

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癒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いう心配もある。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%ピダラビン軟膏 } 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（癬痕、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-Mouth 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。中枢神経型は脳に限局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・口腔などの表在に限局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厳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：経膣分娩時、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……………帝王切
- ② 分娩時に外陰病変なし
 - a. 初感染……………発症より1カ月以内…帝王切
 ………………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…帝王切
 ………………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えて、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方があり。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、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す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)のメタアナリシスが行われた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・特異度ともによい核酸増幅法である 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 Viral* 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

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

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

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	
	型別抗体による				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		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	+	
再発	+	+	HSV-2	HSV-2 非初感染初発	+	再発
	+	-	HSV-1	HSV-1 の再発	+	
	-	+	HSV-2	HSV-2 の再発	+	
+	+	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ことよい。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 (瘰癧、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。最近の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つた。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ざないと報告しているのだから, 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ないとこの立場をとっている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ろう。

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・特異度ともによい核酸増幅法である 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には経膈分娩を行う。陽性の場合には母体の中和抗体が 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* **85** : 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

* * *

治験

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

川名 尚*¹ 土屋裕子*¹ 西井 修*¹ 西澤美香*¹
東出誠司*² 保坂憲光*² 太田嘉則*² 神田秀俊*²

単純ヘルペスウイルスの簡易核酸増幅法として開発された PURE-LAMP 法について主に性器ヘルペス患者より得た臨床検体を用いて評価した。分離培養法陽性 130 検体のうち 126 検体 (96.9%) が PURE-LAMP 法で陽性であった。分離培養法陰性の 47 検体のうち PURE-LAMP 法で 39 検体 (83.0%) は陰性であったが 8 検体が陽性となった。しかしこれらは PCR 法ですべて陽性であったことより、分離培養法よりも PURE-LAMP 法のほうがやや感度がよいことが推察された。また、HSV の型は分離培養法と完全に一致した。

本法は検体の保存・運搬が容易であり約 1 時間半で型別に HSV-DNA の検出が可能で器具も簡易な装置でよい。以上よりベッドサイドでも用いることができる遺伝子増幅法として高く評価できる。

緒言

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus; HSV) は人体の広い範囲に感染し、様々な疾患の原因となる。性器の HSV 感染である性器ヘルペスは HSV の 1 型 (HSV-1) または 2 型 (HSV-2) の感染により発症し病変を形成するがその臨床症状は多彩である。一方これらの病変とよく似た変化が HSV の感染以外にもしばしばみられる¹⁾。したがって性器ヘルペスの確定診断には病原診断が必須である²⁾。性器ヘルペスは HSV の型により臨床的な経過が異なるので HSV の型を決めることは有意義である³⁾。

臨床検査には高い精度、迅速性、簡易性が求められる。特に単純ヘルペスウイルスには著効を示す抗ヘルペスウイルス薬があるので迅速性が重要である。従来、HSV 感染の病原診断の gold standard は培養であったが核酸増幅法である PCR 法が開発されて以来、核酸増幅法が第一選択となりつつある²⁾。

われわれはわが国で開発された新しい核酸増幅法である loop-mediated isothermal amplification (LAMP) が性器ヘルペスの病原診断に有効であることをすでに報告した⁴⁾。LAMP 法は短時間で DNA を感度よく検出できる点は評価できると考えている。今回より感度と特異度を上げるべく検体から DNA を簡便に抽出する器具 (procedure for ultra rapid extraction; PURE) を開発し、これを用いて DNA を抽出したのについて LAMP 法を用いて HSV-DNA を増幅して検出する PURE-LAMP 法を開発した⁵⁾。今回は PURE-LAMP 法としてキット化したものを用い臨床検体数を増やしその精度を培養法と PCR 法と比較しつつ検証した。

1. 対象と方法

1.1 臨床検体

2005~2010 年に帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科外来を訪れ HSV を分離して診断した女性性器ヘルペス患者 65 例 (HSV-1 による

*1 Takashi Kawana, Hiroko Tsuchiya, Osamu Nishii, Mika Nishizawa 帝京大学医学部附属溝口病院産婦人科

*2 Satoshi Higashide, Norimitsu Hosaka, Yoshinori Ota, Hidetoshi Kanda 栄研化学株式会社生物化学研究所

もの29例、HSV-2によるもの36例)ならびに性器ヘルペス合併妊婦2例、外陰に性器ヘルペスと類似の症状を呈した6例の患者(年齢は18~82歳、平均37.9歳)と性器ヘルペス合併妊婦より出生した新生児1例を対象とした。性器ヘルペス患者では初発例が25例で外陰から41検体、子宮頸管から20検体を得た。再発例が44例(初発例との重複4例)で外陰から65検体、子宮頸管から26検体を得た。PURE-LAMP法用検体は外陰病変を細い綿棒で擦過しPURE-LAMP法用の精製水2mlにて濯ぎPURE-LAMP法に供し、同じ綿棒で再度外陰病変を擦過しMEMに5%仔牛血清とペニシリン(2,500 U/ml)、ストレプトマイシン(1,000 γ /ml)、アンフォテリシンB (12.5 μ g/ml)を含有した培養液1mlに濯いだものを分離培養用に供した。別の細い綿棒を用い子宮頸管を擦過してPURE-LAMP法用検体を次に培養用検体を採取した。合わせると外陰から114検体、子宮頸管より53検体を得た。また臀部より7検体、背、指、性器ヘルペス合併妊婦より出生した新生児の鼻よりそれぞれ1検体を得た。これらの検体を採取するに際し口頭で病原診断を培養法と核酸増幅法で行うことを話し了解を得た。なおLAMP法の開発に関する研究について帝京大学医学部附属溝口病院の倫理委員会の承認を得ている。(2006年2月23日)

2 ウイルス分離培養と同定と型の決定

臨床検体は採取後4°Cに保管し4時間以内に分離を行った。検体を2,000 rpm 5分間遠心し上清約0.5 mlをR-66細胞(5×10^5 /ml) 5 mlと混合して37°Cの5%炭酸ガスインキュベーターで培養した。細胞変性効果(CPE)を毎日観察しCPEが50~80%に広がったところで感染細胞を採取し、HSV-1またはHSV-2に対するマウスモノクローナル抗体(ヘルペス1・2 FA 試薬「生研」)により同定と型の決定を行った。

3 PURE-LAMP法

臨床検体は4°Cに保存後直ちにまたは-60°Cに保存し融解後アッセイに供した。

PURE-LAMP法は、新規な核酸抽出法である

PURE法(「Loopamp[®] PURE DNA抽出キット」と、核酸増幅法であるLAMP法(「Loopamp[®] 単純ヘルペスウイルス(HSV-1/2)検出試薬キット」)を組み合わせた遺伝子検出法である(図1)。PURE法は患部擦過液100 μ lをアルカリ変性剤を含む検体処理チューブに添加後、攪拌してウイルスを溶解した。吸着剤チューブに検体処理チューブを装着後攪拌し、阻害物を吸着させた。滴下注入キャップを装着し、吸着剤チューブの本体中央部分を押すことで核酸を含む抽出液を乾燥試薬の付着した反応チューブに直接30 μ l滴下し、乾燥試薬を溶解してLAMP反応を開始した。乾燥LAMP法試薬は、HSV-1またはHSV-2検出用プライマー、基質、酵素などLAMP法に必要な成分を含んだ乾燥試薬として反応チューブのフタ裏に付着させてあり、PURE法抽出液を直接HSV-1とHSV-2検出用プライマーを含んだ乾燥試薬の付着したチューブに滴下し、試薬を溶解して遺伝子増幅を行った。LAMP反応にはLoopampリアルタイム濁度測定装置(LA-320C)を用い、65°Cで60分間反応した。時間とともに反応が進むと濁度が増すので専用ソフトウェアを用いて濁度を測定し0.1を超えた場合を陽性とし、その時間をthreshold time (Tt) 値とした。

4 PCR法

PCR法は、LightCycler HSV 1/2 Detection Kit (Roche)を用いた。QIAampDNA Mini Kit (QIAGEN)を用いて核酸を抽出し、抽出液3 μ lをPCR法に用いてキットの使用説明書に従い、LightCyclerによる蛍光検出を行った。

5 ゲノム感度

ゲノムの感度試験には、HSV-1およびHSV-2検出系ともにウイルスから抽出したコピー数が既知のゲノムDNAを用いて、LAMP法とPCR法で使用説明書に従い検出した。HSV-1に対する検出感度は、LAMP法で2.5コピー、PCR法では10コピーであった。HSV-2ではLAMP法、PCR法ともに5コピーであった。

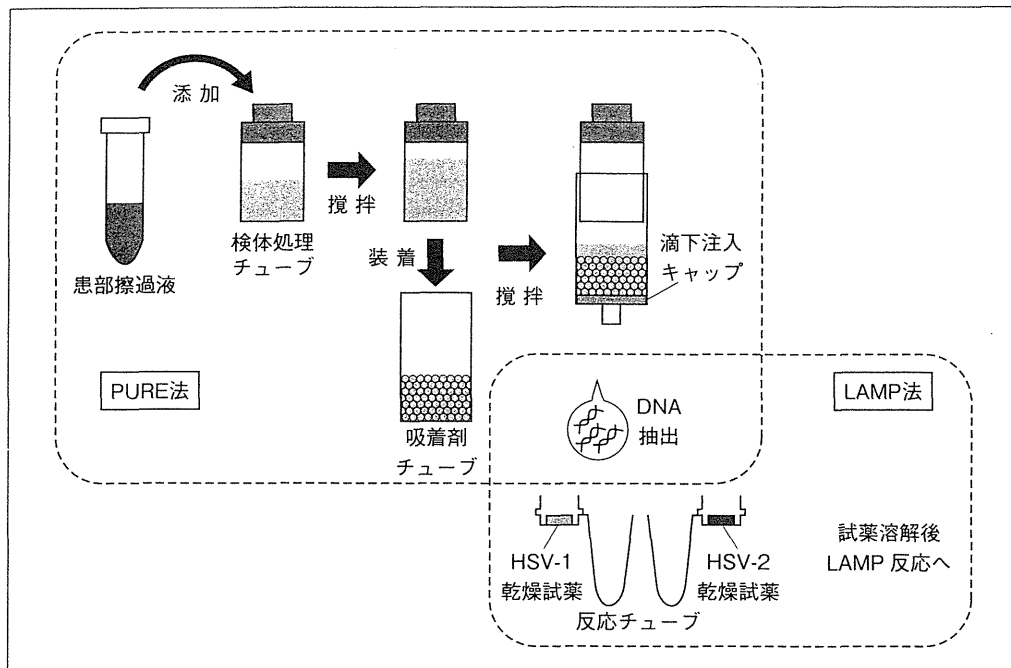


図1 PURE-LAMP 法の概略

表1 臨床検体採取部位と培養陽性率

臨床診断	感染 HSVの型	分離部位 (培養陽性/検体)						計
		女性性器		臀部	背	指	鼻	
		外陰	子宮頸管					
性器ヘルペス	HSV-1	49/52	12/23	2/2				63/77
	HSV-2	53/54	7/23	5/5	1/1	1/1		67/84
外陰炎など	不明	0/8	0/7				*0/1	0/16
		102/114	19/53	9/10				130/177

* : 新生児鼻 1 例

2. 結果

1 検体からの HSV 分離培養陽性率 (表 1)

全体を通じ 177 検体中 130 検体 (73.4%) が分離培養陽性となり 47 検体が陰性であった。HSV-1 による性器ヘルペス患者より採取した 77 検体のうち 63 検体 (81.8%) が分離培養で陽性となった。HSV-2 による性器ヘルペス患者より採取した 84 検体のうち 67 検体 (79.7%) が陽性であった。検体採取部位別にみると外陰より得た検体では 114 検体中 102 検体 (89.5%) が、子宮頸管より得た 53 検体中 19 検体 (35.8%)

が陽性であった。その他、臀部・背・指・鼻から採取した計 10 検体のうち 9 検体 (90%) が陽性となった。これらの臨床例から同時に採取した検体について PURE-LAMP 法を用いてその感度、特異度を検討した。

2 PURE-LAMP 法の結果

臨床検体に PURE-LAMP 法を用いた場合の濁度の変化の結果を示す (図 2)。177 検体中 HSV-1 プライマー反応チューブで 67 検体の濁度は 0.1 以上となり陽性となった。HSV-1 は Tt 値はすべて 30 分以内であった (平均 17.9 分)。HSV-2 プライマー反応チューブで 67 検体が陽

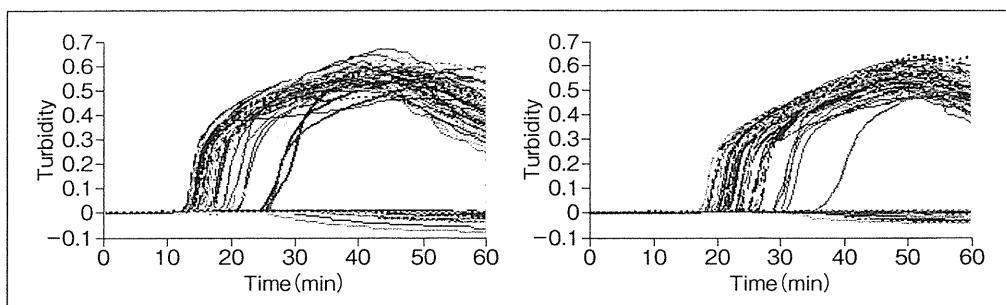


図2 PURE-LAMP 法による HSV-DNA 検出

表2 分離培養法と PURE-LAMP 法の比較

	PURE-LAMP 法		計	
	+	-		
分離培養法	+	126	4	130
	-	8	39	47
計	134	43	177	

性となった。Tt 値はほとんどが 35 分以内（平均 25.0 分）であったが、1 検体のみ Tt 値が 40 分であった。同検体を PCR 法による検出を試みたが、Ct 値が 40cycle 以降での検出であったことからこの検体はごく少量のウイルスしか含まれていないことが推察された。

3 分離培養法と PURE-LAMP 法の検出感度の比較 (表 2)

分離培養法陽性 130 検体中 126 検体 (96.9%) が PURE-LAMP 法で陽性となり 4 検体が陰性であった。分離培養法陰性 47 検体中 PURE-LAMP 法では 39 検体 (83.0%) が陰性となり 8 検体が陽性であった。分離培養法を gold standard とすると感度は 96.9%、特異度は 83.0% となる。

4 分離培養法と PURE-LAMP 法の比較 (表 3)

分離培養法と PURE-LAMP 法について感度を以下の項目について比較検討した。

1. 臨床型

性器ヘルペスの初発例と再発例に分けて感度を比較した。初発から得た 63 検体では培養法が 53 検体 (84.1%)、PURE-LAMP 法では 56 検体 (88.9%) が、再発例から得た 98 検体では培養法が 77 検体 (78.6%)、PURE-LAMP 法では 78

表3 分離培養法と PURE-LAMP 法の感度の比較

項目		分離培養法	PURE-LAMP 法
臨床型	初発	84.1% (53/63)	88.9% (56/63)
	再発	78.6% (77/98)	79.6% (78/98)
検体採取部位	外陰	96.2% (102/106)	94.3% (100/106)
	子宮頸管	41.3% (19/46)	54.3% (25/46)
HSV の型	HSV-1	81.8% (63/77)	87.0% (67/77)
	HSV-2	79.8% (67/84)	79.8% (67/84)

検体 (79.6%) がそれぞれ陽性でほぼ同じ感度であった。

2. 検体採取部位

外陰から得た 106 検体では分離培養法が 102 検体 (96.2%)、PURE-LAMP 法では 100 検体 (94.3%) が陽性となりほぼ同等であった。一方、子宮頸管から得た 46 検体では分離培養法が 19 検体 (41.3%) が陽性であったのに対し PURE-LAMP 法では 25 検体 (54.7%) が陽性となり PURE-LAMP 法が有意に高感度であった。

3. HSV の型による比較

HSV の型による陽性率はほぼ同等であった。

5 PURE-LAMP 法の型特異性の検討 (表 4)

分離培養法で HSV-1 と判定した 62 検体中 62 検体が PURE-LAMP 法でも HSV-1 と判定され

表4 PURE-LAMP法の型特異性の検討

		PURE-LAMP法		
		HSV-1	HSV-2	
分離培養法	HSV-1	62	0	62
	HSV-2	0	64	64
	計	62	64	126

HSV-2とされたものではなく、同じく分離培養法でHSV-2と判定された64検体中64検体がPURE-LAMP法でHSV-2と判定されHSV-1と判定されたものはなかった。型特異性については100%分離培養法と一致した。

6 乖離例の解析

分離培養法とPURE-LAMP法の間乖離がみられた検体が12検体あった。

1. 分離培養法(+)PURE-LAMP法(-)の4検体

まずこれらについてすでに分離培養法で得られていたこれらの例のHSVについてLAMP法で改めて検討を行ったところ、すべて陽性反応を示したことからプライマーの問題ではないと考えられた。次に検体へ既知の標的遺伝子を添加しPURE法を行ったところ、対照として用いた精製水とまったく同じ結果が得られたので検体由来成分による抽出・検出阻害、ゲノムDNAの分解はないと考えた。さらにPURE法で抽出した液に標的遺伝子を添加し対照の精製水と比較したところ、同等の結果が得られたことからLAMP反応が抑制されたとは考えにくい。

一方、これらの検体をPCR法にて検討したところ1例が辛うじて陽性となったが残りの3例は陰性であった。以上により検体採取において培養用の検体にはHSVがあったがPURE-LAMP法の検体にはPURE-LAMP法の検出限界以下の少量のウイルスしかなかったと考えられた。

2. 分離培養法(-)PURE-LAMP法(+)の8検体

これらについてPCR法を行ったところ全例陽性となった。

表5 分離培養法(-)PURE-LAMP法(+)検体の解析

No.	検体	型	HSV-1		HSV-2	
			PURE-LAMP	PCR	PURE-LAMP	PCR
7	C	1	18.9	30.1	—	—
9	V	1	17.4	27.9	—	—
10	V	1	27.6	33.5	—	—
15	C	1	28.8	36.3	—	—
39	C	2	—	—	32.9	30.8
107	C	1	18.2	28.6	—	—
139	C	2	—	—	28.2	34.8
143	C	2	—	—	29.7	34.4

cut off : PURE-LAMP ; 40 (min.) PCR ; 40 (cycle)

C : 子宮頸管, V : 外陰。

しかも型特異性もPURE-LAMP法とPCR法はすべて一致した(表5)。これらの検体を得た症例はすでに分離培養法により性器ヘルペスと診断され原因となったHSVの型も判明していた症例で、今回の検体は発症後時を経た経過観察中に採取したものである。8例中6例が子宮頸管からの検体であった。外陰の例では発症後時間が経った例であった。以上よりPURE-LAMP法のほうが培養法よりも感度がややよい可能性が示された。

7 細菌・真菌のコンタミネーション例

細菌や真菌の混在のため通常行っている分離培養法でHSVの検出が困難であった7例について検討したところ、5例がPURE-LAMP法とPCR法で陽性であった。なお、これらの検体について濾過滅菌後に改めて培養したところ、5例が陽性となり型も遺伝子増幅法と一致した。

3. 考 察

LAMP法はわが国で開発された新しい方式による核酸増幅法で多くの感染症で応用されている⁶⁾。単純ヘルペスウイルスDNAの検出にもすでに応用されている⁷⁾。われわれは性器ヘルペスの診断に有用であることを発表した⁴⁾。当

初、簡便性を求めて臨床検体を精製水にて濯いだものを直接 LAMP 法の系に入れて増幅を行ったが、主に子宮頸管からの検体のなかには混在する莢雑物のために LAMP 法を阻害する例がみられた。この点を回避するとともに、臨床検体における感度と特異性をさらに上げるべく PURE 法により臨床検体より DNA を簡単に迅速に抽出する方法を組み合わせた方法を開発した⁵⁾。今回は PURE-LAMP 法のキット化を試み、その臨床的有用性を症例数を追加して検討したところ、従来の gold standard である分離培養法に比べて感度は 96.9% であった。一方特異度が 83.0% と低かったがこれは分離培養法が陰性であった 47 検体のうちで PURE-LAMP 法では 8 検体が陽性となったためであった。これらについて同時に行った PCR 法でもこの 8 検体は陽性であったことから、PURE-LAMP 法の偽陽性反応ではなく培養法よりも感度がよい可能性を示すものと考えられた。文献的にも分離培養法と PCR 法を比較した研究では PCR 法が 4.1 倍感度がよいという報告⁸⁾や、また分離培養法は PCR 法の 70% の感度であるとの報告もある⁹⁾。今回の検討で性器ヘルペス患者の検体を用いた理由の一つは性器ヘルペスの 40% が HSV-1、60% が HSV-2 の感染によって発症することから¹⁰⁾ HSV-1 と HSV-2 の型特異的検出法を評価するための臨床検体としては好都合であると考えたからである。

単純ヘルペスウイルスの型を診断することは HSV-1 の自然感染部位が上半身と下半身であるのに対し HSV-2 はほとんどすべて下半身であり、また HSV-2 は性行為感染によって伝播するなどの疫学的、感染病理学的に違いがある。また HSV-2 による性器ヘルペスは HSV-1 による場合に比べはるかに再発しやすいなど予後にも関係することからカウンセリングのあり方にも違いがある¹¹⁾。これらのことから HSV の型を決めることが臨床的に大切である。HSV の型についても PURE-LAMP 法は培養法と完全に一致した。

培養法で陽性でありながら PURE-LAMP 法

で陰性となった検体については PCR 法でも陰性であったことからウイルス量が少なすぎたためではないかと考えている。

従来、分離培養法が gold standard であったが最近では核酸増幅法である PCR 法のほうが感度がよく短時間で結果が出せるし臨床検体の保存・運搬も容易であることなどから PCR 法などの核酸増幅法が取って代わる傾向にある²⁾。わが国では PCR 法を用いて多くの性器ヘルペス症例の診断について検討した報告はないが、われわれの開発した LAMP 法ではわが国で分離した 41 株について完全に検出できており今回用いているプライマーはわが国の HSV 株をほとんど検出できる優れたものであると考えている。また、本法を用いて今回検討した陽性例の検出時間はすべて 40 分以内であったことから、40 分の反応時間で判定が可能であると考えている。

女性の性器ヘルペスでは、外陰だけでなく子宮頸管にも HSV が感染することがあり¹¹⁾ また性器ヘルペスを合併した妊婦の管理においては子宮頸管の HSV 感染の有無が母子感染のリスクを規定する重要な因子でもあるので¹²⁾ 子宮頸管から得た臨床検体について PURE-LAMP 法を評価した。子宮頸管には子宮頸部や腔壁からの分泌物があり、細菌や真菌などの常在菌もいるため莢雑物も多いので LAMP 法の系を阻害することが危惧されたが、PURE-LAMP 法では子宮頸管から検出した分離培養陽性の 19 検体のすべてが陽性になったばかりでなくさらに分離培養で陰性であった 6 検体が陽性になった点は PURE 法により HSV-DNA がよりきれいな形で抽出できたからではないかと考えている。

性器ヘルペスの診断には実験室診断により確認することが必須であることが世界的に勧められている。その方法としては核酸増幅法が分離培養法であるが前者のほうが感度がよいといわれている²⁾。わが国で唯一保険診療が認められている蛍光抗体法による感染細胞の検出は感度が悪く、また性器ヘルペスでは時に非常に小さい病変を形成するため感染細胞が採取されず偽