

< Symposium 06-2 > 神経感染症における日本からの新たな発信

アシクロビル耐性単純ヘルペスウイルスによる 脳炎の診断および治療戦略

西條 政幸¹⁾

要旨：アシクロビル (ACV) の導入により単純ヘルペスウイルス (HSV) による中枢神経感染症の予後は改善されているものの、後遺症を残す患者が多い。ACV 治療に耐性の HSV-1 による脳炎の報告はなされているが、脳脊髄液から HSV-1 を分離することができないことからウイルス学的に ACV 耐性株による脳炎を証明することは難しい。私たちにより新生児におけるウイルス学的に証明された ACV 耐性 HSV-1 による脳炎について、世界ではじめて報告された。また、ACV 治療に抵抗性を示す脳炎患者について報告されている。そのひとつの原因として ACV 耐性株の出現が挙げられる。ACV 治療に抵抗性を示す患者の治療において、適切な治療には原因ウイルスの薬剤感受性の評価や治療薬の適切な選択が求められる。

(臨床神経 2014;54:1024-1027)

Key words：ヘルペス脳炎, アシクロビル, 感受性試験, ウイルス性チミジンリン酸化酵素, 脳脊髄液

単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus) には、1 型 (HSV-1) と 2 型 (HSV-2) とがあり、通常前者は初感染で歯肉口内炎を、後者は性器ヘルペスをひきおこす。多くのヒトは小児期に HSV-1 に、また、性活動が高まる年齢層で HSV-2 に感染する。ヒトがこれらのウイルスに感染すると、神経節に終生潜伏感染し、時に再活性化して HSV-1 は口唇ヘルペスや眼瞼ヘルペスを、HSV-2 は再発性陰部ヘルペスの原因となる。三叉神経節に潜伏している HSV-1 が末梢側に再活性化すると口唇ヘルペスや眼瞼ヘルペスをひきおこすが、時に再活性化にともない中枢神経節側にウイルスが侵入し、中枢神経感染症、脳炎 (herpes simplex encephalitis; HSE) をひきおこすことがある。また、妊婦の分娩に際し産道に HSV-1 や HSV-2 が排出 (shedding) され、産道感染経路で新生児が HSV に感染し、全身感染症や脳炎をひきおこすことがある。また、出生後早期に HSV に感染すると全身感染症や脳炎をひきおこすことがある。これを新生児ヘルペス (neonatal herpes) と呼ばれる。

HSE や新生児ヘルペスは、予後不良の感染性疾患である。アデノシン誘導体の vidarabine (ara-A, 商品名アラセナ) が開発され、これが HSE の治療にもちいられるようになり、予後の改善がみとめられた。しかし、この薬剤は細胞毒性も高く、重篤な副作用を誘導するリスクも比較的高い。1970 年代後半に、ウエルカム社の Elion GB 博士が、HSV の増殖を強く抑制し、一方で細胞毒性のきわめて低い薬剤、アシクロビル (acyclovir; ACV) を開発した¹⁾。これは DNA を構成する 4 つの塩基のひとつであるグアノシンの誘導体で、側鎖の 5 単糖が環状になっていない。ACV は細胞性のリン酸化酵素ではリン酸化を受けず、一方で、HSV 感染細胞で発現されるウイル

ス性チミジンリン酸化酵素 (viral thymidine kinase; vTK) でのみリン酸化を受け 1 リン酸体になり、さらに細胞性のリン酸化酵素でリン酸化が進み、3 リン酸体となる。ACV の 3 リン酸体は、ウイルスが増殖する際に発現するウイルス性 DNA ポリメラーゼ (DNApol) によりグアノシンの 3 リン酸体の代わりにウイルスの DNA の中に取り込まれる。取り込まれた ACV-3 リン酸体の側鎖が環状になっていないことから、DNA の伸長 (合成) が ACV-3 リン酸体の挿入された部位で終了することになり、結果的にウイルス増殖が抑制される (Fig. 1)。ACV は HSV の増殖を選択的に抑制し、かつ、副作用のきわめて少ない薬剤である。ACV が開発されて約 35 年が、ACV が日本で使用されるようになり約四半世紀が経過した。ACV が HSE の治療に使用されるようになり、HSE の予後は改善された。しかし、それでも一定の割合で死亡される患者がいること、また、回復しても後遺症を残すばあいが多いことから、HSE は依然として重篤な神経感染症といえる。

通常、HSE の診断には脳脊髄液 (cerebrospinal fluid; CSF) 中の HSV 遺伝子検出による。病原診断には定性的な PCR による HSV 遺伝子検出がもちいられ、治療効果の判定や経過の評価にはウイルス遺伝子量の推移をしらべる必要がある。そのばあい、定量的 PCR がもちいられる。ただ、HSV 感染症の診断には、病原診断だけではなく、治療経過を評価する上で病原診断だけではなく、起因ウイルスが ACV やその他の薬剤への感受性をしらべる必要がある。それは次の理由による。

臓器移植患者や AIDS のように免疫不全をとまう患者において、再発する HSV 感染症や再活性化を予防する目的で ACV を継続的に投与されることが多くなり、それにとまない ACV 耐性 HSV 感染症が問題となっている。また、HSE に対

¹⁾ 国立感染症研究所ウイルス第一部 [〒 162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1] (受付日: 2014 年 5 月 21 日)

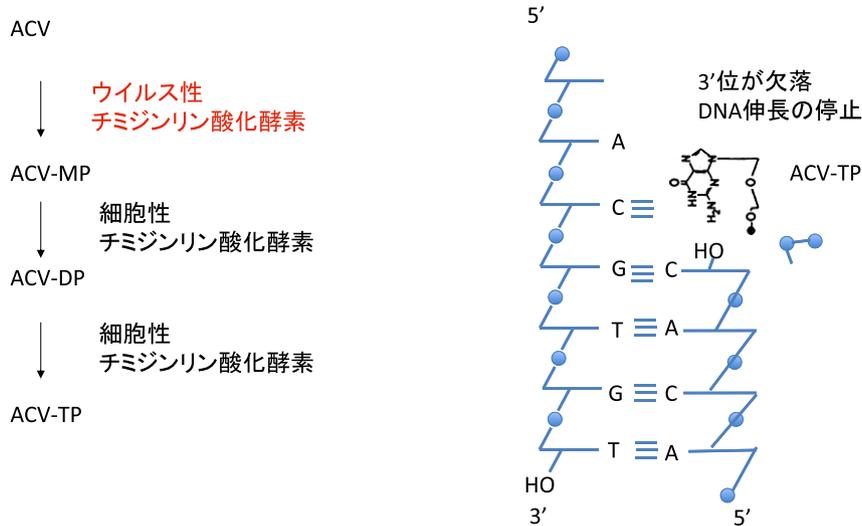


Fig. 1 ACV の作用機序.

ACV 三リン酸体 (ACV-TP) が DNApol の作用により C に相補的に DNA の中に組み込まれるが、糖鎖が環状になっていないため、その部分で DNA 伸長が停止し、それが HSV の増殖を抑制する。

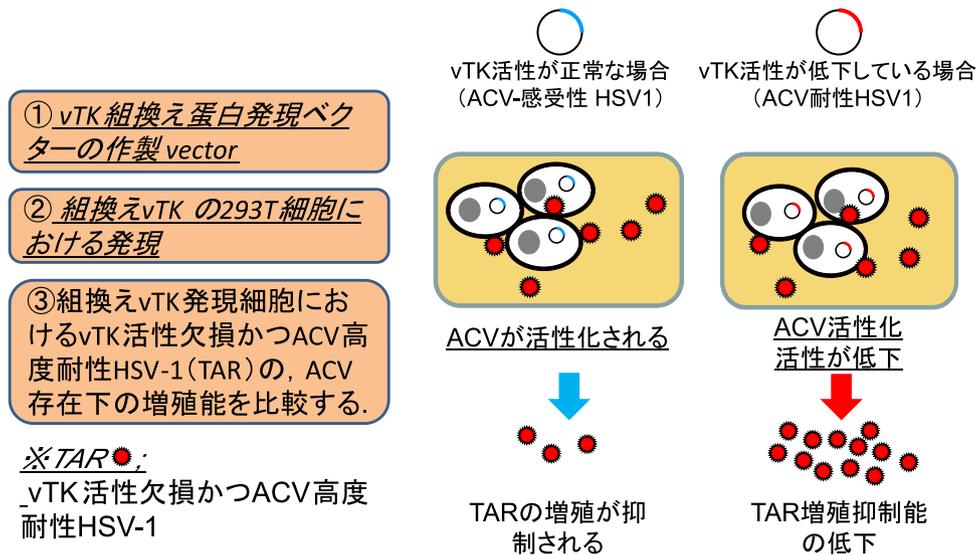


Fig. 2 vTK 遺伝子配列に基づく新規 ACV 感受性試験法.

当該 HSV-1 の vTK 遺伝子を哺乳細胞発現ベクターに挿入し、293 T 細胞に組換え vTK 蛋白質を発現させる。その細胞における vTK 欠損 ACV 高度耐性 HSV-1 の増殖を、正常 vTK 発現細胞におけるのと同様に ACV が抑制するばあいには当該ウイルスは ACV 感受性、増殖抑制効果が減弱しているばあいには ACV 耐性と判定される。

して ACV 治療に抵抗性を示す患者もおり、それが ACV に耐性を獲得したことによるのかどうかをしらべる必要があるからである。しかし、CSF から HSV が、とくに HSV-1 が CSF から分離されることはなく、薬剤への感受性をしらべることはできない。現実的に HSE に対する ACV 治療に抵抗性を示すばあいに、起因 HSV の薬剤感受性をしらべることはできなかった。

HSV が ACV に耐性を獲得するには、ACV をリン酸化させ

る vTK 遺伝子またはウイルス性 DNApol 遺伝子に変異が生ずる必要がある。ACV 耐性 HSV の約 95% は vTK 遺伝子に、残りの約 5% は DNApol に変異が生じているとされている²⁾。つまり、多くは vTK 遺伝子変異による。そこで私たちは次の方法をもちいて、起因ウイルスの vTK に関連 ACV 耐性の解析する方法を開発した。CSF から vTK 遺伝子を直接増幅し、塩基配列を決定して薬剤感受性を判定する方法である。このばあい、薬剤感受性を推定することが可能なばあいもある。ま

た、vTK 遺伝子を増幅し、増幅させた vTK 遺伝子を哺乳細胞発現ベクターに導入する。次いで 293 T 細胞にトランスフェクションして組換え vTK を発現させ、その細胞における ACV の ACV 高度耐性 vTK 欠損 HSV-1 の増殖抑制効果を解析することで vTK 関連の薬剤耐性の有無を評価する方法である³⁾。

脳炎を併発した新生児ヘルペス患者に対して ACV 治療を開始し、CSF 中の HSV-1 遺伝子量が治療開始後 4 週目まで徐々に低下した。しかし、5~6 週目にはウイルス遺伝子量が増加し、ACV 耐性 HSV-1 の出現を考え、vidarabine を追加する治療法に変更した。その結果、発症 11 週目に CSF 中のウイルスゲノム量が検出限界以下となった。ウイルス遺伝子量が増加した第 5 週目の CSF から vTK 遺伝子を PCR で増幅させ塩基配列を決定したところ、vTK 遺伝子の 3575 番目の塩基に変異 (G から T) が生じ、125 番目のアミノ酸変異 (Q から H) が生じていることが明らかにされた。上記の方法もちいて、この変異が ACV に耐性を誘導するか否かを解析し、同変異は ACV に耐性を誘導することが明らかにされた。新生児の HSE に対する ACV 治療経過中に ACV 耐性 HSV-1 が出現したことがウイルス学的に証明された⁴⁾。これはウイルス学的に証明された ACV 耐性 HSV-1 による HSE として世界ではじめての報告である。

最近、ACV 治療に抵抗性を示した健常人における HSE 患者の CSF から vTK 遺伝子を増幅し、遺伝子配列を決定することで ACV 耐性 HSV-1 の出現を明らかにしたとする論文が発表された⁵⁾。その論文によると vTK の 41 番目のアミノ酸変異 (R から H) が ACV 耐性を誘導していると推測されている。しかし、私たちはこの変異が ACV 耐性を誘導するか否かを上記の方法で解析したところ、ACV 耐性を誘導する確証はえられなかった (データ未公表)。ACV 治療に耐性を示す脳炎と ACV 耐性 HSV-1 による脳炎とは、明確に区別する必要がある。いずれにしても、治療においては ACV に加えて vidarabine や DNApol 阻害剤である foscarnet の投与を必要とするばあいがある。今後、そのようなばあいには単に薬剤を変更して臨床経過を評価するだけでなく、ウイルス学的な薬剤感受性評価がなされ、病態が明らかになることが期待される。

DNApol 遺伝子に変異に基づく ACV 耐性 HSV-1 のマウスに

おける神経病原性、他の薬剤に対する感受性などが明らかにされた研究では、DNApol 関連 HSV-1 は ganciclovir や CDV に対して多くのばあい高度感受性または感受性を示し、一方、ACV には交叉耐性を示した⁶⁾。ACV 耐性誘導機序によって、薬剤感受性パターンがことなることを示している。適切な治療には病原診断だけでなく、CSF 中の遺伝子量の推移の評価、薬剤感受性試験が重要である。最後の薬剤感受性試験をしらべるシステム開発は緒に就いた段階である。今後、より有用な感受性試験が開発され、HSE に対する適切な薬剤の選択が可能となる可能性がある。

※本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Elion GB, Furman PA, Fyfe P, et al. Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5716-5720.
- 2) Gaudreau A, Hill E, Balfour HH Jr, et al. Phenotypic and genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. J Infect Dis 1998; 178:297-303.
- 3) Shiota T, Lixin W, Takayama-Ito M, et al. Expression of herpes simplex virus type 1 recombinant thymidine kinase and application to a rapid antiviral sensitivity assay. Antiviral Res 2011;91:142-149.
- 4) Kakiuchi S, Nonoyama S, Wakamatsu H, et al. Neonatal herpes encephalitis caused by a virologically confirmed acyclovir-resistant herpes simplex virus 1 strain. J Clin Microbiol 2013; 51:356-359.
- 5) Schulte EC, Sauerbrei A, Hoffmann D, et al. Acyclovir resistance in herpes simplex encephalitis. Ann Neurol 2010; 67:830-833.
- 6) Wang LX, Takayama-Ito M, Kinoshita-Yamaguchi H, et al. Characterization of DNA polymerase-associated acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1: mutations, sensitivity to antiviral compounds, neurovirulence, and in-vivo sensitivity to treatment. Jpn J Infect Dis 2013;66:404-410.

Abstract**Diagnostic and therapeutic strategy for acyclovir-resistant herpes encephalitis**Masayuki Saijo, M.D., Ph.D.¹⁾¹⁾Department of Virology 1, National Institute of Infectious Diseases

Acyclovir (ACV), which inhibits the replication of herpes simplex virus, is the standard drug for the treatment of herpes simplex encephalitis. Thanks to the introduction of ACV, the morbidity and mortality of HSE patients have significantly improved. However, the disease is still the severe infection, because it makes some patients with HSE suffer from severe consequences. The sensitivity test of the etiological HSV to ACV is very difficult due to the inability of isolation of the virus from cerebrospinal fluid (CSF). The cases of the ACV treatment-resistant HSE patients have been reported. However, these cases were not virologically confirmed. The first case of encephalitis in newborn baby with HSE caused by an ACV-resistant HSV-1, which was virologically confirmed, was reported by our group. According to the sensitivity profile of the causative viruses to antiviral drugs, the drugs of choice for HSE should be properly considered. Strategy for diagnoses of HSE including antiviral sensitivity assessment and selection of drugs in HSE is reviewed.

(Clin Neurol 2014;54:1024-1027)

Key words: herpes simplex encephalitis, acyclovir, sensitivity assay, viral thymidine kinase, cerebrospinal fluid