

原著

日齢 90 未満のヘルペス脳炎疑い症例に対する
院内 real-time PCR 測定の有用性鈴木 大地¹⁾ 庄 司 健 介²⁾ 小山(若井)ちとせ²⁾
宮 田 一 平³⁾ 岩 瀬 徳 康⁴⁾ 宮 入 烈²⁾

要旨 新生児単純ヘルペスウイルス (HSV) 脳炎疑い症例に対して投与開始されたアシクロビル (ACV) は、髄液中の HSV 由来の DNA が PCR 検査 (HSV-PCR) で検出されないことをもって投与終了とすることが多い。HSV に対する PCR 検査は一般的に院外検査機関で行われるため、結果が得られるまでに数日を要する。当施設では 2009 年に院内研究室での HSV の real-time PCR 測定を開始した。2002 年 3 月から 2016 年 8 月までの期間に髄液検体での HSV-PCR 検査が提出された日齢 90 未満の症例を対象とし、院内測定の有用性について検討を行った。対象患者を院外測定群と院内測定群に分類し、検査実施件数、検査結果判明までの期間、治療期間、入院期間を比較した。髄液 HSV-PCR 検査は 118 例で提出されており、院外測定は 19 例 (16%)、院内測定は 99 例 (84%) であった。検査結果判明までの期間、ACV 投与期間、入院期間はいずれも院内測定群で有意に ($p < 0.05$) 短かった (各々の中央値 5.5 日 vs 1.0 日, 6.0 日 vs 2.0 日, 17.0 日 vs 8.0 日)。しかし、院内測定を開始した前後で検査実施件数は年間 2.3 件から 14.6 件に増加しており、検査を実施する閾値が低下していることが疑われた。院内 PCR 測定導入の有用性が示された一方で、適切な検査実施基準を検討する必要があると考えられた。

はじめに

新生児単純ヘルペスウイルス (herpes simplex virus: HSV) 脳炎は治療開始の遅れが生命予後、神経学的予後に重大な影響を与える疾患である。そのため新生児 HSV 脳炎が疑われる場合はアシクロビル (acyclovir: ACV) による治療を早期に開始することが推奨されている¹⁾。一方で新生児 HSV 感染症の罹患率は新生児入院の 0.2% を占めるに過ぎな

い²⁾。また、その症状も非特異的であることが多いため、本来は ACV による治療が必要でない症例にも ACV が投与されているのが実情である³⁾。ACV には腎障害、好中球減少などの副作用も報告されていることから、不必要な ACV 投与を減少させることが課題となっている²⁾。新生児 HSV 脳炎の診断は、その迅速性と特異性の高さから髄液検体を用いた HSV に対する PCR 検査 (HSV-PCR) を用いることが標準的となっている。経験的治療として開始され

Key words : 新生児ヘルペス感染症, real-time PCR, アシクロビル

1) 国立成育医療研究センター教育研修部 2) 同 生体防御系内科部感染症科 3) 川崎医科大学小児科学講座
4) 大阪大学微生物病研究所

連絡先: 宮入 烈 〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1 国立成育医療研究センター生体防御系内科部感染症科

た ACV は髄液での HSV-PCR が陰性であることを確認して投与を終了することが多い^{1, 4-7)}。しかし本邦では HSV-PCR は検査結果判明までに一定の期間を要する院外検査機関へ外注されることが多く、ACV 投与期間や入院期間が延長する一因となっている。

欧米においては髄液での HSV-PCR を院内機関で行うことにより、検査結果判明までの日数や入院期間が短縮し、ACV 使用量が減少したことが報告されている⁸⁾。対して、国内において小児の HSV 感染症における同様の報告はない。

当施設では、2009 年に HSV に対する院内研究室での real-time PCR 測定を行う体制を確立した。以上を踏まえ、HSV 脳炎が疑われる日齢 90 未満の症例に対して、当施設において院内 real-time PCR 測定が、PCR 結果判明までの期間、ACV の投与期間、入院期間に与えた影響を明らかにすることを目的に、後方視的検討を行った。

I. 対象と方法

1. 対象

2002 年 3 月から 2016 年 8 月までの間に国立成育医療研究センターで髄液検体の HSV-PCR 検査が提出された日齢 90 未満の患者を対象とした。この内、後述の臨床情報に関する電子診療録の記載が不十分な症例は除外した。また、HSV-PCR 陽性例、臨床所見から新生児 HSV 感染症と診断され ACV による治療が行われた症例、最終的に水痘帯状疱疹ウイルス感染症と診断され ACV による治療が行われた症例については、入院期間、ACV 投与期間の解析からは除外した。

電子診療録を用いて、検査提出時の日齢、性別、HSV-PCR 提出件数と提出先（院外検査機関または院内研究室）、PCR 結果が判明するまでの期間、ACV 投与期間、入院期間、腎障害（血清クレアチニン値上昇）の有無、ACV 投与終了後の再投与の有無についての情報を抽出した。抽出された情報に基づいて、HSV-PCR を院外検査機関で行った群を院外測定群、院内研究室で行った群を院内測定群として検査提出数、検査結果判明までの期間、ACV 投与期間、入院期間についての比較検討を行った。

2. HSV-PCR 検査

当施設では 2009 年に院内での real-time PCR 測定を行う体制を整え、髄液・血清・水疱ぬぐいを用いた HSV real-time PCR を実施している。髄液および血清中の核酸は QIAamp MinElute Virus Spin キットを用いて QIAcube による自動抽出を行い、水疱ぬぐいの核酸は QIAamp DNA mini キットを用いてスワブ試料からマニュアル抽出を行った (QIAGEN GmbH, Hilden Germany)。HSV の検出には既報のプライマー・プローブ配列を用いて⁹⁾、専従のスタッフが real-time PCR 測定を実施する体制となっている。PCR は原則として平日中に行われ、検査実施後、即日以内に結果を報告している。院内 HSV-PCR 測定の導入以前は、HSV-PCR は院外検査として株式会社エスアールエルで既報の系^{10, 11)}を用いて実施されていた。

3. 統計

すべての統計学的検討は IBM SPSS Statistics Version 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) を用いて行った。カテゴリー変数の比較はフィッシャーの正確確率検定を、連続変数の比較はマン・ホイットニーの U 検定を行い、両側検定で $p < 0.05$ を有意とした。

なお、本研究は当施設の倫理審査委員会の承認のもと実施された (NCCHD-367, 908, 1268 「感染症迅速診断システムの臨床応用」)。

II. 結果

1. 患者背景

対象期間内に髄液検体に対して HSV-PCR が実施されたのは 141 症例 (153 検体) であった。この内、診療録記載不備 23 例を除いた 118 症例を解析の対象とした。対象の内訳は、男児 75 名 (64%)、HSV-PCR 提出時の日齢の中央値は 27 日 (四分位範囲: 15 ~ 49 日) であった (表)。対象症例中、2 症例 (1.7%) で HSV-PCR が陽性であった。この 2 症例は、最終的に播種型 HSV 感染症と診断された。髄液 HSV-PCR は陰性であったが、皮膚粘膜型 HSV 感染と診断された症例は 3 例あった。1 例は水疱ぬぐいの HSV-PCR の陽性を根拠に確定診断された。残りの 2 例は水疱ぬぐいの HSV-PCR は

表 患者背景と各測定群の比較*

項目	全検討対象 n=118	院外測定群 n=19	院内測定群 n=99	p 値
日齢 (日); 中央値 (四分位範囲)	27 (15~49)	15 (10~79)	27 (16~45)	0.69
性別; 男児 (例) (%)	75 (64)	12 (63)	63 (64)	1.0
出生体重 (g); 中央値 (四分位範囲)	2,996 (2,663~3,212)	3,078 (2,760~3,180)	2,995 (2,628~3,230)	0.66
基礎疾患あり (例) (%)	16 (14)	11 (58)	5 (5)	0.067
PCR 陽性 (例) (%)	2 (1.7)	1 (5.3)	1 (1.0)	0.30
結果報告までの日数 (日); 中央値 (四分位範囲)		5.5 (3.3~6.8)	1.0 (0~2.0)	<0.001
ACV 投与期間 (日) **; 中央値 (四分位範囲)		6.0 (4.0~7.3)	2.0 (2.0~3.0)	<0.001
入院期間 (日) **; 中央値 (四分位範囲)		17.0 (7.5~37.5)	8.0 (5.0~14.0)	0.005

PCR: polymerase chain reaction, ACV: acyclovir

*カテゴリー変数はフィッシャーの正確確率検定, 連続変数はマン・ホイットニーの U 検定を用いて比較し, 有意水準 0.05 の両側検定を行った.

**HSV-PCR 陽性例 (2 例), 臨床所見から新生児 HSV 感染症と診断され ACV 投与が行われた症例 (3 例), 水痘帯状疱疹ウイルス感染症と診断され ACV 投与が行われた症例 (1 例) は解析から除外した.

陰性であったが, 症状と家族にヘルペス感染を示唆する水疱を認めたことから, 臨床的に皮膚粘膜炎と診断され, ACV により治療された.

2. 院外測定群と院内測定群の比較 (表)

全検討対象の内, 院外測定群は 19 例, 院内測定群は 99 例であった. 表に 2 群間の比較を示す. 両群間で患者背景に統計学的有意差は認めなかった. PCR 測定結果判明までの期間, ACV 投与期間, 入院期間の比較 (院外測定群 vs 院内測定群) では, PCR 測定結果判明までの期間の中央値は 5.5 日 vs 1.0 日 ($p < 0.001$), ACV 投与期間の中央値は 6.0 日 vs 2.0 日 ($p < 0.001$), 入院期間の中央値は 17.0 日 vs 8.0 日 ($p = 0.005$) であり, いずれも院内測定群で有意に短かった (表). なお, 上記入院期間には HSV 脳炎と関連のない基礎疾患や他のウイルス・細菌による脳炎または髄膜炎の診断, 治療のための期間が含まれていた. その期間が入院期間に与えた影響を減少させるため, 入院期間が 11 日未満の症例に限定して入院期間を比較したところ, 入院期間の中央値は 6.0 日 vs 5.0 日 ($p = 0.044$) であった. ACV 投与を終了した後に, その再開が必要になった症例はなかった.

3. 対象症例で認めた有害事象

院内測定群の 1 症例で ACV 投与期間に血清クレアチニンの上昇を認めた. この症例は日齢 31 に発熱, 肝障害, 播種性血管内凝固症 (DIC) をきたし, 後に家族性血球貪食リンパ組織球増多症候群と診断された. ACV は日齢 32 から日齢 37 まで投与され, 血清クレアチニンは日齢 38 に 0.86 mg/dL まで上昇し, その後改善傾向を示した. ACV 投与量は 60 mg/kg/day であり他の症例と同等であった. 腎障害が ACV による副作用であったか, DIC による臓器障害であったかは不明であった.

4. 髄液 PCR 検査の提出数の年次推移

当施設の髄液 HSV-PCR 提出件数の年次推移を図に示した. 院内 PCR 検査開始後に, 検査提出件数の明らかな増加を認めた.

5. ACV の延べ投与日数について

各群の ACV の延べ投与日数は, 院外測定群は 6 年間, 14 症例で計 79 日, 院内測定群では 8 年間, 104 症例で計 282 日であり, 院内測定群において ACV の延べ投与日数は長かった.

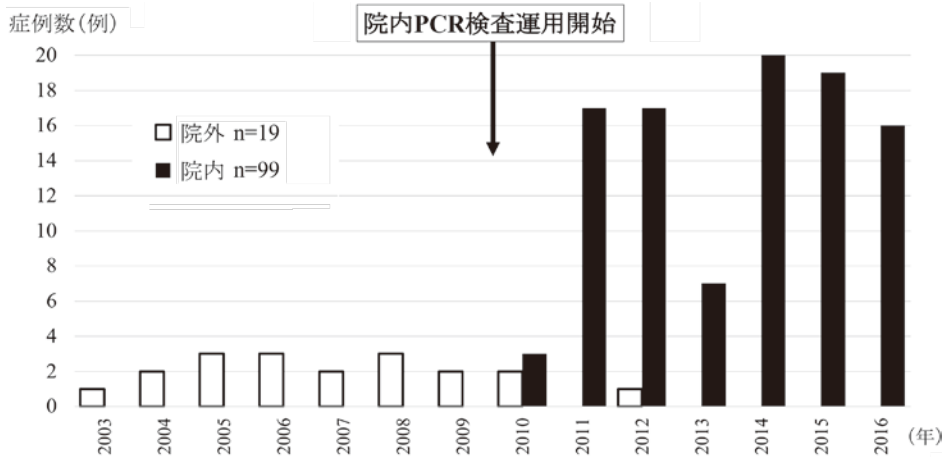


図 PCR検査提出数の年次推移

PCR: polymerase chain reaction

*2003年は3～12月, 2016年は1～8月のみ

6. 月別の髄液PCR検査提出数の変化

院外測定群と院内測定群で月別の検査提出数を比較した。院外測定群では7月から11月に検査が提出される傾向があり、3月から6月の間は検査が提出されていない。院内測定群は6月から8月に多い傾向はあるものの、通年性に検査が提出されていた。

III. 考 察

今回の検討では、院内測定群のPCR結果判明までの期間、ACV投与日数、入院期間は院外測定群に比較していずれも短かった。Randらは、全年齢層を対象とした、髄液HSV-PCRの院内測定群と院外測定群の比較検討を行っている⁸⁾。この検討では、結果判明までの期間は院外測定群の中央値が4.1日に対し、院内測定群では1.5日と短縮しており、また新生児においては、入院期間が中央値6.0日から3.0日に短縮したという結果であった。われわれの検討でも類似した結果が得られており、本邦でも院内検査室でのHSV real-time PCR測定は、日齢90日未満のヘルペス脳炎疑い症例において不必要なACV投与を減少させる点、入院期間を短縮させる点で有用であると考えられる。しかし、上記の入院期間には、最終的にHSV脳炎とは関連のない代謝性疾患などの基礎疾患や、HSV以外のウイルス (parechovirus, enterovirus) や細菌による

髄膜炎等の感染症と診断され、その検索、診断、治療のための入院期間も含まれている。Randらによる報告では入院期間が11日以上を除外することで上記の入院期間による影響を減少させている⁸⁾。本検討でも同様に入院期間が11日以上を除外して入院期間を比較し、院内測定群と院外測定群の入院期間に有意差を認めた。しかしながら、入院期間の短縮は1日に留まり、また院内検査室でのHSV real-time PCR測定導入のみによる結果であるとは断定できず、何らかのバイアスがある可能性は否定できない。

今回の検討では、髄液HSV-PCR陰性確認後にACVの投与を終了した症例で、その後にACV投与が再開された症例は認めなかった。しかしながら新生児HSV感染症は非常にまれな疾患であるため、今後さらに症例数を増やして検討する必要があると考えられる。PCR検査では検体の取り扱い方法や検査方法によって検査感度に変動すること、特に髄液検体では赤血球の混入やその他の阻害物質により偽陰性率が上昇する可能性もあることに注意が必要である¹²⁾。また、HSV感染の初期に検査が行われた場合、髄液HSV-PCRが偽陰性となる可能性がある。そのため臨床的にHSV脳炎を強く疑う場合は、初回のHSV-PCRが陰性でも、1週間以内に再検査することが推奨されている¹²⁾。これらを考慮すると、症状や臨床経過か

ら、HSV 感染症の事前確率が高い状態では、ACV 投与の終了については、髄液 HSV-PCR の結果だけでなく、MRI などの画像所見、脳波所見なども合わせて総合的に判断する必要がある。当施設では、臨床的に HSV 脳炎の検査前確率が低いと判断される症例は1回の PCR 検査で治療終了の判断を行うことが多いが、臨床的に HSV 感染症を強く疑う場合には、脳波や MRI での画像検査に加え、複数回の PCR 検査を行うこともある。複数回の PCR 検査結果を行った症例は、院外測定群で 2 症例、院内測定群で 3 症例であった。

今回の検討期間中、院内測定導入の後に髄液 HSV-PCR 検査件数は明らかに増加した。両群の患者背景の比較では、日齢、出生体重、基礎疾患の有無の項目に差は認めなかった。しかし、統計学的有意差はないものの、院外測定群のほうが患者の日齢や出生体重が低く、また基礎疾患をもつ症例が多い傾向が認められた。これは、院外測定群では HSV 感染症の事前確率がより高い患者群に限って検査が提出される傾向にあったものが、院内測定導入で医師の心理的な検査提出の閾値を下げたことで髄液 HSV-PCR 検査提出件数が増加した可能性が示唆される。また、院外測定群と院内測定群の月別検査件数を比較すると、院外測定群は 7～11 月の提出が多く、3～6 月には検査が提出されていなかった。一方で院内測定群は 6～8 月にピークがある点は院外測定群と同様であるが、通年検査が提出されていた。これらは院内測定群では enterovirus をはじめとする周囲の流行状況に関係なく PCR 検査が提出される傾向になっていることを示唆している。実際に髄液 HSV-PCR 検査が陽性であった症例は両群ともに 1 症例であり、その陽性率は院外測定群 5% に対して院内測定群は 1% であった。しかし、観察期間中の当施設の全入院数に占める新生児入院数や両群間の臨床症状、検査データの比較は行っておらず、院内測定導入以外の要因が検査数を上昇させた可能性は否定できない。

また、今回の検討では院内測定群における ACV 投与期間の短縮を認めたが、一方で ACV が投与された症例数自体は増加しており、全体としての ACV の延べ投与日数は増加していた。Gaens-

bauer らは 1999 年から 2012 年までの 18 歳以下の小児を対象とした ACV 使用率の継時的変化を報告している¹³⁾。その中で、HSV 感染症の罹患率は不変であるにも関わらず、HSV 感染疑い症例に対する経験的 ACV 投与が広まった結果、非 HSV 感染症に対する ACV 使用率が上昇していると指摘している。今回のわれわれの結果もこの結果と一致しており、不必要な症例に対する検査提出や ACV 投与をいかに安全に減らしていくかが今後の課題となっている。当施設では髄液 HSV-PCR 検査の明確な提出基準はなく、症例ごとにその必要性が決められている。しかしながら、今回の検討では、院内 PCR 測定の導入が、検査提出閾値の低下を招いた可能性が示唆されており、院内 PCR 測定の導入時には併せて検査提出基準を策定することも重要であると考えられる。過去の報告では、新生児 HSV 感染症と診断された症例のうち、84% は痙攣、もしくは皮膚粘膜病変、または明らかな全身状態不良を認めたこととされている¹⁴⁾。その検査所見としては単核球優位の髄液細胞数上昇、血小板減少、AST や ALT の上昇、プロトロンビン時間や活性化部分トロンボプラスチン時間の延長を認めている。また新生児 HSV 感染症は、典型的には生後 1 か月以内に発症すると言われている。Curfman らは、非典型的な症状のみを呈し、最終的に新生児 HSV 感染症と診断された症例は、全例が日齢 14 未満または髄液細胞数上昇のどちらか、もしくは両方の条件を満たしていたと報告しており、これらの条件を考慮することで不必要な ACV 投与を減少できると指摘している¹⁴⁾。これらの報告は、髄液 HSV-PCR 検査提出基準を策定する際に参考になると思われる。

本研究は単施設の後方視的研究であり、結果の一般化には限界がある。また、研究対象期間の初期に院外測定が、後期に院内測定が用いられており、HSV 脳炎に対する早期経験的治療の必要性が広く認知されるようになってきたことなどの医療環境の変化が ACV の投与期間や入院期間に与えた影響も否定できない。今後、本邦において院内での HSV real-time PCR 測定がより一般的となれば、多くの医療機関を対象とした総合的な解析が可能になると考えられ、今後のさらなる検討が臨

まれる。本研究は成育医療研究開発費 27-6（重症小児感染症の診断・治療の開発と最適化）を用いて行われた。

謝辞：患者情報の抽出にご尽力いただいた，国立成育医療研究センター情報管理部 菊谷昌央様に感謝いたします。

日本小児感染症学会の定める利益相反に関する開示事項はありません。

文 献

- 1) Long SS, et al : Principles and practice of pediatric infectious diseases, 4th ed edn. : Saunders/Elsevier, Philadelphia, 2012
- 2) Kimberlin DW : When should you initiate acyclovir therapy in a neonate? J Pediatr 153 : 155-156, 2008
- 3) Caviness AC, et al : The prevalence of neonatal herpes simplex virus infection compared with serious bacterial illness in hospitalized neonates. J Pediatr 153 : 164-169, 2008
- 4) Binnicker MJ, et al : Rapid and direct detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid by use of a commercial real-time PCR assay. J Clin Microbiol 52 : 4361-4362, 2014
- 5) Melvin AJ, et al : Plasma and cerebrospinal fluid herpes simplex virus levels at diagnosis and outcome of neonatal infection. J Pediatr 166 : 827-833, 2015
- 6) Bhullar SS, et al : Determination of viral load by quantitative real-time PCR in herpes simplex encephalitis patients. Intervirology 57 : 1-7, 2014
- 7) Munoz-Almagro C, et al : Quantitative real-time PCR in paediatric patients with herpes simplex infections of the central nervous system. J Virol Methods 147 : 297-300, 2008
- 8) Rand K, et al : Real-time polymerase chain reaction detection of herpes simplex virus in cerebrospinal fluid and cost savings from earlier hospital discharge. J Mol Diagn 7 : 511-516, 2005
- 9) Corey L, et al : Differentiation of herpes simplex virus types 1 and 2 in clinical samples by a real-time taqman PCR assay. J Med Virol 76 : 350-355, 2005
- 10) Cao M, et al : Rapid detection of cutaneous herpes simplex virus infection with the polymerase chain reaction. J Invest Dermatol 92 : 391-392, 1989
- 11) 坂岡 博, 他 : PCR 法による単純ヘルペスウイルスゲノムの検出と解析. 蛋白質核酸酵素 35 : 3025-3033, 1990
- 12) Frenkel LM : Challenges in the diagnosis and management of neonatal herpes simplex virus encephalitis. Pediatrics 115 : 795-797, 2005
- 13) Gaensbauer JT, et al : Herpes PCR testing and empiric acyclovir use beyond the neonatal period. Pediatrics 134 : e651-656, 2014
- 14) Curfman AL, et al : Initial Presentation of Neonatal Herpes Simplex Virus Infection. J Pediatr 172 : 121-126, e1, 2016

Usefulness of the in-house real-time PCR of cerebrospinal fluid from infants less than 90 days of age with suspicion of herpes simplex virus encephalitis

Daichi SUZUKI¹⁾, Kensuke SHOJI²⁾, Chitose KOYAMA (WAKAI)²⁾, Ippei MIYATA³⁾,
Noriyasu IWASE⁴⁾, Isao MIYAIRI²⁾

- 1) *Department of Postgraduate Education and Training, National Center for Child Health and Development*
- 2) *Division of Infectious Diseases, Department of Medical Subspecialties, National Center for Child Health and Development*
- 3) *Department of Pediatrics, Kawasaki Medical School*
- 4) *Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University*

Acyclovir (ACV), which is administered in cases of suspected neonatal herpes simplex virus (HSV) encephalitis, is usually terminated based on a negative cerebrospinal fluid (CSF) HSV polymerase chain reaction (PCR). PCR testing for HSV is generally performed at an outside hospital laboratory, requiring several days from test order until result reporting. At this facility, in-house real-time PCR testing for HSV was introduced in 2009. It examined usefulness of the in-house HSV-PCR of CSF obtained from infants less than 90 days old between March 2002 and August 2016. The subjects were classified into an out-of-hospital measurement group and an in-house measurement group, and the number of examinations performed, time required for results reporting, duration of treatment, and length of hospital stay (LOS) were compared between these groups. CSF HSV-PCR tests were performed in 118 cases, of which 19 (16%) and 99 (84%) were out-of-hospital and in-house assessments, respectively. The time required for results reporting, ACV administration period, and LOS were significantly shorter ($p < 0.05$) (median 5.5 days vs 1.0 days, 6.0 days vs 2.0 days, 17.0 days vs 8.0 days). However, the number of examinations increased from 2.3 per year to 14.6 per year after in-house testing was initiated, suggesting that the threshold for conducting the examination might have decreased. While the introduction of in-house PCR testing proved to be useful, the appropriate criteria for performing the tests appears to be necessary.

Key words: neonatal herpes simplex virus infection, real-time PCR, acyclovir

(受付 : 2017 年 9 月 21 日, 受理 : 2017 年 12 月 22 日)

* * *