

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ができる。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開発された⁴⁾(栄研化学)。このキットは感度は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。

2) 血清診断

a) 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。その理由は初感染では症状の強い急性期では血清抗体は陰性であり、再発では発症時と回復時で抗体の動きはあまりなく血清診断の原理が応用できないからである。しかし、ELISA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⁵⁾。わが国で市販されているELISAキット(デンカ生研)では、HSV-1抗体とHSV-2抗体の両方とも検出できる。一方、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上昇して高い値をとることはなさそうである。

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からである。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。

b) 型特異的抗体検出法

感染しているHSVがHSV-1かHSV-2かは型特異抗体を検出することで診断できる。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)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HSV-1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⁶⁾。

c) 性器ヘルペスの感染病態

感染しているHSVの型と発症時の型特異的抗体から性器ヘルペスを感染病理学的に分類すると表3のような9つの感染病態があることになる。ただし、現在は型特異抗体の保険適用はないので、型特異的でない従来用いてきたHSV抗体で測定した場合の感染病態も示した。

3. 診断の実際

性器ヘルペスを疑わせる病変が外陰や子宮頸部、肛門、臀部などに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全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、性器に病変がありHSV-2抗体が検出された場合

表3 性器ヘルペスの感染病態

臨床分類	発症時の抗体		感染 HSV	感染病態	発症時の抗体	感染病態
	型別抗体による			型別抗体による分類	型別でない HSV 抗体	型別でない HSV 抗体による分類
	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		+	

も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による病原診断は感度が悪いので、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。

IV. 性器ヘルペスの治療 (表4)

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上げています。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 の増殖を抑制し治療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少しずつ異なっています。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良いため1日2回でよく治療しやすくなった。現在本邦で用いられている薬剤と投与期間を表4に示した²⁾。

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いうえに抗体が陰性であるため治療までの時間もかかる。投与期間は5~10日

間とされている。現在の薬剤は潜伏感染状態の HSV を排除することはできないので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治療が必要である。

2. 再発

再発例は一般に症状が軽いので投与期間は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が得られるので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時に服用させると発症しないことも多い (Patient initiated treatment, 先制療法) ので外国ではしばしば行われているが、本邦では保険の適用はない。

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。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) が開発され良好な結果

表4 性器ヘルペスの治療

	薬剤と投与法	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> 静注用アシクロビル 5 mg/kg 1日3回点滴静注	5～10日間 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 <重症例> 3%ピダラピン軟膏 } 1日数回塗布 5%アシクロビル軟膏 }	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

を得ている。この方法を年6回以上再発する症例に用いたところ、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。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。抑制療法中でも再発することはあるが、その症状は軽い。さらに、抑制療法を行った時には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%抑えられることも証明されている⁷⁾。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いう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バラシクロビル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。時に抑制療法中に軽いが再発することがある。この場合は、1日2錠の治療量に3～5日間もどす。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

筆者は1回250mg 1日2回服用することをすすめていて良い結果が得られている。

2006年9月から本療法が始まっているが、市販後調査によってわが国でも諸外国と同様な治療効果が得られていること、長期にわたる服用による副作用もないことなど安全性も確かめられている。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で認められたが、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によるものであった。しかし、2006年のCDCのガイドラインでは再発回数が年6回以内の例や再発の症状も軽い例でも有効であるばかりでなく、本療法はHSVの排泄を抑制するので他人への感染のリスクを減らせることもあるので、再発時のみ服用する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⁸⁾。

2010年に体重40kg以上の小児に対してアシクロビル1回20mg/kg（ただし、800mgを超えない）を1日4回継続して投与することが承認された。

V. 性器ヘルペスと母子感染

妊娠中の単純ヘルペスウイルスの感染による児への影響には、胎内感染による胎芽や胎児の異常と分娩時感染による新生児ヘルペスがある。HSV の感染経路は接触感染が主で、ウイルス血症は極稀であるため幸いに前者の頻度は低く専ら性器のHSV 感染である性器ヘルペスにおける接触感染による新生児ヘルペスが問題となる。本邦における新生児ヘルペスの症例は年間14,000~20,000出生に1例程度と計算されており、それほど高い頻度ではない。しかし、有効な抗ヘルペスウイルス薬が開発された今日でも全身型では約30%は死の転帰をとり生存しても重症な障害が残るといふ重大な疾患である⁹⁾。

1. 単純ヘルペスウイルスの胎内感染による先天異常児

HSV の胎内感染による先天異常の症例は稀であるが知られている。文献検索によって Baldwin らは71例を報告している¹⁰⁾。その症状の特徴として、皮膚症状(癩痕, 皮疹など), 眼症状(小眼症, 脈絡網膜炎など), 神経症状(小頭症, 脳軟化症など)の三つが挙げられている。

文献検索によって世界で71例ということは極く稀にしか起こらないことを意味している。Brown らによれば, 米国で妊娠中にHSV-2に感染する頻度は2%にも及ぶという。しかし, ほとんどすべてが正常な児を出産していると報告しているので, 胎内感染は妊娠中の初感染の中でも極めて稀な事例と考えられるので, 妊娠中の性器ヘルペス合併では妊娠中絶の適応とはならないと考えている。

2. 新生児ヘルペス

新生児ヘルペスの大部分は母体の産道に感染している HSV の感染によると考えられている。臨床的には, 全身型(Disseminated

表5 新生児ヘルペスの病型と予後
(文献11より改変)

	全身型	中枢神経型	表在型
症状	敗血症様 黄疸 DIC 脳炎	けいれん 発熱	水疱 結膜炎 角膜炎
発症時期	5~11日	2~4週	5~11日
水疱	20%	50%	100%
死亡率	29%	4%	0%
発達障害	13%	70%	0%

Form), 中枢神経型(CNS Form), 表在型(Skin-Eye-Month Form)に分類されている(表5)。全身型はHSV が全身に拡がり多臓器不全で約30%が死亡する。中枢神経型は脳に局限し中枢神経障害が主な症状である。発症はやや遅れ2~4週といわれている。表在型はHSV が皮膚・眼・口腔などの表在に局限し予後は一般的には良い¹¹⁾。ただし, 表在型の中にはウイルス血症が認められ重症型に移行する例もあるので嚴重な管理が必要である。症例の分布は表在型が45%, 中枢神経型が35%, 全身型が20%との報告がある¹²⁾。水疱などの特徴的な症状を呈するのは30~40%程度でしかないため新生児ヘルペスの診断は難しいことが多い。診断が遅れてしまうことも本疾患の予後を悪くしている原因である。

3. 新生児ヘルペスのリスク因子

新生児ヘルペスの感染経路は胎内感染が5%, 分娩時感染が85%, 出生後の水平感染が10%と推定されている。分娩時感染が主になるが分娩時に性器ヘルペスを合併した場合, 初感染では約50%に, 再発例では0~2%に新生児ヘルペスを発症するとされている。筆者は新生児ヘルペス発症のリスク因子とその臨床的評価の実際を表6のように考えている。

表6 性器ヘルペス合併妊婦における新生児ヘルペス発症のリスク因子

	因子	臨床的判断材料
1) 母体	a) ウイルス量 b) ウイルス排泄部位 c) 再発頻度	病型：初発>再発 子宮頸管>外陰 再発頻度
2) 胎児	a) 移行抗体 b) 胎齢	母体の中和抗体 妊娠週数
3) 感染効率	a) 接触時間 b) 皮膚の傷	子宮頸管>外陰 分娩時間 頭皮電極, 吸引・鉗子分娩

1) 母体の因子

a) ウイルス量：感染しているウイルス量が多ければ感染しやすい。初感染初発のウイルス量は再発に比べはるかに多いことが判っている。

b) ウイルス排泄部位：経膈分娩時、児頭は子宮頸管に接触する時間は外陰に接触する時間よりもはるかに長くまた濃厚である。したがって、外陰の病変よりも子宮頸管へのウイルス排泄の方が感染のリスクが高くなると思われる。

c) 再発の頻度：再発の頻度は症例ごとに大きな差がある。妊娠前や妊娠中に再発の頻度が多ければそれだけ分娩時に再発するリスクも高くなるであろう。

2) 胎児

a) 移行抗体：胎児は母体から移行抗体（中和抗体）によって受動免疫をうけることになる。母体の中和抗体を測定し、これがIgG抗体であることをみておくことが参考になる。母体の中和抗体は（胎児は補体活性が低いので）補体の入らない系で測定したものがよいと思う。

b) 胎齢：胎児の免疫的成熟はHSV感染による障害に大きく影響する。低出生体重児の予後が悪いことが知られている。

3) 感染効率

a) 接触時間：母体の感染部位と胎児の接

触時間が長ければ長いほど感染が起こりやすい。したがって、子宮頸管にHSVが排泄されている場合はリスクが高い。破水後の時間が長ければリスクも高くなる。

b) 皮膚の傷：HSVの感染は皮膚や粘膜から感染するが、傷があれば容易に感染が成立する。傷をもたらす医療行為としては、頭皮電極や吸引や鉗子分娩のような手術分娩があり、性器ヘルペス合併例ではこれらの操作を極力避けたい。

これらの諸因子の中で筆者がランク付けをすれば病型が最も重要である。特に初感染ではウイルス量が多く移行抗体がなく、かつ子宮頸管からのウイルス排泄もしばしばみられるからである。第2番目が子宮頸管からのウイルス排泄が陽性の場合で胎児の接触時間が長いからである。第3番目が母体の中和抗体が8倍以下の場合である。従来外陰病変のあることが最もリスクが高いと考えられてきた。初感染の場合は確かにウイルス量も多いのでリスクは高いが、再発例ではウイルス量が少なく、中和抗体が高く分娩時に外陰との接触は極く短時間でもあるのでそれほど高いリスクではないと思っている。

新生児ヘルペスの発症は感染病態が最も重要な因子であり、このような観点から妊婦の管理や分娩様式を決定するのが合理的ではないかと考えている。

表7 妊娠中の性器ヘルペスの治療

妊娠初期：5%アシクロビル軟膏， 局所塗布			
中～末期：			
初 発	アシクロビル	1,000mg 分5，	5～10日間， 経口
	または		
	バラシクロビル	1,000mg 分2，	5～10日間， 経口
重症例	アシクロビル	5 mg/kg 1回，	1日3回， 5～7日間， 点滴静注
再 発	アシクロビル	1,000mg 分5，	5日間， 経口
	バラシクロビル	1,000mg 分2，	5日間， 経口

表8 性器ヘルペスの合併妊娠の管理…分娩様式の選択

- | | | |
|-----------------|-------|--------------|
| ① 分娩時に外陰病変あり | …………… | 帝切 |
| ② 分娩時に外陰病変なし | | |
| a. 初感染 | …………… | 発症より1カ月以内…帝切 |
| | | 発症より1カ月以上…経膣 |
| b. 再発型または非初感染初発 | …………… | 発症より1週間以内…帝切 |
| | | 1週間以上…経膣 |

4. 性器ヘルペス合併妊婦の管理

筆者が40年間に経験した性器ヘルペス合併妊娠例は75例あり初感染初発が21例，再発・非初感染初発が54例であった¹³⁾。HSVの型をみると初感染初発ではHSV-1が10例，HSV-2が11例であるが，再発・非初感染初発では54例中43例(80%)がHSV-2であった。前述のようにこれらの分布は非妊婦の性器ヘルペスにおける臨床型とHSVの型の分布とほぼ同じである。妊娠の時期では，初期・中期・末期で大きな差はなく，どの時期でも発症する。この40年の間に新生児ヘルペスに関する知見も増え，また検査方法も進歩しており時代とともに妊婦の管理方法も変化してきたが，基本的には以下の管理をしてきた。

1) 発症時

妊娠中に性器ヘルペスと思われる症状が出現した場合，まず病原診断により診断を確定し同時に血清抗体を測定し，感染病態を決定

する。アシクロビルやバラシクロビルの胎児毒性が低いことが判明しているので治療は表7のように行っている。ただし，妊娠初期はアシクロビル軟膏を用いる局所療法を行っている。

2) 妊娠経過中

筆者は，無症候でHSVを排出していることがあるのと子宮頸管からの上行性感染のリスクを考慮して，外陰と子宮頸管からHSVの分離かLAMP法によるHSV-DNA検出を28週から35週まで2週に1回，36週以降は1週に1回行っている。

一方，母体の中和抗体を測定するとともにこれがIgG抗体であることをELISA法により確認する。中和抗体が8倍未満の場合はリスクが高くなるのではないかと考えている。

3) 分娩様式の選択(表8)

分娩時に外陰病変があれば帝王切開を行う。外陰病変がなくても初感染では発症より1カ月以内，再発では発症より1週間以内は

やはり帝王切開を行う。初感染では1カ月以上、再発では1週間以上経ていて外陰病変がなくウイルス検出が陰性であれば経膣分娩を行う。なお、新生児は出生時に目、鼻、口、耳、性器よりHSVの分離やDNA検出を行うとともに臍帯血のIgG抗体、IgM抗体を測定する。7日以上は入院管理して新生児ヘルペスの発症の早期発見に努める。

5. 再発性器ヘルペス合併妊婦の管理

妊娠中に性器ヘルペスが再発した例や性器ヘルペスの既往のある例をどのように管理するかについてはいろいろな考えがある。その理由は、分娩時再発例の経膣分娩による新生児ヘルペスの発症が0～2%と報告により多少差はあるが、いずれにしてもかなり低率であるからであろう。

オランダでは、分娩時に再発していても経膣分娩を行っているようだし、Proberも再発例では新生児ヘルペスを発症することはまずないと報告¹⁴⁾しているので、分娩時に再発していても経膣分娩による新生児ヘルペス発症のリスクはかなり低いとみてよいであろう¹⁷⁾。

英国の2007年のガイドラインをみると、分娩時に再発している場合、産婦に対して新生児ヘルペスの発症のリスクは非常に低いことを告げるようにするべきで帝王切開をルーチンにすすめることはないという立場をとっている¹⁵⁾。このような考えに至る背景には、英国では新生児ヘルペスは6万出生に対して1例と非常に低い頻度であることも関連しているであろう。

米国では病変があれば帝王切開を選択している¹⁶⁾。この考えに従えば分娩時の再発を抑えればよいことになる。米国では、性器ヘルペスによる帝王切開がかなり頻繁に行われているようであり、これに対して性器ヘルペスの再発抑制療法を妊娠36週より行って帝王切開しないで済むようにしようという考えで

ある。再発抑制療法とは、妊娠36週から分娩までアシクロビル200mg×4回、またはバラシクロビル500mg×2回を毎日服用する方法である。この量は、非妊婦に行われている再発抑制療法の2倍量である。

最近、再発性器ヘルペスを有する妊婦に妊娠36週以降の再発抑制療法を行った7つの研究（抑制療法646例、対照594例）のメタアナライシスが行われた¹⁷⁾。その結果、本療法は分娩時の再発を減らすので帝王切開分娩を減らすことができたとしている。しかし、新生児ヘルペスを減らすことができたというデータはないとしている。その理由は対照群594例に新生児ヘルペス例が1例も出ていないからであると述べている。筆者は、対照群に新生児ヘルペスが1例も出ていない事実に注目している。さらに、新生児への副作用はなかったと報告されているが、長期にわたる安全性についてのデータが示されていないことが問題であるとも述べている。実際、新生児に高濃度のアシクロビルを投与することにより好中球減少をもたらしたとする報告もある¹⁸⁾。しかし、米国のACOGやカナダはこの方法を推奨している¹⁹⁾が、その根拠が乏しいとする意見もある²⁰⁾。また、妊娠末期の再発抑制療法を無批判に一般的に行うことには慎重にするべきであるという識者の意見もある²¹⁾。

筆者は分娩時に再発していても経膣分娩を行っても新生児ヘルペスは発症しないというオランダの経験や、前述のProberの報告、そして筆者も再発性器ヘルペス例についてほとんどの例で経膣分娩を行ったが新生児ヘルペスの発症例はなかったなどの経験もあり、妊娠36週からの通常量の2倍量を用いる抑制療法を再発性器ヘルペス合併妊婦や性器ヘルペス既往のある妊婦の全例について行うことに疑義がある。アシクロビルは高濃度に胎児や羊水に移行することが知られているので1カ月

にもわたる抑制療法が長期的にみて胎児へ腎機能（アシクロビルは腎より排泄される）や骨髄機能に影響がないのかやはり不安であるし、もし胎児に腎機能障害があった場合でも問題はないのかと疑問を投げかけている専門家もいる。ただ、抑制療法は妊娠末期に子宮頸管からのHSV分離が陽性の例や妊娠10カ月に入ってから頻繁に再発をくり返す例、そして再発を恐れて精神的に不安定になっている妊婦などにはそれなりの意義はあろう。

6. 分娩管理の新しい試み

前述の抑制療法は、いつ再発するか判らないから妊娠36週から分娩まで行っているわけである。一方、臨床症状から再発を疑って帝王切開したものの後から振り返ると約3分の2はウイルス検査で陰性であったとの報告もある²²⁾。これらには、分娩時（入院時）に性器にHSVが感染していることを迅速に知ることのできる方法がないことが大きく関連している。

筆者は前述のように、迅速で感度・特異度ともにより核酸増幅法であるLAMP法が性器ヘルペスの診断に有効であることを確認した。この方法は2時間以内に結果を出せるし培養法とほぼ同じ感度である。そこで、入院時に外陰と子宮頸管からLAMP法にてHSV-DNAの検出を行い陰性の場合には経膈分娩を行い、陽性の場合には帝王切開で分娩させるという試みを行っている。この際、移行抗体の量を考慮に入れている。出生した児については、ただちに目、鼻、口、耳、性器についてLAMP法を施行し、陽性ならばただちに抗ウイルス療法を行う。陰性ならば経過観察とする。産褥3日目にも母体の外陰と子宮頸管と児について検査を行う。

この管理方法はまだ始まったばかりであるが、現在のところ新生児ヘルペス発症例はない。

おわりに

現在、性器ヘルペスを診断するための感度・特異度ともに優れた病原診断法が日常臨床の場で使用できないために正確な診断が難しい。さらに、型特異抗体の測定もできないので、性器ヘルペスの正しい感染病態も診断できない。これらの方法が保険で使用できるようになることを切望している。

新生児ヘルペスを出産した母体の70%は無症候であるといわれているが、産科医としては如何にこのような例を発見し予防するかが大きな課題である。同時に再発性器ヘルペス合併妊婦より2%と頻度は低いが新生児ヘルペス発症例があるともいわれているので、これらの例のリスク因子も検討する必要がある。

文 献

- 1) Kawana T, Kawagoe K, Takizawa K, Chen JT, Kawaguchi T, Sakamoto S : Clinical and virologic studies on female genital herpes. *Obstet Gynecol* 60(4) : 456~461, 1982
- 2) 性器ヘルペス. 性感染症 診断・治療ガイドライン2008 日本性感染症学会誌 19(1)supp : 62~66, 2008
- 3) 川名 尚 : 初発性器ヘルペスの感染病態. *日本産科婦人科学会千葉地方部会雑誌* 1 : 10~12, 2008
- 4) 東出誠司, 保坂憲光, 太田嘉則他 : 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(1) : 120~127, 2010
- 5) 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
- 6) 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. *日本性感染症学会誌* 16(1) : 97~103, 2005
- 7) 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
- 8) Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006 *MMWR* August 4, 2006/vol

- 55/No.RR-11
- 9) Kimberlin DW : Neonatal herpes simplex infection. *Clin Microbiol Rev* 17(1) : 1~13, 2004
 - 10) Baldwin S, Whitley RJ : Intrauterine herpes simplex virus infection. *Teratology* 39(1) : 1~10, 1989
 - 11) Malm G : Neonatal herpes simplex virus infection Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 14 : 204~208, 2009
 - 12) Read JS, Cannon MJ, Stanberry LR et al : Prevention of Mother-to-child transmitted of viral infections *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 38 : 274~297, 2008
 - 13) 川名 尚 : 単純ヘルペスウイルスの母子感染—産婦人科の立場から—. *日本周産期・新生児医学会誌* 44 : 902~905, 2008
 - 14) Prober CG, Sullender WM, Yasukawa LL et al : Low risk of herpes simplex virus infections in neonates exposed to the virus at the time of vaginal delivery to mothers with recurrent genital herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* 316(5) : 240~244, 1987
 - 15) Royal College of Obstetricians and Gynecologists : Management of genital herpes in pregnancy. RCOG Green-top Guideline No.30, 2007
 - 16) Roberts SW, Cox SM, Dax J et al : Genital herpes during pregnancy : no lesions, no cesarean. *Obstet Gynecol* 85 : 261~264, 1995
 - 17) Hollier LM, Wendel GD : Third trimester antiviral prophylaxis for preventing maternal genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and neonatal infection. *Cochrane Database Syst Rev* 23(1) : CD004946, 2008
 - 18) Kimberlin DW, Lin CY, Jacobs RF et al : Safety and efficacy of high-dose intravenous acyclovir in the management of neonatal herpes simplex virus infections. *Pediatrics* 108(2) : 230~238, 2001
 - 19) ACOG Committee on Practice Bulletins : ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. No. 82 June 2007. Management of herpes in pregnancy. *Obstet Gynecol* 109(6) : 1489~1498, 2007
 - 20) Gutierrez KM, Whitley RL, Arvin AM : Herpes Simplex Virus Infections in "Infectious diseases of the fetus and newborn infant" ed by Remington & Klein Elsevier, 7th ed. p.813~833, 2010
 - 21) Jones CA : Vertical transmission of genital herpes : prevention and treatment options. *Drugs* 69(4) : 421~434, 2009
 - 22) Brown ZA : HSV-2 Specific serology should be offered routinely antenatal patients *Rev Med Virol* 10 : 141~144, 2000

☆ ☆ ☆ ☆ ☆ ☆

単純ヘルペスウイルス

川名 尚

はじめに

妊娠中の単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus : HSV) の感染による児への影響には、胎内感染による胎芽や胎児の異常と分娩時感染による新生児ヘルペスがある。HSV の感染経路は接触感染が主で、ウイルス血症はごく稀であるため幸いに前者の頻度は低く、専ら性器の HSV 感染である性器ヘルペスによる新生児ヘルペスが問題となる。我が国における新生児ヘルペスの症例は年間 14,000~20,000 出生に 1 例程度と計算されており、それほど高い頻度ではない。しかし、有効な抗ヘルペスウイルス薬が開発された今日でも全身型の約 30% は死の転帰をとり、生存しても重症な障害が残るといった重大な疾患である¹⁾。

性器ヘルペス合併妊婦では、分娩時に児が産道を通る際に接触感染することがあるので、分娩時に性器ヘルペスを合併する例では帝王切開にて経腹的に分娩させて新生児ヘルペスの発症を予防することが行われている。この際、新生児ヘルペス発症のリスクを考慮して分娩様式を選択するのが妥当であろう。

本稿では、性器ヘルペスの感染病理に基づいた HSV の母子感染のメカニズムとその予防ならびに筆者らの新しい試みを述べてみたい。

性器ヘルペスの感染病態と診断

性器に感染した HSV は、局所で増殖して間もなく知覚神経を上行して後根の知覚神経節である仙

髓神経節に至り、ここで増殖した後潜伏感染する。潜伏感染している HSV は何らかの刺激により再活性化して複製(増殖)し感染性のウイルスが産生され知覚神経を下行して再び性器に出現する。出現する部位は S2~4 の支配領域で、外陰だけでなく子宮頸管からも HSV が排泄される。

性器ヘルペスは臨床的には初発と再発に分けられている。初発とは初めて発症した場合であり、再発とは以前に発症した経験がある場合である。さらに初発には初めて感染した場合と、すでに不顕性感染していた HSV が再活性化され症状が出現する場合とがある。前者を初感染初発、後者を非初感染初発と呼んでいる。前者は発症時に血清抗体は陰性であり、7~10 病日に IgM 抗体が出現する。後者は発症時に血清抗体 (IgG 抗体) が陽性であるので前者と鑑別できる。臨床症状から前者と後者をクリアカットに区別することは困難である。激しい症状を呈するものは初感染が多いが、初感染でも比較的軽い症状を呈するものや時に無症状のこともあり、血清抗体の結果をみて判断せざるを得ない。再発は身体的・精神的ストレス、発熱、全身的・局所的な免疫抑制状態、女性では月経や妊娠を契機に起こることが多い。性器ヘルペスの既往がある女性では妊娠すると再発しやすい。

HSV には 1 型 (HSV-1) と 2 型 (HSV-2) があり、性器にはこの両方が感染する。その上前述のように初発と再発に分けられる。そこで、性器ヘルペスの感染病態を感染した HSV の型と発症時の抗体を HSV-1 抗体と HSV-2 抗体に分けて検出して、その免疫学的背景を考慮すると表 1 のように九つに分類されかなり複雑である。後述するように、母子感染のリスクにこれらの感染病態が関連して

かわな たかし 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科
〒 213-8507 神奈川県川崎市高津区溝口 3-8-3
E-mail address : tkawana@med.teikyo-u.ac.jp

表1 性器ヘルペスの感染病態

臨床分類	発症時の抗体		感染 HSV	感染病態	発症時の抗体	感染病態
	型別抗体による				型別でない HSV 抗体	
	HSV-1 抗体	HSV-2 抗体		型別抗体による分類		
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		+	

いるので妊婦では型別を考慮した感染病態まで決めることが望ましい。ただ、我が国では現在 HSV-1 抗体と HSV-2 抗体を分けて測定することは保険ではできず、この両者を分けずに HSV 抗体として検出することで代用するしかないため、表にはこの場合の分類も示した。この場合は、HSV-1 抗体存在下の HSV-2 初感染を見逃すことになる。

性器ヘルペスの皮膚・粘膜の病変は、浅い潰瘍性病変か水疱が主である。病変の範囲は、外陰全体に及ぶものから時にはピンホール程度のものまでである。このような粘膜病変を呈するのは HSV 感染だけでなく、急性外陰潰瘍(Lipschütz 潰瘍)、真菌、接触皮膚炎、細菌感染などでもよく似た病変を形成するので、これらを鑑別するために HSV を直接検出する病原診断が必須である。病原診断にはウイルスの分離培養、ウイルス DNA の検出、感染細胞の検出法(保険適用あり)などがある。ただ小さい病変では感染細胞の採取は困難であるため、保険で行える検査の感度は低い。ゴールドスタンダードはウイルスの分離培養であるが、時間と費用がかかる。これに対し感度と特異度が大変よい HSV-DNA の核酸増幅法として、PCR 法や LAMP 法が開発されている。最近、簡単な器械でベッドサイドで2時間で結果を得ることのできる LAMP 法を用いた簡易キットが開発され、臨床の現場での使用が可能になりつつある²⁾。ウイルスの病原検査は外陰だけでなく子宮頸管からも行っ

てウイルスの感染範囲を明らかにすることが望ましい。

一方、母体の中和抗体を調べ、陽性の場合この抗体が胎盤を通過することのできる IgG 抗体であるか否かもみておくといよい。可能ならば、型特異抗体も測定し、表1の感染病態のどれに相当するかをみておく。特に妊娠末期ではこの点は重要である。

筆者が経験した性器ヘルペス合併妊娠例は75例あり初感染初発が21例、再発・非初感染初発が54例であった³⁾。HSVの型をみると初感染初発では HSV-1 が10例、HSV-2 が11例であるが、再発・非初感染初発では54例中43例(80%)が HSV-2 であった。これらの分布は非妊婦の性器ヘルペスにおける臨床型と HSV の型の分布とはほぼ同じである。

妊娠の時期による分布は、初期・中期・末期で大きな差はなく、どの時期でも発症する。産褥に発症した例が4例あった。

単純ヘルペスウイルスの胎内感染

HSV の胎内感染による症例は稀であるが知られている。文献検索によって Baldwin ら⁴⁾は71例を報告している。その症状の特徴として、皮膚症状(癩痕、皮疹など)、眼症状(小眼症、脈絡網膜炎など)、神経症状(小頭症、脳軟化症など)の三つが

あげられている。

文献検索によって世界で71例ということはごく稀にしか起こらないことを意味している。以前に、妊娠中のヘルペスウイルス感染は流産に至ることが多いといわれていたが、現在では否定的である。Brownらによれば、米国で妊娠中にHSV-2に感染する頻度は2%にも及ぶという。しかし、ほとんどすべてが正常な児を出産していると報告しているので、胎内感染は妊娠中の初感染の中でも極めて稀な事例と考えられるので、妊娠中の性器ヘルペス合併では妊娠中絶の適応とはならないと考えている。

新生児ヘルペスのリスク因子

以上のように胎内感染による異常児の発症はごく稀であるので、性器ヘルペス合併妊婦の管理の重要な点は新生児ヘルペスの発症予防である。

従来より、分娩時に性器ヘルペスを合併していると初感染の場合はその50%が、再発では0~2%に新生児ヘルペスを発症するといわれている。このような病型による新生児ヘルペスの発症率の違いは次のように説明される。まず、病巣の広さと感染ウイルス量が初感染では再発型に比べてはるかに広く、また多量である。外陰だけでなく子宮頸管からHSVが分離されるのは、前者では50~70%もの症例にみられるのに対し後者では5%以下と少ない。次に母体の血清抗体をみると、前者では急性期では抗体が陰性であり、したがって児への移行抗体はないのに対して、後者では高いIgG抗体を有しているのが児に移行して受動免疫を賦与することになる。Proberら⁵⁾は、再発型性器ヘルペス合併妊婦では新生児ヘルペスを発症することはほとんどないとして、その理由に母体からの中和抗体の移行によるとしている。筆者も再発型43例について妊娠36週以降に母体の中和抗体を測定しているが8~16倍以上の抗体価を有していた。これらの例から新生児ヘルペスの発症は1例もなく、移行抗体が何らかの予防に働いているのではないかと考えている。Brownら⁶⁾は、母体の感染病態と新生児ヘルペス発症の関連を調べた結果、初感染初発では80%、HSV-1

表2 性器ヘルペス合併妊婦における新生児ヘルペス発症のリスク因子

	因子	臨床的判断材料
1) 母体	a) ウイルス量 b) ウイルス排泄部位 c) 再発頻度	病型：初発>再発 子宮頸管>外陰 再発頻度
2) 胎児	a) 移行抗体 b) 胎齢	母体の中和抗体 妊娠週数
3) 感染効率	a) 接触時間 b) 皮膚の傷	子宮頸管>外陰 分娩時間 頭皮電極、吸引・鉗子分娩

抗体が陽性であるがHSV-2に感染した例では30%に、再発例で2%に新生児ヘルペスが発症したとしている。

筆者は新生児ヘルペスのリスク因子を表2のように母体因子、胎児因子、感染しやすさの三つの因子について考慮して管理法を決めている。

性器ヘルペス合併妊婦の管理

筆者は、以下のような管理を行ってきた。

1. 発症時

妊娠中に性器ヘルペスと思われる症状が出現した場合、まず病原診断により診断を確定し同時に血清抗体を測定し、感染病態を決定する。アシクロビルやバラシクロビルの胎児毒性が低いことが判明しているため、治療は抗ウイルス薬を用いて表3のように行っている。ただし、妊娠初期はアシクロビル軟膏などを用いて局所療法を行っている。

2. 妊娠経過中

筆者は、HSV感染の病態を詳しく把握しつつ新生児ヘルペス発症のリスク因子を探すべく妊婦管理を行っているため、外陰と子宮頸管からHSVの分離かLAMP法によるHSV-DNA検出を28~35週まで2週に1回、36週以降は1週に1回行っている。無症候でHSVを排出していることがあるのと子宮頸管からの上行性感染のリスクを考えてこのようにしている。

表3 妊娠中の性器ヘルペスの治療

妊娠初期	5%アシクロビル軟膏, 局所塗布
中～末期	
・初発	アシクロビル 1,000 mg 分5, 5～10日間, 経口 バラシクロビル 1,000 mg 分2, 5～10日間, 経口
・重症例	アシクロビル 5 mg/kg 1回, 1日3回, 5～7日間, 点滴静注
・再発	アシクロビル 1,000 mg 分5, 5日間, 経口 バラシクロビル 1,000 mg 分2, 5日間, 経口

一方, 母体の中和抗体を測定し, これがIgG抗体であることをELISA法により確認する。中和抗体が8倍未満の場合はリスクが高くなるのではないかと考えている。中和抗体は補体を用いない時の抗体価を用いるようにしている。

3. 分娩様式の選択(表4)

分娩時に外陰病変があれば帝王切開を行う。外陰病変がなくても初感染では発症より1カ月以内, 再発では発症より1週以内はやはり帝王切開を行う。初感染では1カ月以上, 再発では1週以上経ていて外陰病変がなくウイルス検出が陰性であれば経膈分娩を行う。なお, 新生児は出生時に目, 鼻, 口, 耳, 性器よりHSVの分離やDNA検出を行うとともに臍帯血のIgG抗体, IgM抗体を測定する。7日以上は入院管理とする。

前述した性器ヘルペス合併妊婦についてこの管理方式を行ったが, 新生児ヘルペスを発症した例はなかった。最近では後述する管理方法を行っている。

再発性器ヘルペス合併妊婦の管理

妊娠中に性器ヘルペスが再発した例や再発性器ヘルペスの既往のある例をどのように管理するかについては, いろいろな考え方がある。その理由は, 分娩時再発例の経膈分娩による新生児ヘルペスの発症が0～2%と報告により多少差はあるが, いずれにしてもかなり低率であるからであろう。

表4 性器ヘルペスの合併妊娠の管理: 分娩様式の選択

①分娩時に外陰病変あり→帝切
②分娩時に外陰病変なし
a. 初感染 発症より1カ月以内→帝切 発症より1カ月以上→経膈
b. 再発型または非初感染初発 発症より1週間以内→帝切 発症より1週以上→経膈

オランダでは, 分娩時に再発していても経膈分娩を行っているようだし, 前述のProberの報告でも再発例では新生児ヘルペスを発症することはまずないと報告しているので, 分娩時に再発していても経膈分娩による新生児ヘルペス発症のリスクはかなり低いとみてよいであろう。

英国の2007年のガイドラインをみると, 分娩時に再発している場合, 産婦に対して新生児ヘルペスの発症のリスクは非常に低いことを告げるようにすべきで帝王切開をルーチンに勧めることはしないという立場をとっている⁷⁾。このような考えに至る背景には, 英国では新生児ヘルペスは6万出生に対して1例と非常に低い頻度であることも関連しているであろう。

米国では外陰に病変があれば帝王切開を選択している⁸⁾。この考えに従えば分娩時の再発を抑えればよいことになる。米国では, 性器ヘルペスによる帝王切開がかなり頻繁に行われているようであり, これに対して分娩時の再発を抑えるべく性器ヘルペスの再発抑制療法を妊娠36週より行って帝王切開しないですむようにしようという考えがある。再発抑制療法とは, 妊婦が妊娠36週から分娩までアシクロビル200mg×4回, またはバラシクロビル500mg×2回を毎日服用する方法である。この量は, 非妊婦に行われている再発抑制療法の2倍量である。最近, 米国のACOGやカナダはこの方法を推奨している⁹⁾。

最近, 再発性器ヘルペスを有する妊婦に妊娠36週以降の再発抑制療法を行った七つの研究(抑制療法646例, 対照594例)のメタアナリシスが行われた¹⁰⁾。その結果, 本療法は分娩時の再発を減らすので帝王切開分娩を減らすことができたとしている。しかし, 新生児ヘルペスを減らしたというデータはないとしている。その理由は, 対照

群 594 例に症候性の新生児ヘルペス例が 1 例も出ていないからであると述べている。筆者は、対照群に新生児ヘルペスが 1 例も出ていない事実注目したい。さらに、新生児への副作用はなかったと報告されているが、長期にわたる安全性についてのデータが示されていないことが問題であるとも述べている。実際、新生児に高濃度のアシクロビルを投与することにより好中球減少をもたらしたとする報告もある。最近、これらの状況を踏まえて妊娠末期の再発抑制療法を一般的に行うことには慎重にするべきであるという識者の意見もある¹¹⁾。

筆者は、分娩時に再発していて経膈分娩を行っても新生児ヘルペスは発症しないというオランダの経験や、前述の Prober の報告、そして筆者も再発性器ヘルペス例についてほとんどの例で経膈分娩を行ったが新生児ヘルペスの発症例はなかったなどの経験もあり、妊娠 36 週からの抑制療法を再発性器ヘルペス合併妊婦や性器ヘルペス既往のある妊婦の全例に行うことには賛成しかねる。アシクロビルは高濃度に胎児や羊水に移行することが知られているので、1 カ月にもわたって通常の 2 倍量を毎日服用する抑制療法が長期的にみて胎児の腎機能(アシクロビルは腎より排泄される)や骨髄機能に影響がないのか、やはり不安である。さらにもし胎児に腎機能障害があった場合でも問題はないのか、という疑義を投げかけている専門家もいる。ただ、抑制療法は妊娠末期に子宮頸管からの HSV 分離が陽性の例や妊娠 10 カ月に入ってから頻りに再発を繰り返す例、母体の中和抗体が低い例などの新生児ヘルペス発症のハイリスクと考えられる場合や、再発を恐れて精神的に不安定になっている妊婦などにはそれなりの意義はある。

分娩管理の新しい試み

前述の再発抑制療法は、いつ再発するかわからないから妊娠 36 週から行っているわけである。一方、臨床症状から再発を疑って帝王切開したものの中から振り返ると約 2/3 は誤診していたという報告もある。これらには、分娩時(入院時)に性

器に再発または HSV が感染していることを迅速に知ることのできる方法がないことが大きく関連している。

筆者は、迅速で感度・特異度ともにより核酸増幅法である LAMP 法が性器ヘルペスの診断に有効であることを確認した。この方法は 2 時間以内に結果を出せ、培養法とほぼ同じ感度である。そこで、入院時に外陰と子宮頸管から LAMP 法にて HSV-DNA の検出を行い陰性の場合は経膈分娩を行う。陽性の場合母体の中和抗体が 8 倍未満か、8 倍以上でもウイルス量が多い場合は帝王切開で分娩させるが、ウイルス量が少ない場合で中和抗体が 16 倍以上あれば経膈分娩を試みる。出生した児については、直ちに目、鼻、口、耳、性器について LAMP 法を施行し、陽性ならば直ちに抗ウイルス療法を行う。陰性ならば経過観察とする。産褥 3 日目にも母体の外陰と子宮頸管と児について検査を行う。

この管理方法は未だ始まったばかりであるが、現在のところ新生児ヘルペス発症例はない。

おわりに

現在、性器ヘルペスを診断するための感度・特異度ともに優れた病原診断法がないために正確な診断が難しい。さらに、型特異抗体の測定もできないので、性器ヘルペスの正しい感染病態も診断できない。これらの方法が保険で使用できるようになることを切望している。

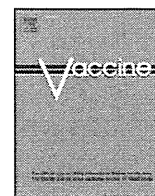
そして最後に最も重要なことは、新生児ヘルペスを発症した児を出生した母体の約 70% は性器ヘルペスの症状は全くなかったということである。いかにこのような無症候ではあるがリスクのある妊婦を抽出して、HSV の母子感染を予防するかが今後の大きな課題である。

文献

- 1) Kimberlin DW : Neonatal herpes simplex infection. Clin Microbiol Rev **17**(1) : 1-13, 2004
- 2) 東出誠司, 保坂憲光, 太田嘉則, 他 : 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**(1) : 120-127, 2010
- 3) 川名 尚 : 単純ヘルペスウイルスの母子感染—産婦人

- 科の立場から一. 日本周産期・新生児医学会誌 **44** : 902-905, 2008
- 4) Baldwin S, Whitley RJ : Intrauterine herpes simplex virus infection. *Teratology* **39**(1) : 1-10, 1989
 - 5) Prober CG, Sullender WM, Yasukawa LL, et al : Low risk of herpes simplex virus infections in neonates exposed to the virus at the time of vaginal delivery to mothers with recurrent genital herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* **316**(5) : 240-244, 1987
 - 6) Brown ZA, Wald A, Morrow RA, et al : Effect of serologic status and cesarean delivery on transmission rates of herpes simplex virus from mother to infant. *JAMA* **289** : 203-209, 2003
 - 7) Royal College of Obstetricians and Gynecologists : Management of genital herpes in pregnancy. RCOG Green-top Guideline No. 30, 2007
 - 8) Roberts SW, Cox SM, Dax J, et al : Genital herpes during pregnancy : no lesions, no cesarean. *Obstet Gynecol* **35** : 261-264, 1995
 - 9) ACOG Committee on Practice Bulletins : ACOG Practice Bulletin. Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists. No. 82 June 2007. Management of herpes in pregnancy. *Obstet Gynecol* **109**(6) : 1489-1498, 2007
 - 10) Hollier LM, Wendel GD : Third trimester antiviral prophylaxis for preventing maternal genital herpes simplex virus (HSV) recurrences and neonatal infection. *Cochrane Database Syst Rev* 23 ; (1) : CD004946, 2008
 - 11) Corey L, Wald A : Maternal and neonatal herpes simplex virus infections. *N Engl J Med* **361**(14) : 1376-1385, 2009

* * *



Inactivated and adjuvanted whole-virion clade 2.3.4 H5N1 pre-pandemic influenza vaccine possesses broad protective efficacy against infection by heterologous clades of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in mice

Yuichi Harada^a, Ai Ninomiya-Mori^b, Yoshimasa Takahashi^c, Masayuki Shirakura^a, Noriko Kishida^a, Tsutomu Kageyama^a, Yoshikazu Tada^d, Masato Tashiro^a, Takato Odagiri^{a,*}

^a Influenza Virus Research Center, National Institute of Infectious Diseases, Gakuen 4-7-1, Musashi-Murayama, Tokyo 208-0011, Japan

^b Kobe Institute of Health, Kobe City 650-0046, Hyogo, Japan

^c Department of Immunology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan

^d The Research Foundation for Microbial Diseases of Osaka University, Kagawa 768-0061, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 June 2011

Received in revised form 8 August 2011

Accepted 18 August 2011

Available online 10 September 2011

Keywords:

H5N1 avian influenza

Adjuvanted H5N1 whole virion

pre-pandemic influenza vaccine

Cross-neutralizing antibodies

Cross-protective immunity

ABSTRACT

In this study, we evaluated the immunogenicity and protective efficacy of a candidate attenuated H5N1 pre-pandemic influenza vaccine of clade 2.3.4, rgAnhui, which was reverse genetically generated from highly virulent A/Anhui/01/2005 (H5N1) wild-type virus. When a low-dose antigen (0.3 µg HA) vaccine was combined with aluminum hydroxide adjuvant, virus neutralization and anti-HA IgG antibodies induced in the sera of vaccinated mice showed similar levels as those in mice vaccinated with non-adjuvanted high-dose antigen (3 µg HA) vaccine. Serum antibodies had broad reactivity against highly pathogenic H5N1 viruses of both homologous and heterologous clades. All mice vaccinated with adjuvanted and non-adjuvanted rgAnhui vaccines at low and high antigen doses survived, without any significant weight loss, lethal challenge infection with homologous clade 2.3.4 viruses, including antigenic variant virus and heterologous clade 2.1.3. Mice vaccinated with low-dose antigen without adjuvant, however, exhibited 20% and 60% survival rates against clade 1 and clade 2.2 viruses, respectively; but, addition of adjuvant improved these rates to 80% and 100%, respectively. The data strongly suggest that aluminum hydroxide-adjuvanted rgAnhui vaccine can elicit broad cross-reactive and protective immunities against homologous and heterologous clades, and that the rgAnhui vaccine is a useful pre-pandemic H5N1 vaccine.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (H5N1 HPAIV) has become enzootic in some countries and has the potential to cause an influenza pandemic. The direct avian-to-human transmission of H5N1 HPAIV, with a high mortality rate, was first reported in Hong Kong in 1997 [1,2]. Subsequently, the number of reported human infections has increased in various countries around the world, particularly in Southeast Asia, the Middle East and Africa. As of August 2, 2011, the World Health Organization (WHO) has confirmed 563 cases of human infections and 330 deaths in 15 countries [3]. Most cases of H5N1 HPAIV infection in humans appear to be caused by direct avian transmission. However, several suspected cases of human-to-human transmission have also been reported [4–6], and these viruses have the potential to become human-adapted viruses

due to the accumulation of mutations in their genome. Although there have been no reports of human infections in Japan, the isolation of H5N1 HPAIV from wild birds and outbreaks at poultry farms have been intermittently reported since 2003. In particular, 30 cases of virus detection in wild birds and 24 outbreaks in poultry farms were confirmed to be caused by clade 2.3.2 viruses in 2010 and 2011 [7]. Furthermore, anti-H5N1 HPAIV antibodies were detected in workers exposed to H5N1 HPAIV-positive poultry, although they showed no symptoms suggestive of viral infection [8]. Thus, sustained measures against H5N1 HPAIV by more rigorous monitoring of both wild birds and poultry, and by the national stockpiling of pre-pandemic H5N1 vaccines remain a high priority for pandemic preparedness.

The development of attenuated H5N1 vaccines from H5N1 HPAIVs isolated from wild birds, poultry and humans is performed by reverse-genetics (rg) to modify the virulent H5 hemagglutinin (HA) gene and to reassort the six backbone genes of A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1) virus [9–11]. These rg H5N1 virus vaccines generally have low immunogenicity without adjuvant [12]. Conse-

* Corresponding author. Tel.: +81 42 848 7162; fax: +81 42 561 6149.

E-mail address: todagiri@nih.go.jp (T. Odagiri).

quently, we [13] and other groups [14,15] have assessed the effects of aluminum hydroxide adjuvant (alum), which is the most widely used licensed adjuvant for human use [16], and have confirmed positive results with respect to strengthened immunogenicity in mouse models and human clinical studies. However, other oil-in-water adjuvants, such as MF-59 [17] and AS03 [18], have recently been licensed and are now used in human H5N1 vaccines [19–22].

The H5N1 HPAIVs isolated worldwide have diversified both genetically and antigenically, and the current major isolates are clade 2.3.2 viruses detected in Hong Kong (SAR), China, Korea and Japan and clade 2.2.1 viruses detected in Egypt, although clade 1 viruses, which were the major isolates in 2004 [23], are still sporadically detected in Cambodia [24]. Therefore, multiple H5N1 vaccine candidate viruses from these clades, or a vaccine virus that can elicit broad reactive and protective immunities against various clades of H5N1 HPAIVs, must be prepared for pandemic preparedness.

In the present study, we assessed the immunogenicity and protective efficacy of an inactivated H5N1 whole virus vaccine, rgAnhui, with or without alum adjuvant against homologous and heterologous clades of H5N1 HPAIVs using a mouse model.

2. Materials and methods

2.1. Vaccine virus and adjuvant

Recombinant avirulent A/Anhui/01/05-PR8-IBCDC-RG5 (rgAnhui01/05) virus generated from the virulent A/Anhui/01/05 strain by reverse genetics (rg) was obtained from the United States Centers for Disease Control and Prevention (USCDC, Atlanta, USA). Virus was grown in the allantoic cavity of 10-day-old embryonated chicken eggs and purified by velocity density gradient centrifugation through a 10–50% linear sucrose gradient. The purified virus pellet obtained by ultracentrifugation was re-suspended in phosphate buffered saline (PBS) and inactivated by 0.05% formalin, as described previously [13].

A portion of the purified virus was separated by SDS-PAGE using a 12.5% polyacrylamide gel. The gel was stained with Coomassie brilliant blue, and the gel image was captured using a CS cool saver (ATTO, Tokyo, Japan). The digitized gel image was then analyzed with a CS analyzer (ATTO), and the percentage HA content (%HA) was calculated by $(HA1 + HA2)/(HA1 + NP + M1 + HA2) \times 100$. Protein concentration of the purified virus was determined using a DC protein assay kit (Bio-Rad Laboratories K.K., Tokyo, Japan) based on the modified Lowry method. HA content ($\mu\text{g}/\text{mL}$) was calculated by $(\%HA) \times (\text{protein concentration})$. Purified virus was appropriately diluted and mixed with aluminum hydroxide gel or PBS in order to obtain a final concentration of 0.3 mg/mL.

2.2. Animals, immunization and H5N1 HPAIV challenge

Eight-week-old female BALB/c mice were purchased from Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan). Procedures involving mice were performed in accordance with the institutional guidelines for animal care.

Five mice per group were subcutaneously immunized twice at a 3-week interval with 100 μl of formalin-inactivated virus vaccine containing 0.3 or 3 μg HA with or without alum adjuvant. Mice in the control group were immunized according to the same schedule with alum adjuvant only. Three weeks after the last immunization, mice were anesthetized and then intranasally inoculated with 20 μl of virus solution containing 20 \times 50% mouse lethal dose (MLD_{50}) of H5N1 HPAIV. The H5N1 HPAIVs used in this study were: A/Viet Nam/JP1203/2004 (VN) [clade 1], A/Indonesia/5/2005 (Indo) [clade 2.1.3], A/Turkey/12/2006 (Tk) [clade 2.2], A/Japanese White Eye/HK/1038/2005 (JWE) [clade 2.3.4], A/Laos/JP127/2007 (Laos)

[clade 2.3.4] and A/Myanmar JPA007-07/2007 (Myan) [clade 2.3.4]. For 2–3 weeks after lethal H5N1 HPAIV challenge, mice were monitored daily for their survival and weight. During monitoring, mice losing 30% of their body weight were euthanized.

2.3. Hemagglutination inhibition (HI) assay

Post-infection ferret anti-sera raised against JWE, rgAnhui and Laos viruses were provided by the USCDC. Sera were treated with RDE (Denka Seiken, Niigata, Japan) for 18–20 h at 37 °C and were then inactivated by incubation for 30 min at 56 °C. Sera were treated with packed turkey red blood cells for 60 min at room temperature in order to remove non-specific hemagglutinating factors in the sera. Using U-bottom 96-well microtiter plates (AGC Techno Glass Co., Ltd., Chiba, Japan), 25 μl of sera were serially diluted 2-fold with PBS and mixed with an equivalent volume of test antigens containing 8 hemagglutinating units (HAU) of virus. The mixture of diluted sera and virus was incubated for 30 min at room temperature. Fifty microliters of 0.5% turkey red blood cells was added to the antigen/serum mixture and incubated for 45 min at room temperature. After determination of HI (positive or negative), endpoint antibody titers were expressed as the reciprocal value of the last dilution at which complete inhibition of hemagglutination was observed.

2.4. Titration of antigen-specific antibodies in mouse sera

Virus-neutralizing antibody titers were determined as follows. Sera were collected from mice at 21 days after the last vaccination, and were treated with RDE for 18–20 h at 37 °C, followed by inactivation via incubation for 30 min at 56 °C. Sera were serially diluted and mixed with an equivalent volume of H5N1 HPAIV containing 200 \times 50%-tissue-culture infectious dose (TCID_{50}) of virus. The mixture of diluted sera and virus was incubated for 30 min at 37 °C. Confluent monolayers of MDCK cells in 96-well microtiter plates were washed with PBS, and serum/virus mixtures were transferred into the wells. After incubation for 4 days at 37 °C under a humidified atmosphere containing 5% CO_2 , cells were fixed with 10% formalin and then stained with NB staining solution (0.1% naphthol blue black, 0.1% sodium acetate and 9% acetic acid). Stained cells were eluted with 100 mM NaOH, and optical densities at 655 nm were measured using a microplate reader (Model 550; Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan). Endpoint antibody titers were expressed as the reciprocal value of the last dilution with an optical density that was at least a half unit greater than the optical density of the uninfected control.

Viral HA-specific antibody titers were determined according to the method described by Takahashi et al. [25]. Briefly, baculovirus-produced recombinant HA proteins were used as the coating antigen, and viral HA-specific IgG1 and IgG2a antibodies in the sera of mice were measured by ELISA. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG1 and IgG2a antibodies (Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA) were used as detection antibodies.

2.5. Statistical analysis

For comparison among virus-neutralizing antibody titers against various HPAIVs, we performed Steel's method for multiple comparison. The virus-neutralizing antibody titers against 3–4 virus strains were compared with anti-Myan or anti-VN virus-neutralizing antibody titers. The *p*-value of each comparison under 0.05 was regarded as statistically significant difference.

Table 1
Antigenic properties of rgAnhui-H5N1 vaccine virus and HPAIVs.

Viruses	Genetic clade	Post-infection ferret sera		
		JWE	rgAnhui	Laos
VN	1	<10	20	40
Indo	2.1.3	80	1280	160
Tk	2.2	160	80	40
JWE	2.3.4	320	320	320
rgAnhui	2.3.4	160	1280	1280
Laos	2.3.4	160	1280	1280
Myan	2.3.4	40	160	320

Bold type refers to homologous HI titers for indicated viruses.

2.6. The survival curve was compared using Log-rank test

Student's *t*-test or Mann–Whitney U test was performed to compare viral HA-specific IgG1 and IgG2a antibodies against various virus strains.

All statistical analyses, except for Steel's method, were performed with PASW statistical software (IBM Japan Ltd., Tokyo, Japan) and the *p*-value of each comparison under 0.05 was regarded as statistically significant difference.

3. Results

3.1. Antigenic properties of rgAnhui vaccine virus and H5N1 HPAIVs

First, we analyzed the antigenic properties of all viruses used in this study by performing HI assay with post-infection ferret sera. As shown in Table 1, rgAnhui, Laos and JWE viruses of clade 2.3.4 exhibited similar antigenicity, as indicated by HI titers within 4-fold of the HI titers for each homologous antiserum. Myan virus, however, showed 8-fold lower HI titers against anti-rgAnhui and anti-JWE sera, and 4-fold lower HI titer against anti-Laos serum, indicating that the virus was antigenically different from rgAnhui and the two clade 2.3.4 viruses, although the Myan virus also belongs to clade 2.3.4. With respect to the heterologous clade viruses, the HI titer of Indo (clade 2.1.3) virus against anti-rgAnhui serum was the same as the homologous HI titer, whereas VN (clade 1) and Tk (clade 2.2) viruses exhibited 64-fold and 16-fold lower HI titers against anti-rgAnhui serum, respectively. Thus, HI assay clearly indicated that VN and Tk viruses were antigenically different from rgAnhui vaccine virus, while Indo virus was closely related to the vaccine virus, despite the heterologous genetic clade.

3.2. Induction of virus-neutralizing antibodies in sera from vaccinated mice

In order to investigate the immunogenicity of the rgAnhui vaccine, mice were subcutaneously vaccinated with a high (3 µg HA) or low (0.3 µg HA) doses of vaccine antigen with or without alum. On day 42 (21 days after the 2nd vaccination), sera were collected from vaccinated mice and virus-neutralizing antibody titers against various clades of wild-type H5N1 HPAIVs were measured (Fig. 1). JWE was used as a homologue of the wild-type virus in rgAnhui vaccine, as wild-type A/Anhui/01/2005 was not available and JWE virus is antigenically similar (Table 1). The virus-neutralizing antibody titer against homologous JWE virus was correlated with both the antigen dose and the presence of alum. Mice vaccinated with 0.3 µg HA antigen with adjuvant produced almost the same level of serum virus-neutralizing antibody as that induced by vaccination with 3 µg HA antigen without adjuvant, indicating that one-tenth the amount of vaccine antigen could be used with addition of alum. Similar reactivity occurred against the Laos strain, which is from

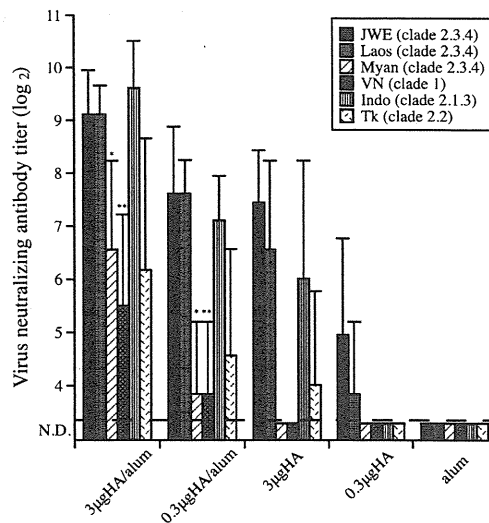


Fig. 1. Virus-neutralizing antibody titers in sera from vaccinated mice. Mice were vaccinated twice with H5N1 rgAnhui vaccine (clade 2.3.4) at a 3-week interval and with or without alum. On day 21 after the second vaccination, sera were collected, and the virus-neutralizing antibody titers against various clades (2.3.4, 1, 2.1.3 and 2.2) of H5N1 viruses were measured. Each bar represents the mean titer of virus-neutralizing antibodies, and error bars represent standard deviations. The dashed line represents the detection limit. **p* < 0.05 for comparison with JWE or Laos strain and *p* > 0.05 for comparison with VN strain using Steel's method. ***p* < 0.05 for comparison with JWE, Laos or Indo strain and *p* > 0.05 for comparison with Tk strain using Steel's method.

the same clade (2.3.4) and is antigenically similar to the rgAnhui vaccine virus (Table 1). In contrast, the antibody reactivity to an antigenic variant virus of clade 2.3.4, the Myan strain (Table 1), was significantly weaker than that of JWE and Laos strain (*p* < 0.05, Steel's method for multiple comparison), and the titer was similar to that against heterologous clade 1 virus, the VN strain. Furthermore, virus-neutralizing antibodies against the Myan strain were not detectable at any antigen dose with non-adjuvanted vaccine.

In order to assess cross-reactivity against heterologous clade viruses, virus-neutralizing antibody titers against the VN strain (clade 1), Indo strain (clade 2.1.3) and Tk strain (clade 2.2) were also measured (Fig. 1). Mice vaccinated with adjuvanted vaccine showed a high level of cross-reactive virus-neutralizing antibodies against Indo virus and an intermediate level of virus-neutralizing antibody against Tk virus. These cross-reactive virus-neutralizing antibodies were also detected by vaccination with high-dose non-adjuvanted vaccine. Virus-neutralizing antibody against VN strain was induced only in mice receiving vaccine antigen with adjuvant. Anti-VN virus-neutralizing antibody titers were similar to those of anti-Tk, but were significantly lower than anti-JWE, -Laos or -Indo antibody titers (*p* < 0.05, Steel's method for multiple comparison).

3.3. Protective efficacy of inactivated rgAnhui vaccine against lethal-dose infections with homologous clade H5N1 HPAIVs

The protective efficacy of rgAnhui vaccine was evaluated in mice that were subcutaneously vaccinated twice, as outlined in Fig. 1. On day 42, mice were anesthetized and intranasally infected with a lethal dose (20 × MLD₅₀) of homologous clade viruses (JWE, Laos or Myan). All mice vaccinated with either dose of antigen with or without adjuvant survived the lethal-dose infection (Fig. 2). Moreover, none of the infected mice lost a significant amount of weight during the 14-day observation period (Fig. 3). In contrast, the weight of control mice (inoculated with alum adjuvant alone) began to decrease at 4–6 days after HPAIV infection, and all control mice were dead by day 10 after infection (Figs. 2 and 3).

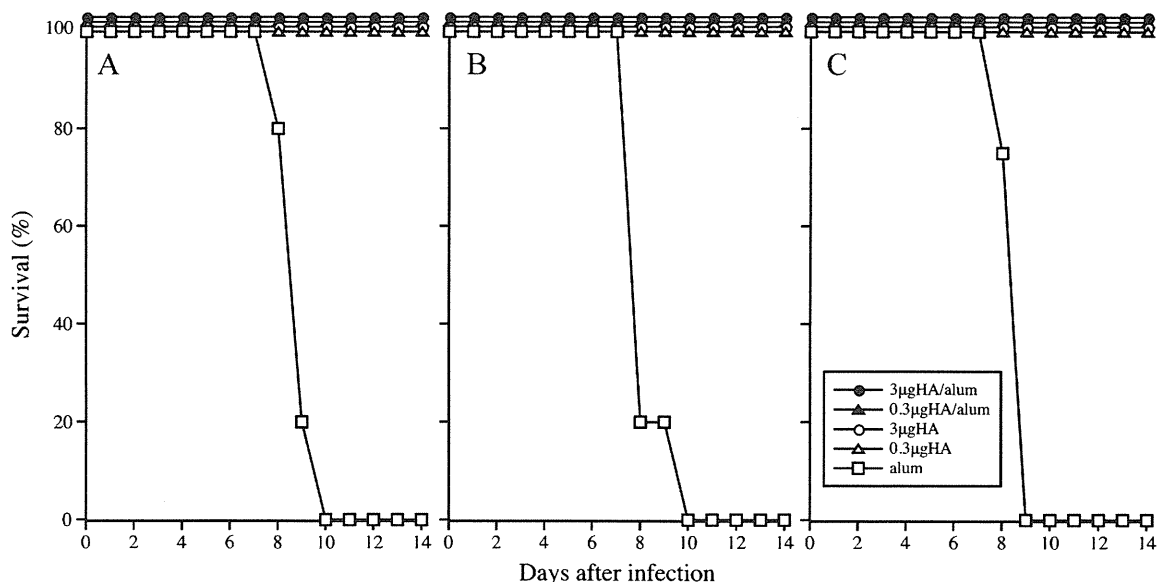


Fig. 2. Survival rate of vaccinated mice after lethal infection with homologous clade 2.3.4 viruses. Five mice in each group were vaccinated twice with H5N1 rgAnhui vaccine (with or without alum) at a 3-week interval (●, 3 µg HA with alum; ▲, 0.3 µg HA with alum; ○, 3 µg HA; △, 0.3 µg HA; □, alum). On day 21 after the second vaccination, mice were anesthetized and inoculated intranasally with a lethal dose of homologous clade JWE (A), Laos (B) or Myan (C) strain, and their survival was monitored for 2 weeks.

3.4. Cross-protective efficacy of inactivated rgAnhui vaccine against lethal-dose infections with heterologous clade H5N1 HPAIVs

Next, we examined the cross-protective efficacy of rgAnhui vaccine by challenge infection with $20 \times \text{MLD}_{50}$ of various heterologous clades of H5N1 HPAIVs. After clade 1 VN virus infection, only 20% of mice vaccinated with a low dose (0.3 µg HA) of non-adjuvanted vaccine survived (Fig. 4A), and severe weight loss similar to that of the control mice occurred until day 9 after virus infection (Fig. 5A). However, the survival rate increased to 80% when mice were vaccinated with the same dose of adjuvanted vaccine (Fig. 4A). These mice lost some weight during days 3–7, after which they returned to a normal weight (Fig. 5A). At a high dose

(3 µg HA) of adjuvanted vaccine, all mice survived and no significant weight loss was observed, whereas one mouse was dead at day 16 by vaccination with non-adjuvanted vaccine (Fig. 4A).

In a challenge infection with Indo virus (clade 2.1.3) (Figs. 4B and 5B), all vaccinated mice survived without significant weight loss, regardless of the dose and presence or absence of adjuvant, with the exception of mice vaccinated with 0.3 µg HA non-adjuvanted vaccine; these mice had a weight loss of approximately 10% during days 4–8, after which their weight recovered. In contrast, the control mice lost weight starting at 3 days after virus infection, and all control mice were dead by day 9 after infection (Fig. 5B).

On challenge infection with Tk (clade 2.2) virus (Fig. 4C), the survival rate of mice vaccinated with 0.3 µg HA non-adjuvanted

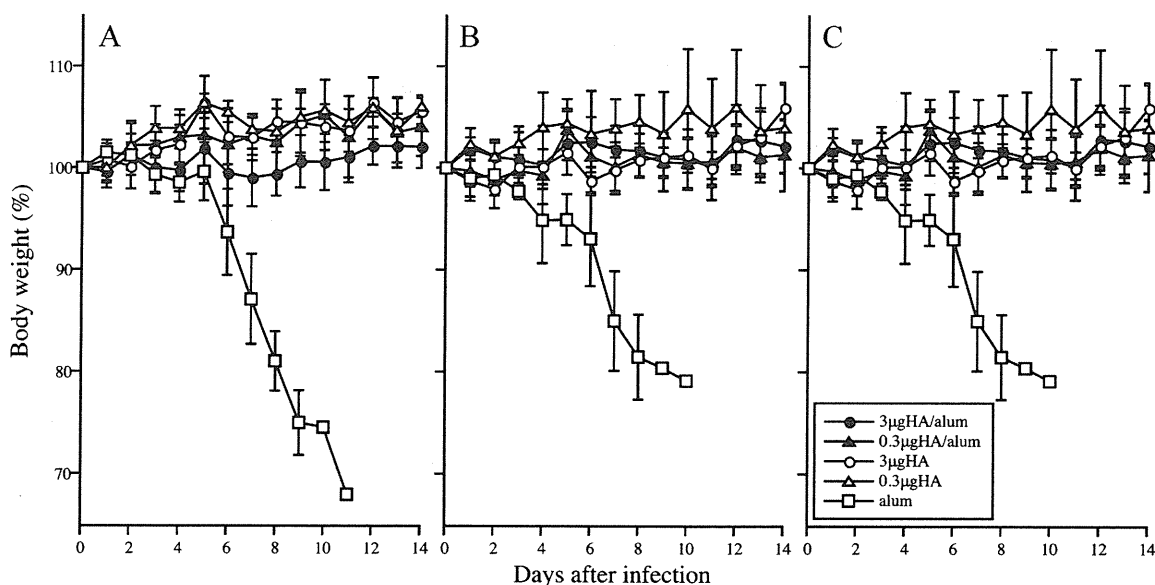


Fig. 3. Weight changes in vaccinated mice after lethal infection with homologous clade 2.3.4 viruses. Five mice in each group were vaccinated twice with H5N1 rgAnhui vaccine (with or without alum) at a 3-week interval (●, 3 µg HA with alum; ▲, 0.3 µg HA with alum; ○, 3 µg HA; △, 0.3 µg HA; □, alum). On day 21 after the second vaccination, mice were anesthetized and inoculated intranasally with a lethal dose of homologous clade JWE (A), Laos (B) or Myan (C) strain, and their weight was monitored for 2 weeks. Weight is expressed as a percentage of weight on day 0. Data represent the mean weight of mice, and error bars represent standard deviations.

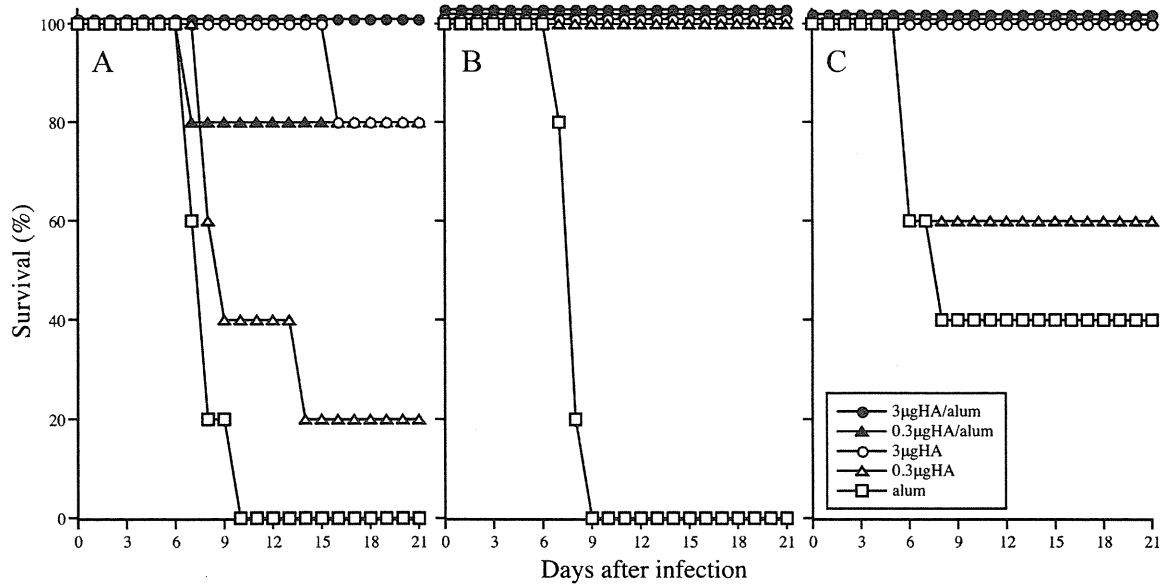


Fig. 4. Survival rate of vaccinated mice after lethal infection with heterologous clade viruses. Five mice in each group were vaccinated twice with H5N1 rgAnhui vaccine (clade 2.3.4) at a 3-week interval and with or without alum (●, 3 µg HA with alum; ▲, 0.3 µg HA with alum; ○, 3 µg HA; △, 0.3 µg HA; □, alum). On day 21 after the second vaccination, mice were anesthetized and inoculated intranasally with a lethal dose of heterologous clade 1 VN (A), clade 2.1.3 Indo (B) or clade 2.2 Tk (C) strain, and their survival was monitored for 3 weeks.

vaccine was 60%, which was not significantly higher than that of the control mice (Log-rank (Mantel-Cox) test, $p = 0.582$). However, the survival rate was 100% with the addition of adjuvant. At a high dose of vaccine antigen, all mice survived, regardless of the presence or absence of adjuvant. However, unlike other clades of challenge virus, Tk infection caused weight loss in all vaccinated mice starting at 1–2 days after infection (Fig. 5C). The severity of weight loss depended on the vaccine antigen dose (0.3 µg HA antigen was associated with more marked weight loss than 3 µg HA antigen), but all mice returned to a normal weight by day 14. Moreover, recovery from weight loss occurred earlier in the mice that received

adjuvanted vaccine as compared to the non-adjuvanted vaccine at the same vaccine antigen dose (Fig. 5C).

3.5. Detection of viral HA-specific IgG1 and IgG2a antibodies in sera from vaccinated mice

HA protein from influenza virus is the major antigen for induction of protective antibodies. Alum is thought to enhance the induction of antigen-specific IgG1 antibody responses [26,27]. It has also been reported that virus-specific IgG2a antibodies are induced by live influenza virus infection and are important to

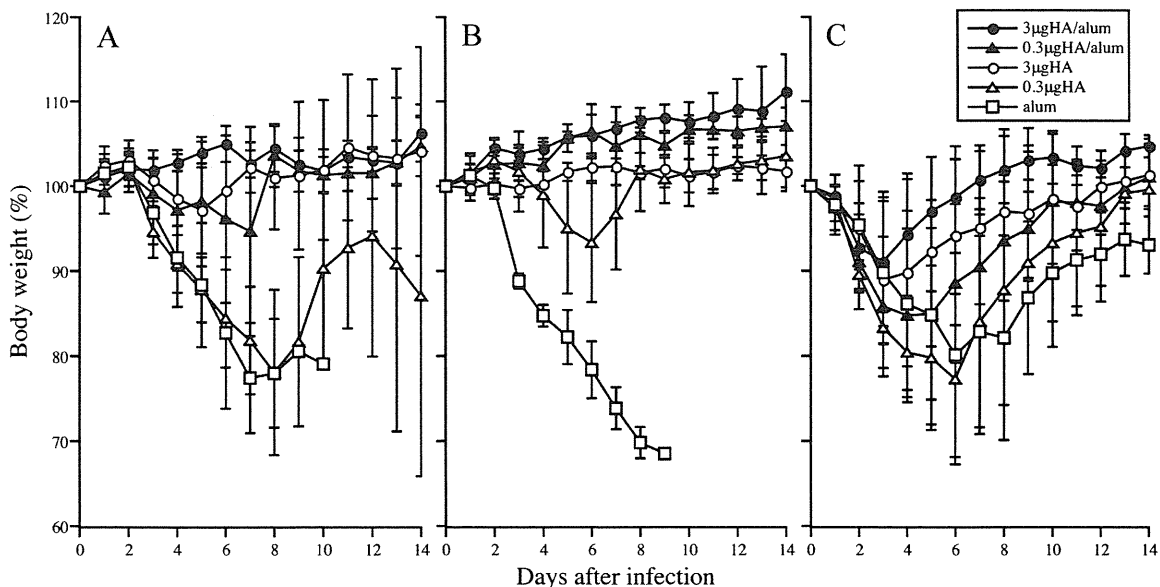


Fig. 5. Weight changes in vaccinated mice after lethal infection with heterologous clade viruses. Five mice in each group were vaccinated twice with H5N1 rgAnhui vaccine (clade 2.3.4) at a 3-week interval and with or without alum (●, 3 µg HA with alum; ▲, 0.3 µg HA with alum; ○, 3 µg HA; △, 0.3 µg HA; □, alum). On day 21 after the second vaccination, mice were anesthetized and inoculated intranasally with a lethal dose of heterologous clade 1 VN (A), clade 2.1.3 Indo (B) or clade 2.2 Tk (C) strain, and their weight was monitored for 2 weeks. Weight is expressed as a percentage of weight on day 0. Data represent the mean weight of mice, and error bars represent standard deviations.