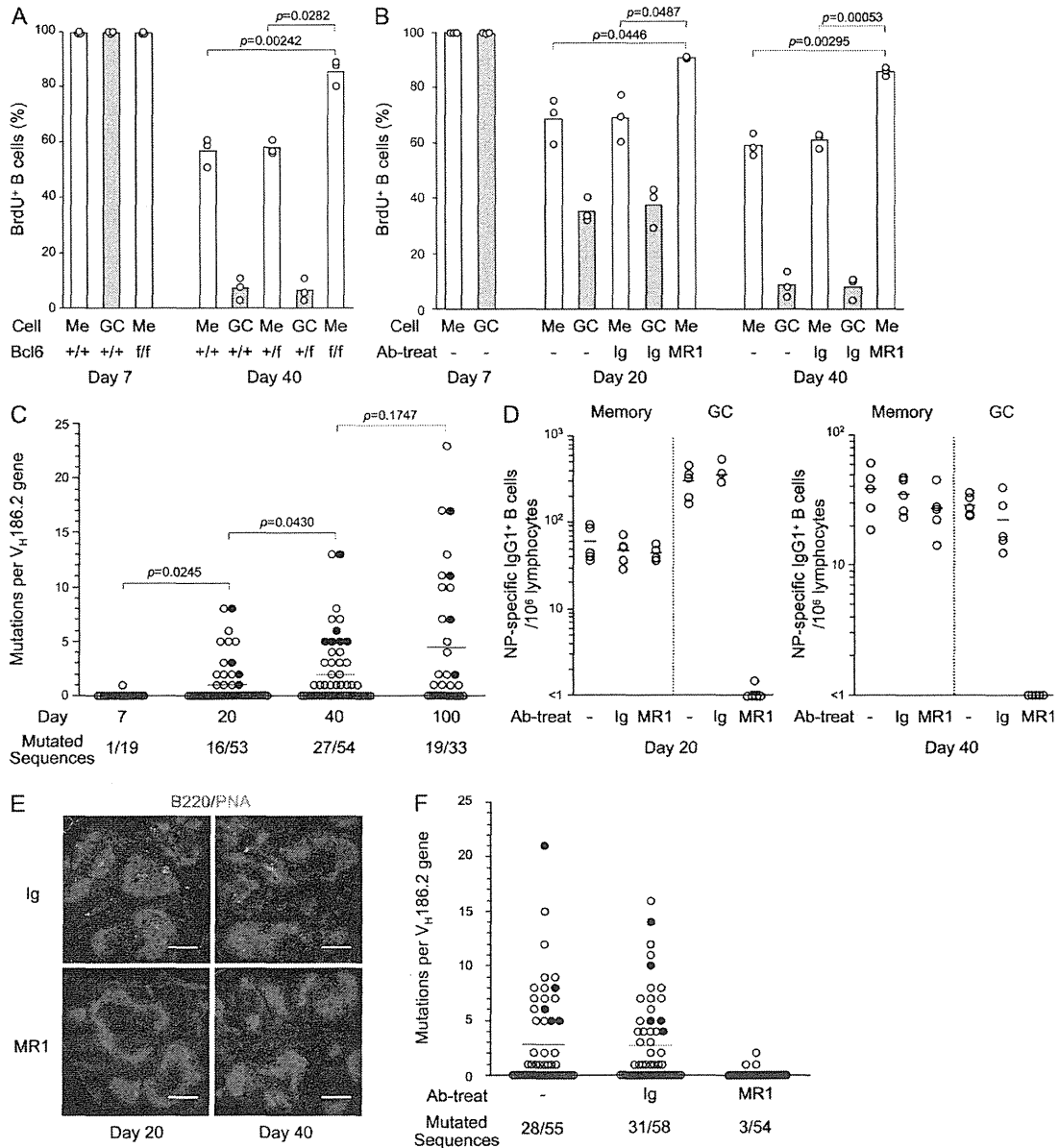
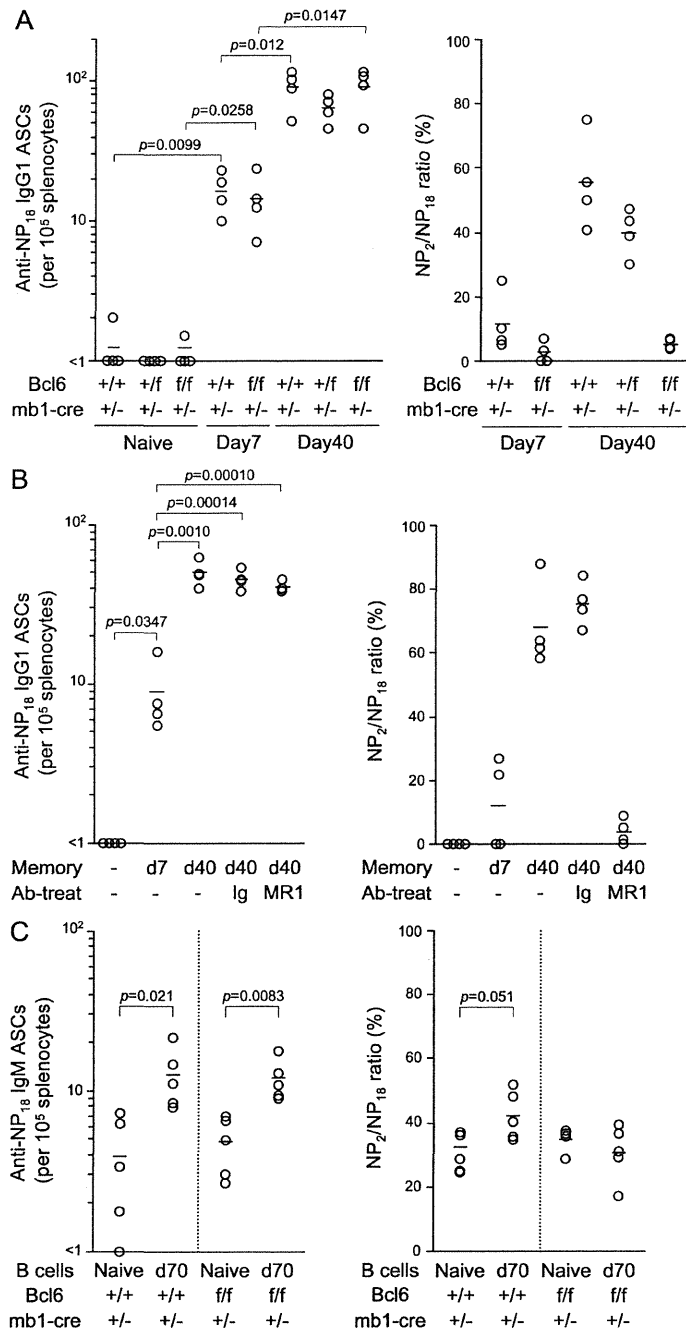


Figure 4. GC-independent memory B cells are maintained for a long period and later joined by somatically mutated GC descendants. (A) *Bcl6*^{-/-} (+/+), *Bcl6*^{+/-} (+/+), and *Bcl6*^{+/+} (f/f) mice heterozygous for *mb1-cre* (*n* = 5–25) were injected with BrdU twice at days 4–6 after immunization with NP-CG. Memory (Me) and GC B cells (GC) were then purified at indicated times. BrdU⁺ B cells were determined as in Materials and methods. Circles represent the percentage of BrdU⁺ cells in three independent experiments. (B) C57BL/6 mice (*n* = 5–25) were immunized and injected with BrdU as described in A. On days 6, 8, and 10 after immunization, mice were either not treated (–) or injected with either hamster anti-CD40-ligand mAb (MR1) or normal hamster IgG (Ig) and sacrificed at day 20 or 40 for purification of NP-specific/IgG1⁺ memory (Me) and GC B cells (GC). BrdU incorporation was determined as in A. Circles represent the percentage of BrdU⁺ cells in three independent experiments. (C) Accumulation of mutations in *V_H186.2* genes that were PCR amplified from single NP-specific/IgG1⁺ memory B cells in immunized WT mice (*n* = 10–22) at the indicated times. Number of mutated clones/number of *V_H186.2* genes sequenced are also shown. Symbols are as in Fig. 3. The results were evaluated statistically by Mann-Whitney nonparametric test, with *P* < 0.05 regarded as significant. (D) C57BL/6 mice (*n* = 5) were immunized with NP-CG in alum and injected with or without (–) anti-CD40 ligand mAb (MR1) or normal Ig (Ig) as described in B. At day 20 or 40, the number of NP-specific/IgG1⁺ memory and GC B cells was analyzed by FACS. Each symbol represents the number of cells in individual mice. The data are representative of two independent experiments. (E) Immunofluorescence analysis of splenic cryosections from NP-CG-immunized C57BL/6 mice treated with MR1 or normal Ig was performed. Sections were stained with anti-B220 (blue) and PNA (red; see Materials and methods). Representative images of three mice are shown. Bars, 300 μm. (F) Mutational analysis of *V_H186.2* rearrangements from single day 40 memory B cells of immunized mice (*n* = 20–40). Mice were either not treated (–) or injected with anti-CD40 ligand mAb (MR1) or normal Ig (Ig) as described in B. Number of mutated clones/number of *V_H186.2* genes sequenced are also shown. Symbols are as in Fig. 3.



Early GC-independent memory B cells are in a resting state and have not undergone SHM

To examine cell cycle progression in NP-specific/IgG1⁺ memory B cells, B cells were prepared from individual spleens of mutant (*Bcl6^{f/f}/mb1-cre^{+/-}*) and control (*Bcl6^{+/+}/mb1-cre^{+/-}*) mice at days 7 and 40 after immunization and stained with the DNA specific dye Hoechst 33342, followed by FACS analysis of their DNA content. Memory B cells in the mutant mice were mostly in a resting state, whereas ~20% of

Figure 5. Memory B cells attain functional maturity as the immune response progresses. (A) Splenocytes were recovered from either naive or NP-CG-primed *Bcl6^{+/+}*, *Bcl6^{+/f}* (+/f), and *Bcl6^{f/f}* (f/f) mice ($n = 4-14$) heterozygous for *mb1-cre* (*mb1-cre^{+/-}*) at days 7 and 40 after immunization. B cells depleted of plasma cells were enriched by MACS and memory B cell frequency was estimated by FACS. B cell populations containing 1.5×10^3 NP-specific/IgG1⁺ memory B cells were transferred into *Rag-1^{-/-}* mice, together with CG-primed CD4⁺ T cells and naive B cells, followed by immunization with soluble NP-CG. The number of total and high-affinity anti-NP/IgG1⁺ ASCs in the spleen was measured by ELISPOT at day 10 after immunization. Shown are the total number of anti-NP/IgG1⁺ ASCs (left) and the ratio of high-affinity ASCs/total number of ASCs (right). (B) On days 6, 8, and 10 after immunization, mice were either not treated (-) or injected with either anti-CD40 ligand mAb (MR1) or normal Ig (Ig) and sacrificed at day 7 (d7, $n = 5$) or 40 (d40, $n = 22-25$) for purification of NP-specific/IgG1⁺ memory B cells. Memory B cells (1×10^3), CG-primed CD4⁺ T cells (4×10^6), and naive B cells (10^6), as filler cells, were transferred into *Rag-1^{-/-}* mice ($n = 4$), followed by immunization as in A. Anti-NP/IgG1⁺ ASCs in the spleen were determined as in A. (C) B cells were prepared from mutant (*Bcl6^{f/f}/mb1-cre^{+/-}*, $n = 4$) or control mice (*Bcl6^{+/+}/mb1-cre^{+/-}*, $n = 4$) at day 70 (d70) after immunization with NP-CG. NP-primed B cells or naive B cells (Naive) were transferred into *Rag-1^{-/-}* mice ($n = 5$), together with CG-primed T cells, followed by immunization with NP-CG. The number of total and high-affinity anti-NP/IgM ASCs in the spleen was measured by ELISPOT at day 5 after immunization. Data are representative of two (C) and three (A and B) independent experiments. Circles represent cell numbers in individual mice.

GC B cells in the controls are in the S/G2/M phases of the cell cycle at these time points (Fig. 3 A and Fig. S2 A). We also performed FACS analysis for NP-specific/IgG1⁺ memory and GC B cells in individual spleens of FUCCI transgenic mice at days 7 and 40 after immunization (Fig. 3 B). These mice constitutively express monomeric Azami Green fused to partial human geminin protein (Sakaue-Sawano et al., 2008) so that cells in S/G2/M can be easily distinguished by green fluorescence (Fig. S2 B). Fig. 3 B shows that day 7 and day 40 IgG1⁺ memory B cells in WT mice were mostly in a resting state, in contrast to their GC counterparts. This was confirmed by staining for the Ki67 nuclear protein (unpublished data).

The anti-NP response in C57BL/6 mice is dominated by λ light chain bearing antibodies whose V region of the IgH chain is encoded by a rearranged V186.2 V gene segment (Allen et al., 1988). As shown in Fig. 3 C, two thirds of the V186.2 rearrangements sequenced from IgG1⁺PNA⁺CD38⁺ and CD38^{dull} GC B cells in *Bcl6*-proficient control mice were somatically mutated at day 7 after immunization, whereas IgG1⁺ memory B cells from mice with B cell-specific *Bcl6* ablation (*Bcl6^{f/f}/mb1-cre^{+/-}*) were unmutated. This was also true for