

表2 ウイルス検査を必要とするとき

- ①疫学的視点から検査を必要とするとき
  - ワクチンなどにより流行規模が小さくなった感染症を確定診断するとき
  - 地域流行しているウイルス感染症を診断するとき
  - 患者を早期に発見し、防疫上の措置を行う必要があるとき
  - 特定のウイルスに対する変異や薬剤感受性を調べるとき
  - 院内感染防止のためのワクチン予防可能疾患に対する免疫状態を調べるとき
- ②患者の予後を推定し、治療方針を決定する必要があるとき
  - 類似した病像を呈する感染症の鑑別診断を行うとき
  - 治療が可能なウイルス感染症を診断するとき（とくに診断が困難なとき）
  - 免疫不全者（児）におけるウイルス感染症を診断するとき
  - ワクチン後のウイルス再感染を診断するとき
- ③献血や手術時などにおいて他者への感染防止を図るとき
- ④予防接種後に生じた臨床反応の原因を明らかにするとき

## ウイルス学的診断方法

ウイルス感染症のウイルス学的診断方法と診断基準を表3に示した。現在広く用いられている方法を紹介する。

### 1. ウイルス分離

ウイルス学的診断方法のゴールドスタンダードはウイルス分離である。分離されたウイルスを用いて、ウイルスの遺伝子型の検索や変異の検討、抗ウイルス薬に対する感受性検査、ワクチンの開発などが可能となる。効果的にウイルス分離を行うためには適切な検査材料採取が大切である<sup>5) 7)</sup>。ウイルス分離用の検査材料は、原則として病変部位から採取する。臨床症状に基づく原因ウイルスと検査材料を表4に示した。分離率を高めるためにできるだけ病初期に検査材料を採取する。

後鼻腔や咽頭などの病変部位を拭った綿棒は、

表3 ウイルス感染症の診断と判定基準

- 臨床診断：臨床症状・臨床経過（地域の流行を参考）
- 確定診断
  1. ウイルス分離：病巣からの分離が好ましい
  2. ウイルス抗原検出：迅速診断法，組織・血球の免疫染色
  3. ウイルス核酸検出：PCR法，LAMP法，*in situ* PCR法
  4. ウイルス粒子検出：電子顕微鏡
  5. 血清検査：IgM抗体の検出，IgG抗体の有意上昇

PCR: polymerase chain reaction

LAMP: loop-mediated isothermal amplification

2 mlのウイルス保存液（ゼラチンやウシ血清アルブミンなどの安定剤が入った細胞培養液または生理食塩水）が入った試験管の中でよく攪拌し、綿棒を試験管内壁で絞った後取り除いておく。木製の綿棒はウイルスを不活化する作用があるため、長時間ウイルス保存液に浸さないほうがよい。尿、髄液はそのまま滅菌試験管に採取する。水疱内容液は、皮膚をアルコールで消毒した後、ツベルクリン注射器などの細い注射器で採取し、2 mlの保存液中に移し替える。血液はEDTAやクエン酸などの抗凝固薬が入った容器に無菌的に採取する。ヘパリンはPCRの妨げになることがあるので、原則用いない。便は採取後培養液に浸し乾燥しないようにする。

採取した検査材料はできる限り早急に細胞に接種する。ただちに細胞へ接種することが困難なときは－80℃で保存する。検査材料を輸送するときは、短時間ならば4℃で、長時間ならば－80℃で輸送する。エンベロープを有するウイルスでは、検査材料を－20℃で保存すると、融解時にエンベロープが壊れ分離率が低下するため、原則－20℃では保存しない。

分離しようとする目的ウイルスにより、ウイルス分離に用いる細胞は異なっているので<sup>1) 2) 7)</sup>、採取した検査材料の患者情報、目標とするウイルスを検査側に連絡することが大切である。インフルエンザウイルスの分離にはMDCK細胞が、麻疹ウイルスの分離にはB95a細胞が、ム

ンプスウイルスの分離には Vero 細胞が、VZV の分離にはヒト線維芽（HF）細胞が主として用いられる。エンテロウイルスや呼吸器系ウイルスの分離には、Vero 細胞、RD13 細胞、HF 細胞、Hep2 細胞など複数の細胞が用いられている。ウイルス増殖は細胞変性効果（cytopathic effects:CPE）の出現で判定する。CPE 出現までの期間は、早いと翌日、遅いと 3 週間以上必要

胞，Hep2 細胞など複数の細胞が用いられている。ウイルス増殖は細胞変性効果（cytopathic effects:CPE）の出現で判定する。CPE 出現までの期間は、早いと翌日、遅いと 3 週間以上必要

表4 ウイルス感染症をおこすおもな原因ウイルスとウイルス分離のための検査材料

診断名	おもな原因ウイルス	検査材料*	その他
無菌性髄膜炎	エンテロウイルス ムンプスウイルス 単純ヘルペスウイルス	髄液，糞便，咽頭ぬぐい液 髄液，唾液，咽頭ぬぐい液，尿 髄液，脳組織	RT-PCR（髄液）
脳炎	Arbovirus エンテロウイルス ムンプスウイルス 単純ヘルペスウイルス	髄液 髄液，糞便，咽頭ぬぐい液 髄液，唾液，咽頭ぬぐい液，尿 髄液，脳組織	PT-PCR（髄液）
急性弛緩性麻痺	日本脳炎ウイルス ポリオウイルス エンテロウイルス	髄液，脳組織 糞便，髄液，咽頭ぬぐい液，尿 糞便，髄液，咽頭ぬぐい液	
呼吸器感染症	インフルエンザウイルス パラインフルエンザウイルス RS ウイルス アデノウイルス ライノウイルス メタニューモウイルス コロナウイルス	鼻咽頭ぬぐい液，鼻汁，うがい液 鼻咽頭ぬぐい液，鼻汁 鼻咽頭ぬぐい液，鼻汁 鼻咽頭ぬぐい液，鼻汁 鼻汁 鼻咽頭ぬぐい液，鼻汁 鼻咽頭ぬぐい液，鼻汁	迅速診断キット 迅速診断キット 迅速診断キット
発疹性疾患	単純ヘルペスウイルス VZV エンテロウイルス 麻疹ウイルス 風疹ウイルス HHV6，HHV7 EB ウイルス パルボウイルス B19	水疱 水疱，PBMC 水疱，糞便，咽頭ぬぐい液 PBMC，咽頭ぬぐい液，尿 咽頭ぬぐい液，尿，PBMC PBMC PBMC 培養困難	塗抹標本の免疫染色 塗抹標本の免疫染色
胃腸炎	ノロウイルス サポウイルス ロタウイルス 腸管アデノウイルス アストロウイルス	培養不可 培養不可 糞便（培養困難） 糞便（培養困難） 培養不可	電子顕微鏡，RT-PCR 電子顕微鏡，RT-PCR 迅速診断キット 迅速診断キット 電子顕微鏡
伝染性単核球性症	EB ウイルス サイトメガロウイルス	PBMC 咽頭ぬぐい液，尿，PBMC	pp65 抗原
先天性感染	風疹ウイルス サイトメガロウイルス 単純ヘルペスウイルス	咽頭ぬぐい液，尿，髄液，組織 咽頭ぬぐい液，尿，髄液，組織 水疱，髄液，咽頭ぬぐい液	pp65 抗原
新生児感染	単純ヘルペスウイルス サイトメガロウイルス エンテロウイルス	水疱，髄液，咽頭ぬぐい液 咽頭ぬぐい液，尿，髄液，組織 咽頭ぬぐい液，糞便，髄液	pp65 抗原

\*：原則として病変部位からウイルス分離を行う，VZV：水痘帯状疱疹ウイルス，PBMC：末梢血単核球，HHV6：ヒトヘルペスウイルス 6 型，HHV7：ヒトヘルペスウイルス 7 型

とする。分離されたウイルスは中和試験や蛍光抗体法で同定される。日常診療の現場では、多くはコマーシャルラボにウイルス分離を依頼している（保険適用外）。

## 2. ウイルス抗原検査

最近、病巣部からウイルス抗原を迅速に検出する診断キットがいくつか開発され、臨床現場では、ウイルス分離よりも頻用されるようになっていく。わが国で日常診療で使用されている抗原迅速診断法は、検体中のウイルス抗原を特異抗体で検出する方法であり、検出する方法としてラテックス凝集法（LA）やイムノクロマト法などが用いられている。

診断キットが陽性になるためにはある程度のウイルス量が必要である。インフルエンザウイルスやRSウイルスの迅速診断では、 $10^3 \sim 10^4$ 以上のウイルス量が必要である<sup>8) 9)</sup>。ウイルス分離よりも感度は劣るが、迅速性に優れている。呼吸器系ではインフルエンザウイルス、アデノウイルス、RSウイルスが、消化器系ではロタウイルス、腸管アデノウイルスが保険適用になっている（RSウイルスは3歳未満の入院例のみ保険適用）。

CMV感染における好中球中のPP65抗原陽性細胞の検出は、免疫不全宿主におけるCMV感染症の早期診断に有用である。最近では、先天性CMV感染症においても診断的価値が示されている。

## 3. ウイルス核酸検出

Polymerase chain reaction（PCR）法やLoop-mediated isothermal amplification（LAMP）法を用いたウイルス核酸の検出や、real time PCR法やreal time LAMP法を用いたウイルス核酸の定量的検討が行われている<sup>10) 11)</sup>。一部の肝炎ウイルスや一部のヘルペス科ウイルスの核酸検査は、コマーシャルラボで検査可能であるが、その他のウイルスは専門の研究機関が研究レベルで検査を行っている。

PCR法（DNAウイルス）、RT（reverse transcriptase）-PCR法（RNAウイルス）、LAMP法などの核酸検出法はいずれも感度の高い方法である。しかし、これらの方法は必ずしも感染性のあるウイルス粒子を検出していないこと、時に潜伏感染しているウイルスを検出する危険性があることなど、検査の限界を理解しておく必要がある。

多くのウイルス感染症では、病巣や末梢血から検出されるウイルス量と病勢とはよく一致している。ウイルスDNA量やRNA量が定量的に解析できるリアルタイムPCR法、リアルタイムLAMP法は、臨床経過の判定や病態の解明に用いられている。

## 4. ウイルス抗体検査

ウイルス抗体の検査法には、種々の方法がある。それぞれ測定方法の特徴を理解して、目的に応じて適切な測定方法を用いる必要がある（表5）。中和（NT）法は型特異性が高く、感染防御抗体を検出しているが、手技が煩雑で判定までに時間のかかる欠点がある。酵素抗体（EIA）法は感度・特異度ともに高く、操作が比較的簡便で多数の検体を処理するのに優れており、IgM抗体、IgG抗体の検出が可能であるが、定量性に欠点がある（とくに抗体価が高値のとき）。またコマーシャルラボに抗体検査を依頼する場合、EIA法は他の方法に比べ割高である。赤血球凝集抑制（HI）法は型特異性が高く、感染防御にかかわる抗体を検出しているが、測定するウイルス抗体によっては、NT法やEIA法よりも感度が劣る欠点がある。補体結合（CF）法は比較的早期に抗体が陰性化するため、ワクチン後の免疫の有無や感染既往の確認に用いることは不適切である。

### 1) 急性ウイルス感染症の診断

急性ウイルス感染症の診断は、急性期血清IgM抗体の検出、または急性期と回復期（発症2週間後以降）の血清抗体価を比較し、抗体の

表5 ウイルス抗体測定方法の特徴（文献5）より引用、一部改変）

測定方法	長 所	短 所
中和（NT）法	<ul style="list-style-type: none"> <li>●抗体測定法のゴールドスタンダード</li> <li>●型特異性が高い</li> <li>●感染防御抗体を検出</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●培養した細胞とウイルスが必要</li> <li>●判定までに時間がかかる</li> <li>●手技が煩雑</li> <li>●スクリーニングに向かない</li> </ul>
酵素抗体（EIA）法	<ul style="list-style-type: none"> <li>●IgM抗体、IgG抗体が測定可能</li> <li>●感度と特異度が高い</li> <li>●比較的操作简单</li> <li>●多数の献体処理が可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●保険点数が高価</li> <li>●定性的である</li> <li>●有意上昇が定義されていない</li> </ul>
赤血球凝集抑制（HI）法	<ul style="list-style-type: none"> <li>●型特異性がある</li> <li>●手技が比較的簡単</li> <li>●感染防御抗体を検出</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●適切な血球の準備が必要</li> <li>●感度はNTよりも劣る</li> <li>●赤血球凝集能をもつウイルスのみ測定可能</li> </ul>
補体結合（CF）法	<ul style="list-style-type: none"> <li>●すべてのウイルスで測定可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>●比較的早期に抗体が消失</li> <li>●感度、特異度が比較的低い</li> </ul>

有意上昇で診断する。血清抗体の有意上昇とは、同一の測定方法で測定した回復期の血清抗体価が、陽転化または急性期よりも測定誤差以上の上昇、すなわち2管（4倍）以上の上昇を示すことである。EIA法で測定した抗体価は定性的な要素が強く、抗体価の有意上昇については統一した基準が設定されていない。しかし、測定誤差以上の上昇で定義すると、EIA抗体の2倍以上の上昇が有意上昇であり、NT法やHI法などに準ずると回復期の抗体価が陽転化、または急性期の抗体価よりも4倍以上上昇したときが有意上昇である。

## 2) ウイルス再感染時の診断

ウイルス初感染時の抗体反応は、まずIgM抗体が出現し、その後抗原との結合力が弱く中和活性が低い（avidityが弱い）IgG3に属するIgG抗体が出現し、最後に抗原との結合力が強く中和活性の強いIgG1に属するIgG抗体が出現する。一方、再感染時には、感度の高い方法を用いるとIgM抗体は検出されることはあるが、IgG抗体は二次応答によるavidityの強いIgG1に属する抗体が感染早期から上昇する（表6）。このavidityの違いを用いて、ワクチン接種後の罹患が一次性ワクチン不全（primary vaccine

表6 初感染・再感染・再活性化と抗体パターン

感染様式	IgM抗体	IgG抗体*	
		抗体価	avidity
初感染	++	±	弱い
再感染	+/-	+++	強い
再活性化	+/-	+++	強い

\*：ウイルス感染とIgG抗体

初感染時：まずIgG3に属する抗体が上昇し、その後IgG1に属する抗体が上昇

再感染時：早期からIgG1に属する抗体が上昇

抗原への結合力：IgG1抗体>IgG3抗体

中和活性：IgG1抗体>IgG3抗体

failure, PVF) か二次性ワクチン不全 (secondary vaccine failure: SVF) かが調べられている<sup>12)</sup>。

## 3) 免疫状態の診断

個人の免疫状態を調べるための代表的な検査方法を表7に示した。以前は麻疹の免疫状態を調べるためにHI法を用いていたが、最近、麻疹HI法の感度が低下している。マイクロNT法陽性者の77%しかHI法では陽性を示さず、HI法で測定した陰性例の多くはマイクロNT法で測定すると陽性である（表8）。なお、麻疹抗体陽性率を指標としたときのマイクロNT法とEIA法の感度は同程度である。一方、風疹HI抗体ではこのような現象は認められておらず、陽性閾値の感度はHI法もEIA法も同程度であ

表7 目的に応じたウイルス抗体の測定方法

感染症	免疫の有無	急性期感染の診断	
		IgM 抗体	IgG 抗体
麻疹	NT, EIA-IgG	EIA-IgM	NT, HI
水痘	IAHA, EIA-IgG	EIA-IgM	IAHA
ムンプス	EIA-IgG	EIA-IgM	NT, HI
風疹	HI, EIA-IgG	EIA-IgM	HI
インフルエンザ	HI	—	HI
EB ウイルス	FA, EIA-IgG	EADR EIA-IgM, FA	VCA-IgG FA

(注)：CF 抗体の持続期間は他の抗体に比較し短い

表8 麻疹抗体マクロ中和 (mNT) 法と HI 法の比較

		mNT 法		HI 陽性との 一致率	P value
		陽性	陰性		
研究 1	HI 陽性	20	0	76.9 %	0.0113
	陰性	6	0		
研究 2	HI 陽性	44	0	77.3 %	0.0006
	陰性	10	1		
合計	HI 陽性	64	0	77.1 %	< 0.0001
	陰性	16	0		

る<sup>13)</sup>。水痘でも、免疫付着赤血球凝集 (IAHA) 法も EIA 法も陽性閾値の感度は同程度である。ムンプス抗体の測定方法では、EIA 法が感度、特異度とも他の抗体測定方法に比べ優れている。

ワクチン後の免疫状態を感度の低い方法で測定すると、陰性者の割合が増加し、ワクチンに対する不信や誤解を招く危険性がある。個人の免疫状態を知るためのウイルス抗体検査は、感度も特異度とともに高い適切な方法で測定すべきである。

#### 4) 抗体価表示の国際化

現在、世界保健機関 (WHO) は抗体測定方法、および抗体表示方法の標準化をめざしており、抗体価を標準血清に照らして国際単位 (IU) で表示することを指導している。WHO 標準法で測定した風疹 HI 抗体 8 倍は 15 IU に相当する<sup>14)</sup>。なお、風疹感染防御レベルは 10 IU である。麻疹抗体も国際単位で表示されており、感染防御レベルは 80 ~ 120 mIU である。マイクロ NT 法で 4 倍に相当する。

## おわりに

ウイルス感染症の疫学の変化、迅速診断キットの開発、抗ウイルス薬の開発などにより、ウイルス感染症も病原体診断の重要性が増してきた。ウイルス感染症病原体診断のためのウイルス検査法の特徴、有用性、限界について概説した。感染症対策や適切な抗ウイルス薬を使用するために、迅速診断検査を含めた特異的診断方法が、今後ますます重要性をおびてくることを期待している。

## ●文 献

- 1) Murray PR: ASM Pocket Guide to Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC, 45-51, 1996
- 2) Miller JM: A Guide to Specimen Management in Clinical Microbiology. ASM press, Washington DC, 130-136, 1996
- 3) AAP: Measles. Red Book 26th eds., AAP, Elk Grove, 419-429, 2003
- 4) 庵原俊昭：ムンプスワクチン接種後のムンプス罹患時における病態と臨床像の特徴。小児科 42: 1144-1149, 2001
- 5) 齋藤義弘：ウイルス分離，PCR，ウイルス抗体価の利用法。小児内科 37: 42-47, 2005
- 6) 田島 剛：感染症のウイルス検査。小児科 46: 749-754, 2005
- 7) 庵原俊昭，豊田美香，中野貴司・他：アメリカ微生物学会 (ASM) のウイルス分離用採取ガイドラインからみたわが国コマーシャルラボの採取方法の検討。小児感染免疫 11: 103-107, 1999
- 8) 市川正孝，三田村敬子，川上千春：現在可能な病原体の迅速診断—インフルエンザ。小児科 45: 643-647, 2004
- 9) 堤 裕幸：現在可能な病原体の迅速診断—RS ウイルス。小児科 45: 648-651, 2004
- 10) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H et al.: Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 28: E63, 2000
- 11) Okafuji T, Yoshida N, Fujino M et al.: Rapid diagnostic method for detection of mumps virus genome

- by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol 43:1625-1631, 2005
- 12) 庵原俊昭, 谷口清州, 神谷 齊・他: ワクチン後のムンプス罹患例におけるムンプス IgG 抗体とその Avidity の検討. 臨床とウイルス 24:389-393, 1996
- 13) 庵原俊昭, 中野貴司, 神谷 齊: 職員採用時の麻疹・風疹・ムンプス・水痘抗体価9年間の比較検討. 感染症学雑誌 79 (Suppl.): 154, 2005
- 14) Skendzel LP: Rubella immunity, Defining the level of protective antibody. Am J Clin Pathol 106:170-174, 1996

著者連絡先

〒514-0125 三重県津市大里窪田町 357  
国立病院機構三重病院小児科  
庵原俊昭

第30回日本小児皮膚科学会学術大会のお知らせ

会 期 2006年6月17日(土曜)～18日(日曜)  
会 場 名古屋国際会議場  
テ ー マ 「小児皮膚疾患のスキンケアと生活指導」  
招請講演 「Laser treatment for childhood hemangiomas and nevi」  
R Rox Anderson (Harvard Medical School, Wellman Center for Photomedicine)  
特別講演 「臨床医学研究について」 大島伸一 (国立長寿医療センター)  
シンポジウム 「小児皮膚疾患のスキンケアの実践」

問い合わせ先 〒461-0004 名古屋市東区葵 2-5-6  
株式会社オフィステイクワン 担当: 北村 護  
TEL 052-930-6145 FAX 052-930-4146  
e-mail: jsp30@cs-oto.com

感染制御 <別刷>

**ウイルス感染と感染制御**  
**Control of Viral Infections**

庵原 俊昭 (Toshiaki Ihara)  
国立病院機構 三重病院 小児科

感染制御 Vol. 1, No. 4(通巻No.4)(2005年10月20日発行)  
331 ~ 336 頁掲載論文



<日本ウイルス学会>

## ウイルス感染と感染制御

## Control of Viral Infections

庵原俊昭 (Toshiaki Ihara)

国立病院機構三重病院

【要約】 ヒトに感染するウイルスには多くの種類がある。ヒトへの感染経路やウイルス感染による発症病態を考慮し、それぞれのウイルスに応じた感染対策を計ることが大切である。施設内で多くのウイルス感染症集団発生の要因は一般社会からの持ち込みである。一般社会から施設に持ち込まない、施設内で広げないための感染制御の基本は、ワクチン予防可能疾患においては医療スタッフや入所者へのワクチン接種であり、一般のウイルス感染症においては手の消毒とマスクの着用である。

[Key words]: 麻疹, 風疹, インフルエンザ, ノロウイルス, ワクチン

### ◆はじめに

ヒトに感染するウイルスには多くの種類がある。ウイルスでも細菌でも感染経路による感染制御対策が感染制御の基本である。また、よいワクチンが開発されている感染症に対しては、ワクチン接種が感染制御対策として重要である。特にヒトからヒトに感染するウイルス感染症では、ワクチン接種率を高めることで、病院などの施設だけではなく地域社会の流行制御も可能である<sup>1,2)</sup>。

ウイルス感染症は感染後の発症病態により感染対策が異なっている。麻疹のような全身性ウイルス感染症では、ワクチン接種により免疫記憶細胞が誘導されておれば、感染後にブースター効果がおこるため比較的低い抗体レベルでも発症予防効果が期待できる。一方、インフルエンザウイルスのような粘膜ウイルス感染症では、免疫記憶細胞が誘導されていても、ブースター効果が出現するまでに症状が出現するため、発症予防のためには高い抗体価が必要である。本稿では、ウイルス感染症に対する感染制御対策の基本と、最近話題となっているウイルス感染症の感染対策を紹介する。

### ◆1. ウイルスのヒトへの感染経路 (表1)

ヒトに感染する代表的なウイルスの感染経路を表1に示した。麻疹ウイルスと水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)は、結核とならび空気感染する病原体である。インフルエンザウイルスも空気感染するという意見はあるが、未だ確立されていない。飛沫感染するウイルスは主として呼吸器から感染するウイルスである。接触感染するウイルスは主として消化器から感染するウイルス、皮膚や粘膜に感染して症状が出現するウイルスである。空気感染するウイルスは飛沫感染や接触感染でも感染し、飛沫感染するウイルスは接触感染でも感染する。米国小児科学会(AAP)はパラインフルエンザウイルス、RSウイルス、ウイルス性出血熱をおこすウイルスを接触感染群に含めている<sup>3)</sup>。

接触感染対策の基本は手の消毒および流水での十分な手洗いであり(hand hygiene)、体液を含む液に触れるときは手袋の着用である。飛沫感染対策の基本はマスクの着用である。SARSコロナウイルス流行時に外科用マスクはN95マスクと同等の効果を



表1 ウイルスのヒトへの感染経路

1. ヒトからヒトへの感染（ヒトヒト感染）	
・空気感染	：麻疹ウイルス, VZV
・飛沫感染	：ライノウイルス, コロナウイルス, インフルエンザウイルス, ヒトメタニューモウイルス, 呼吸器アデノウイルス, ムンプスウイルス, 風疹ウイルス, EBV, CMV,
・接触感染	：ロタウイルス, ノロウイルス, 腸管アデノウイルス, HAV, エンテロウイルス, RS ウイルス, パラインフルエンザウイルス, ウイルス性結膜炎ウイルス, HSV
・血液媒介感染	：HBV, HCV, HIV, HTLV1, CMV
・性行為感染	：HIV, HTLV1, HBV, HCV, CMV, HSV, HPV
・食物媒介感染	：ノロウイルス, HAV, HEV
2. ベクターからヒトへの感染	
・蚊	：日本脳炎ウイルス, 西ナイルウイルス, デングウイルス, 黄熱ウイルス, セントルイス脳炎ウイルス
・ダニ	：ダニ媒介性脳炎ウイルス
3. 動物からヒトへの感染	
・哺乳動物	：狂犬病ウイルス, リッサウイルス感染症ウイルス

HAV：A型肝炎ウイルス, HBV：B型肝炎ウイルス, HCV：C型肝炎ウイルス,  
HEV：E型肝炎ウイルス, HSV：単純ヘルペスウイルス, VZV：水痘帯状疱疹ウイルス,  
EBV：EBウイルス, CMV：サイトメガロウイルス, HIV：ヒト免疫不全ウイルス,  
HTLV1：ヒトT細胞性白血病ウイルス1型, HPV：ヒトパピローマウイルス

示した<sup>4)</sup>。性行為感染対策の基本は性行為時のコンドーム着用であり、食物媒介感染対策の基本は食の消毒 (food hygiene：火を通したものを食べる) である。蚊対策の基本は蚊に刺されないようにすることである。戸外での長袖・長ズボンの着用、1～2時間ごとの防虫剤スプレーの使用、睡眠時の蚊取り線香や蚊帳の使用は効果がある。殺虫剤による駆虫対策は、環境破壊の問題や殺虫剤に耐性を持った蚊の出現などがあり得策ではない。

## ◆2. ワクチン予防可能疾患への対策

よいワクチンが開発されている感染症に対しては、ワクチン接種が感染制御の基本である。本邦で使用が可能なウイルスワクチンと地域での流行抑制に必要な免疫率（集団免疫率）を表2に示した<sup>1,2)</sup>。

### 1) 麻疹・水痘・ムンプス・風疹対策

以前から、小児の入院患者数が多い病院では医療関係職員の採用時に麻疹、水痘、ムンプス、風疹の

抗体価を測定し、陰性者にワクチン接種する感染制御対策が行われていた。しかし、小児の入院患者数が相対的に少ない医療機関では、ワクチン接種による感染制御対策は広く行われていなかった。

2000年頃から日本各地で臨床実習を行った医学部学生を介して、病院内や学生間で麻疹が流行する事例が認められた。このような経験から各地の医系や看護系の大学や専門学校において、臨床実習に参加する前に学生の小児4大感染症（麻疹、水痘、ムンプス、風疹）に対する抗体価を測定し、陰性者にはワクチンを接種してから実習に参加するよう指導されるようになった。

抗体を測定する際の大切なことは、適切な方法で抗体測定を行なうことである。以前は麻疹抗体測定には赤血球凝集抑制 (HI) 法を用いていた。しかし、最近この方法で測定すると抗体陰性者の割合が比較的高く、しかも HI 法で陰性の血清を B95a 細胞を用いたマイクロ中和 (mNT) 法や酵素抗体 (EIA) 法で

表2 本邦で用いられているウイルスワクチンと集団免疫率

ウイルス	基本再生産数	集団免疫率 (%)
1) 生ワクチン		
・麻疹ウイルス	16～21	90～95
・水痘帯状疱疹ウイルス	8～10?	90?
・ムンプスウイルス	11～14	85～90
・風疹ウイルス	7～9	80～85
・ポリオウイルス	5～7	80～86
2) 不活化ワクチン		
・インフルエンザウイルス	3～4	75%?
・日本脳炎ウイルス*		
・A型肝炎ウイルス*		
・B型肝炎ウイルス†		

\*：ヒトヒト感染でないので基本再生産数と集団免疫率は求められない

†：基本再生産数と集団免疫率は不明 (文献<sup>2)</sup>，一部改変)

測定すると陽性であることが示されている<sup>5)</sup>。一方、水痘では免疫付着赤血球凝集 (IAHA) 法と EIA 法の抗体陽性率は同等であり、風疹でも HI 法と EIA 法の抗体陽性率は同等である (表3)。なお、ムンプスでは EIA 法以外の方法では感度が低く、免疫状態を調べるためには不適切である。以上をまとめると、免疫の有無を調べるための適切な抗体測定法は、麻疹では mNT 法か EIA 法、水痘では IAHA 法か EIA 法、ムンプスでは EIA 法、風疹では HI 法か EIA 法である。

麻疹や水痘は感染力が極めて強いウイルス感染症であり、麻疹では 20 分間、水痘で 60 分間室内で

接触すると感染する。麻疹や水痘罹患児が入院したときは、個室管理をするか、同じ病気の患者を一つの部屋に入室させて管理する。麻疹や水痘患児に対しては抗体陽性の医療スタッフがケアに当たるようにするが、免疫を有する人はマスクは不要である。

小児の 4 大感染症に対する免疫を持たない人や免疫の状態が不明な人が、麻疹や水痘患児と接触し発症予防を希望したときの対策は、免疫健全者に対しては生ワクチン接種であり、免疫不全者に対しては原則  $\gamma$  グロブリンの投与である。生ワクチンの緊急接種が有効であるメカニズムは、全身性ウイルス感

表3 麻疹・風疹・水痘の抗体測定方法による陽性率

		陰性	保留	陽性 (%)	P value*
麻疹	HI	20	0	69(77.5)	
	EIA	0	1	34(97.1)	0.0051
	mNT	1	0	69(98.6)	<0.0001
風疹	HI	1	1	33(94.3)	
	EIA	9	1	123(92.5)	0.6564
ムンプス	EIA	12	12	144(85.7)	
水痘	IAHA	2	0	88(97.8)	
	EIA	0	2	76(97.4)	0.9041

\*：マン・ホイットニ検定

(文献<sup>5)</sup>，一部改変)

表4 種々生ワクチンの曝露後接種の効果

項目	麻疹	水痘	風疹	ムンプス
潜伏期間 (日)	10～14	14～16	16～18	16～18
症状出現前のウイルス排泄	あり	あり	あり	あり
ウイルス血症のピーク (主症状出現との関係)	出現時	出現時	出現時	出現前
ワクチン後の反応				
副反応出現 (日)	7～10	14～	7～14	18～21
CMI 出現 (日)	7～10	5～13	10～14	14～
曝露後接種	有効	有効	有効?	無効
接種までの期間	72 時間以内	3 日以内	理論上	当日 *

CMI:cell mediated Immunity (細胞性免疫)

(文献<sup>6)</sup>, 一部改変)

\*: 家族内曝露当日では有効率 57%

感染症においては、野生株感染早期にワクチンを接種すれば、野生株よりもワクチン株が早期に増殖し、増殖したワクチン株により誘導された特異免疫により野生株の増殖が抑制され、症状の出現が免れるか軽症化するというものである。生ワクチンの緊急接種では、症状出現の有無に関わらず特異免疫は誘導される。

麻疹や水痘では 72 時間以内に緊急接種をすれば発症予防は可能であり (表 4), 万一発症したとしても軽症化が期待できる<sup>6)</sup>。風疹の接触後接種の有効性については報告されていないが、理論上有効とされている。ムンプスの場合は麻疹や水痘ほど効果は高くはないが、家族内接触以外の場合では効果が期待されている。

麻疹患者接触後の発症予防のための免疫不全者における  $\gamma$  グロブリン投与量は 0.5mL/kg 筋注である。この投与量は免疫健全者に対する量 (0.25mL/kg) の倍量である。静注用免疫グロブリン (IVIG) 中の麻疹抗体価は筋注用  $\gamma$  グロブリンとほぼ同じ濃度であるので、IVIG を用いて発症予防を図るときは 400mg/kg を投与する。高単位水痘帯状疱疹  $\gamma$  グロブリンが市販されていない本邦では、水痘発症予防に IVIG が代用されている。本邦の IVIG に含まれる VZV 抗体価から計算すると、免疫健全

者では理論上 50～150mg/kg の投与で発症予防が可能である<sup>7)</sup>。しかし、免疫不全者では麻疹と同様に免疫健全者の倍量、即ち麻疹発症予防量と同量が必要と考えられている。

筋注用  $\gamma$  グロブリンや IVIG にもムンプス抗体や風疹抗体は含まれており、理論上は接触後の緊急投与にて発症予防は可能である。しかし、ムンプスや風疹では接触後の  $\gamma$  グロブリン緊急投与の有効性は臨床的には示されていない。

## 2) 肝炎ウイルス対策

ヒトに感染する肝炎ウイルスには、経口で感染する A 型肝炎ウイルス (HAV), E 型肝炎ウイルス (HEV) と、主として血液を介して感染する B 型肝炎ウイルス (HBV) と C 型肝炎ウイルス (HCV) とがある。これら 4 種の肝炎ウイルスのうちワクチンで予防可能なのは HAV と HBV のみである。HCV は変異のスピードが速いためワクチンの開発が困難である。血液媒介感染に対する感染防御対策の基本は、体液に接触する際の手袋着用と注射器のリキャップ禁止である。

HBV はウイルス血症を介して肝臓に到達し、肝臓で増殖して症状が出現する全身ウイルス感染症の一つである。HBV ワクチンは不活化ワクチンであるため、有効な免疫を誘導し、誘導した免疫を長期

に維持するためには3回の接種が必要である。3回HBVワクチンを接種し、その後の抗体価が感染防御レベルである10IU以上あれば、免疫記憶細胞および免疫実行細胞は効果的に誘導されている。欧米ではHBVワクチン3回接種後10IU以上の抗体価を獲得した人は、その後に抗体価が陰性化しても免疫の記憶が残っており、HBワクチンの再接種は不要としている<sup>8)</sup>。また、HBVの再感染を受けたときも、感染したHBVによりブースター効果が誘導され、誘導された特異免疫によりHBVの増殖が抑制されるため、曝露後のHBVワクチン緊急接種は不要としている。一方、本邦ではワクチン後にHBV抗体価が陰性化したときには感染防御レベルを維持するために追加接種が必要という意見や、陰性化したときには追加接種は不要だが、接触時にはHBVワクチンの緊急接種が必要との意見がある。

### 3) インフルエンザウイルス対策

インフルエンザウイルスは感染した呼吸器粘膜で増殖し、感染後2～3日で症状が出現する粘膜ウイルス感染症の一つである。粘膜ウイルス感染症では、免疫を持っている人でも、ウイルス感染後に始まるブースター効果による特異免疫上昇までに症状が出現するため、発症予防には高い免疫力が必要である。また、インフルエンザウイルスはHCVやヒト免疫不全ウイルス(HIV)と並んで変異しやすいウイルスであり、ワクチンは毎年流行する株を予測して新しく作製されている。毎年高い免疫力を維持してインフルエンザ罹患を予防するためには、毎年のワクチン接種が必要である。なお、1回野生株に罹患すると、同じ型のインフルエンザウイルスに対しては30ヶ月間感染予防効果がある<sup>9)</sup>。

スペイン風邪流行時のデータから求められるインフルエンザウイルスの基本再生産数(1人の感染者が周囲の免疫のない人に感染させる数)は3～4であり<sup>10)</sup>、流行を阻止するための集団免疫率は75%である。ワクチン株と流行株の変異がないと仮定すると、理論上その地域で75%以上の人がインフルエンザワクチンを受けていると流行は制御される。

医療従事者は医療機関へインフルエンザウイルスを持ち込むハイリスク者であるので、毎年のインフルエンザワクチン接種が勧められる。また、インフルエンザに罹患すると死亡率が高くなる65歳以上の高齢者も毎年インフルエンザワクチン接種が必要である。なお、高齢者ではインフルエンザ罹患後の肺炎球菌感染による肺炎が問題となっており、欧米では23価肺炎球菌ワクチンの5年ごとの接種が勧められている。

## ◆3. ワクチンのないウイルスの話題

### 1) ノロウイルス

04/05シーズンに集団感染が話題となったウイルスとしてノロウイルスがある。ノロウイルスの感染ルートは吐物や糞便による接触感染と食物媒介感染(いわゆる食中毒)とがあり、施設内感染の主因は接触感染である。ノロウイルスによる接触感染対策は、①感染者のおしめや吐物に触れるときは手袋を着用し、使い捨てのペーパータオルで処理し、ゴミ袋を密封してゴミ処理に出すこと、②処理後は流水で十分に手を洗うこと等である<sup>11)</sup>。

ノロウイルスはエンベロープを持たないウイルスであり、アルコール消毒に対して抵抗性を示すので、流水による手洗いが感染制御に対して有効である。最近、10秒間の流水による手洗いでもウイルス感染予防に有効と報告されている<sup>12,13)</sup>。

### 2) 防疫すべきウイルス

交通網の発達により、ウイルス感染症もグローバル化している。外国からの持ち込みが心配されているウイルスとして、SARSコロナウイルス、西ナイルウイルス、狂犬病ウイルス、高病原性トリインフルエンザウイルスなどがあり、検疫所と研究機関とが共同で監視を行っている。なかでも狂犬病ウイルスは、哺乳類すべてに感染すること、感染すると死亡率は100%であること、狂犬病ウイルスを含むリッサウイルス科ウイルスの流行がない国は日本とニュージーランドだけであること、現在の日本における犬の狂犬病ワクチン接種率が低率であること、哺乳類の密輸が多いことなどの理由で、国内へウイ

---

ルスが再侵入すると再根絶の困難さが予測されている。

#### ◆まとめ

ワクチンにより予防可能なウイルスに対する感染制御の基本はワクチン接種である。特にヒトヒト感染をおこすウイルスでは日頃から接種率を高め、地域社会での流行制御に努めることが大切である。ワクチンが開発されていないウイルスに対しては、標準予防策と飛沫感染予防策が感染制御対策の基本である。

#### 【参考文献】

- 1) Fine PEM: Herd immunity; history, theory, practice. *Epidemiologic Reviews* 15:265-302, 1993
- 2) 庵原俊昭：ワクチンのすべて一望ましい接種時期と接種方法. *小児科診療* 67：2005-2011, 2004
- 3) AAP: Infection control for hospitalized children. *Red Book* 2003, 26th edition, 146-151, 2003, Elk Grove Village, IL
- 4) Seto WH, Tsang D, Yung RW, et al: Effectiveness of precautions against droplets and contact in prevention of nosocomial transmission of severe acute respiratory syndrome (SARS). *Lancet* 361:1519-1520, 2003
- 5) 庵原俊昭：ウイルス感染症の診断. *小児科診療* (印刷中)
- 6) 庵原俊昭：ムンプスワクチン. *小児看護* 27：1646-1650, 2004
- 7) 庵原俊昭：感染症の抗体療法—水痘帯状疱疹. *小児科* 45：583-586, 2004

- 8) European consensus group on hepatitis B immunity: Are booster immunisations needed for lifelong hepatitis B immunity? *Lancet* 355:561-565, 2000
- 9) Slifka D, Ahmed R: Long-term humoral immunity against viruses: revisiting the issue of plasma cell longevity. *Trends Microbiol* 4:394-400, 1996
- 10) Mills CE, Robins JM, Lipsitch M: Transmissibility of 1918 pandemic influenza. *Nature* 432: 904-906, 2004
- 11) 松野重夫：ノロウイルス感染症. *World Focus* 69:1-2, 2005
- 12) Sickbert-Bennett EE, Weber DJ, Gergen-Teague MF, et al: Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. *Am J Infect Control* 53:67-77, 2005
- 13) Zerr DM, Allpress AL, Heath J, et al: Decreasing hospital-associated rotavirus infection, A multidisciplinary hand hygiene campaign in a children's hospital. *Pediatr Infect Dis J* 24:397-403, 2005

---

#### 著者連絡先

庵原 俊昭 (Ihara Toshiaki)  
国立病院機構三重病院 小児科・病院長  
(National Mie Hospital)  
〒514-0125 津市大里窪田町 357  
357 Ohsato-Kubota, Tsu-City, Mie-Pref., 514-0125, Japan  
Tel: 059-232-2531 / Fax: 059-232-5994  
e-mail: ihara@mie-m.hosp.go.jp

## Review

# Human cytomegalovirus infections in premature infants by breastfeeding

Kei Numazaki

Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases (NIID), Tokyo, Japan E-mail: [numazaki@nih.go.jp](mailto:numazaki@nih.go.jp)

Accepted 10 August, 2004

Human cytomegalovirus (CMV) is the most common cause of congenital and perinatal infections. Understanding the epidemiology of CMV is a key element in development of strategies for prevention of infection in premature infants. Breast-fed infants are susceptible to CMV infection from breast milk. CMV was isolated more frequently from breast milk at more than one month after delivery than from colostrum or early breast milk. CMV particle shedding into milk whey have a more important role. Cytokines in serum and milk are related to the reactivation of CMV, which occurs locally in the mammary gland of the lactating mother after delivery. Premature infants with low concentration of serum antibodies can acquire CMV infection from the fresh breast milk containing the virus. Freezing breast milk may be protective for the preterm infant until the titer of CMV antibody increases. However clinical importance of CMV infection in premature infants by breast-feeding is still unclear. This mini-review focuses on recent advances in the study of CMV infection in premature infants by breast-feeding.

**Key words:** cytomegalovirus (CMV), premature infants, breastfeeding, reactivation.

## INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (CMV) is the most common cause of congenital and perinatal infections throughout the world.

The prevalence of congenital CMV infection varies widely between different populations (0.2-3.0%). Only less than 5% of the infants with congenital CMV infection have typical clinical symptoms of cytomegalic inclusion disease (CID), another 5% have atypical involvement, and the remainder (90%) is asymptomatic at the time of delivery (Numazaki and Chiba, 1997). Even asymptomatic at birth, 5 to 17% of infants with these asymptomatic congenital CMV infections will develop progressive sensorineural hearing loss or other neurodevelopmental difficulties within first 4 years of life after birth (Numazaki et al., 2002; Numazaki and Fujikawa, 2004).

We previously reported the incidence of congenital CMV infection in Japan (Numazaki and Chiba, 1996). Of 7,995 Japanese neonates, 31 (0.39%) were identified as having congenital CMV infections on the basis of viuria at birth. Three of 31 infants had clinically severe disease resulting in death during the neonatal period. As

decrease in the prevalence of serum antibodies against CMV has been speculated in recent years in the last 20 years (Nishimura et al., 1999), the incidence of primary infection during pregnancy may be increased in future.

Transmission of CMV by natural routes relates importantly to preventing CMV transmission to the seronegative pregnant women. CMV is isolated more frequently from cervical secretion and semen than from urine and other clinical specimens. Evidences for sexual transmission of CMV were provided by determining prevalence of serum antibodies to CMV and viral shedding in male sex partners of women with and without CMV infection (Numazaki et al., 2000). However, it is also necessary to take into account other potential sources of CMV infection including contact with asymptomatic young children who are excreting CMV at the places such as child care arrangements.

Primary infection of CMV during pregnancy was associated with an increased risk of developmental or intellectual deficit in the offspring. Although CMV can be transmitted to the fetus even if there is preconceptional maternal immunity, reinfection or reactivated latent

infection might be an important determinant of developmental and intellectual impairment in the offspring. The population of seropositive women of childbearing age in low socioeconomic community is about 85% and about 55% in populations of high socioeconomic status. In certain countries parental interest groups have called for screening programs for the general obstetric population in an attempt to reduce the rate of fetal damage with congenital CMV infection.

Although social and economic conditions have improved dramatically, it was also reported that the prevalence of CMV was stable from 1976 to 1990 (Hirota et al., 1992). The prevalence of serum antibodies to CMV was decreased and primary CMV infection during pregnancy was speculated to be increased in Sapporo, Japan during the time of 1988 to 2000 (Numazaki and Fujikawa, 2002). From the results of the recent study, incidences of congenital CMV infection in Japan are estimated to be changed (Numazaki and Fujikawa, 2004).

Breast-fed infants are susceptible to CMV infection from breast milk. Premature infants with low concentration of serum antibodies can acquire CMV infection from the fresh breast milk containing the virus. Freezing breast milk may be protective for the preterm infant until the titer of CMV antibody increases.

However clinical importance of CMV infection in premature infants by breast-feeding is not completely clarified. This mini-review focuses on recent advances in the study of CMV infection in premature infants by breast-feeding relevant for clinicians.

### Epidemiology of perinatal CMV Infections

As a result of transmission during the course of delivery and by ingestion of infected breast milk, perinatal infections are much more prevalent than congenital infections. Perinatal CMV infection often involves the hepatobiliary tract but does not usually cause clinical manifestations in normal individuals. Seropositivity for antibodies against CMV is indicative of latent infection, but insufficient as a predictor for the risk of recurrence. In seronegative preterm infants it has been possible to prevent postnatal CMV transmission by screening blood products for CMV and treating banked breast milk (Diosi et al., 1967). The reported rate of transmission for infants fed with CMV-positive breast milk ranges from 58 to 76% (Hayes et al., 1972; Dworsky et al., 1983; Hotsubo et al., 1994).

Liver dysfunction associated with perinatal CMV infections is often recognized in both normal and immuno-compromised hosts and in patients with both primary and reactivated CMV infections. Although infantile CMV hepatitis was speculated to be caused by primary infection in the perinatal period, immunological conditions of the hosts may modify the clinical manifestations. We investigated the role of peripheral blood mononuclear

cells, especially CD4+ and CD8+ T lymphocytes, in infants with liver dysfunction associated with perinatal primary CMV infection, by flow cytometry and the polymerase chain reaction (PCR) (Numazaki et al., 1994). Expression of CMV antigens in CD4+ and CD8+ cells was also found in patients with liver dysfunction associated with perinatal primary CMV infection. CMV infection of CD4+ and CD8+ cells may play an important role in the pathogenesis of activation of CMV infection (Fujikawa et al., 2003a, b).

### CMV infections by breastfeeding

Since Diosi et al. (1967) succeeded in isolating CMV from breast milk, breast milk has been considered as one of the most important sources of mother-to-infant infection. Hayes et al. (1972) isolated CMV from breast milk of 17 out of 64 seropositive women (27%) and most of the isolates were obtained after the first week. Stagno et al. (1980) reported that breast-fed infants are more frequently infected with CMV than bottle-fed infants by the result of isolation from urine. Dworsky et al. (1983) reported that consumption of infected breast milk led to infection in 69% of infants.

The presence of CMV in breast milk was more frequently observed than in other sites such as vaginal secretion, urine and saliva. Isolation of CMV from colostrum around the time of delivery showed a lower incidence of viral isolation than breast milk at more than one month after delivery. Breastfeeding seemed to be associated more closely with vertical infection than contact with an infected genital tract. Infants who were fed on breast milk for over one month were infected more frequently, and the incidence of infection in infants was significantly higher when the infants were fed by mothers who shed CMV into their milk (Dworsky et al., 1983).

We compared the rates of CMV isolation from breast milk at different times after delivery. Our data support the results of previous studies (Hayes et al., 1972; Dworsky et al., 1983; Hotsubo et al., 1994; Ahlfors et al., 1985) which show that virus excretion into colostrum and milk occurs less frequently in the period a few weeks after delivery. Our results of the detection of CMV immediate early (IE) DNA (Asanuma et al., 1996) also support the data of isolation.

Colostrum and early milk were previously reported to contain abundant IgA and IgM that might be capable of neutralizing CMV during the first few days of lactation (Goldman et al., 1982). However, IgA and IgM antibodies against CMV are not associated with diminished CMV shedding in colostrum and early milk, as CMV DNA has not been detected in colostrum and early milk (Asanuma et al., 1996).

Although lactoferrin and other iron-binding proteins present in colostrum and milk also have bacteriostatic and anti-CMV activity *in vitro* (Harmsen et al., 1995), *in*

*vivo* roles of these antiviral agents in neonatal and maternal infections has yet to be clarified. The synergistic interaction between sIgA and iron-binding proteins such as lactoferrin has been speculated to have an important role in such defense (Skansn-Saphir et al., 1993). As viral DNA was not detected from colostrum and no anti-CMV effects of liquid supernatant of colostrum was shown, inhibitory effect of antibodies in colostrum was not proved (Numazaki et al., 1996).

Most of the viruses in the human herpesvirus family are transmitted by cell-to-cell contact. Cell-to-cell contact is also the main method of vertical transmission for human T-lymphotropic virus type-I (HTLV-I) and human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) (Kinoshita et al., 1984; Van de Perre et al., 1993). For most viruses including CMV, although transmission has been documented, no serious illness or clinical symptoms in the neonate secondary to breast-feeding has been reported (Numazaki, 1997).

Human breast milk contains many different types of cells associated with immune reactions. Although CMV DNA was detected in milk cells, the rate of detection in whey was higher than in milk cells. CMV particle shedding into whey may have a more important role in vertical infection by breast milk than cell-to-cell transmission. The excretion of CMV into breast milk was not considered to be the primary CMV infection of mothers.

Mononuclear cells of human breast milk have a potential for production of many different cytokines including tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and interferon (IFN)- $\gamma$  (Goldman et al., 1982; Skansen-Saphir et al., 1993). It is likely that specific cellular interactions as well as other cytokines are necessary for CMV reactivation (Numazaki et al., 1998; Asanuma et al., 1995). In the active phase of CMV infection, serum titers of sIL-2R were correlated with clinical findings.

In postpartum women, the state of cellular immunity is thought to be similar to the state in late pregnancy. The suppression of cellular immunity is thought to induce a localized reaction in the mammary gland and to induce a large amount of CMV shedding into the colostrum. It was suggested that presence of cytokines such as sIL-2 in serum was also related to the reactivation of CMV which occurs locally in the mammary gland of the lactating mother after delivery.

We also tried to evaluate anti-CMV properties and roles of cytokines in human colostrum and breast milk (Numazaki et al., 1997). Anti-CMV activity of colostrum was evaluated by indirect immunofluorescence assay using CMV AD169 strain-infected MRC-5 cells. We measured TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  activities in breast milk.

Liquid supernatant of colostrum without cytotoxicity was not found to exert inhibitory effect on CMV-infected MRC-5 cells. The activities of TNF- $\alpha$  were detected in CMV DNA-negative colostrum and breast milk. These activities were not detected from CMV DNA-positive

milk. IFN- $\gamma$  activities were also detected in colostrum. It is likely that presence of cytokines such as TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  in colostrum and early breast milk are related to inhibit the reactivation of CMV which occurs locally in the mammary gland of the lactating mother after delivery.

### CMV infection in premature infants

CMV excretion into urine is observed between days 30 and 120, a time during which most infants with very low birth weight are still hospitalized and are susceptible to respiratory or other acute infections. Early onset of CMV infection occurred only in extremely immature, preterm infants, and it was associated with a symptomatic course (Hamprecht et al., 2001). Perinatal CMV infection often involves the hepatobiliary tract but not usually cause clinical manifestations. The symptoms were almost similar to previous descriptions of groups of neonates (Dworsky et al., 1982; Kumar et al., 1984).

Symptomatic congenital infections by CMV usually occur in only 0.01% to 0.04% of all newborns. As demonstrated by Prosch et al. (2002), the total incidence of CMV in preterm infants was 18%. Sawyer et al. (1987) as well as Vochem et al. (1998) observed CMV infection in 33% and 25% of preterm infants, respectively. Using the more insensitive method of CMV isolation in cell culture, Yeager et al. (1983) found a CMV incidence of 17%. Hamprecht et al. (2001) observed postnatal CMV infections in 37% (33/90) of preterm infants from seropositive, breastfeeding mothers. In all these studies, the overall rate of CMV infection in preterm infants was higher.

The clinical outcome of CMV infection in preterm newborns is variable, ranging from asymptomatic infection to fatal life-threatening diseases, such as sepsis-like disease (Kumar et al., 1984). However, a recent attempt to prevent maternal and nosocomial CMV transmission from occurring in premature neonates by administering intravenous immunoglobulins failed (Snydman et al., 1995).

### Association with chronic lung diseases

Relationship between bronchopulmonary dysplasia (BPD) and congenital infection by pathogens such as *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, or CMV has been speculated (Sawyer et al., 1987; Pierce and Bancalari, 1995; Numazaki et al., 1986; Iles et al., 1996; Wang et al., 1995). Sawyer et al. (1987) reported an association between CMV infection and BPD. Infants with CMV infection, especially those with prenatal and postnatal infection, were significantly longer on ventilation than those without infection. The incidence of chronic lung diseases (CLD) in pre and postnatally infected infants is



higher compared with those infants for which the time of infection remained unclear. All of the infants with the clinical symptom complex had underlying CLD and all had received multiple blood transfusions during their hospitalization (Ballard et al., 1979). Acquired CMV may be relatively common in sick preterm infants and should be distinguished from other causes of rapid deterioration.

CMV frequently may cause active infection in preterm infants. CMV can colonize the upper respiratory tract. CMV may increase the risk of developing CLD including BPD in individual patients, especially in very immature infants. CMV induce early lung inflammation (Grundy et al., 1987) associated with increased expression of proinflammatory cytokines and chemokines. CMV may also trigger inflammatory processes in the immature lung, supporting the development of CLD such as BPD. The pro inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  stimulates expression of CMV immediate early (IE) proteins which are known to trigger inflammatory processes. Thus, active CMV infection may not only promote development of BPD but, in turn, CMV replication may be enhanced in the BPD lung by an inflammatory process.

#### Association with breast milk and breastfeeding

If breastfed preterm infants may be more likely than term infants to have asymptomatic CMV infection, preterm infants born vaginally acquired CMV infection also may develop symptomatic infection. Breastfed preterm infants without enough serum titers of transplacental antibodies to CMV may be more likely to have a symptomatic infection. It was suggested that about 40% of the breast-fed children acquire CMV via breast milk and breastfeeding during the first year of their lives (Minamishima et al., 1994). This mother-to-infant transmission of CMV may have certain protective effects on congenital CMV disease in the offspring. However, it was also estimated that infants who are not breastfed have a six fold greater risk of dying from infectious diseases in the first 2 months of life than those who are breastfed in less developed countries.

After preterm infants who were CMV-seronegative were fed banked human milk that was either pasteurized or frozen, no infections were observed (Wang et al., 1995). Pasteurization and freezing to  $-20^{\circ}\text{C}$  for 3 days inactivated CMV in naturally infected raw human milk (Friis and Anderson, 1982; Welsh et al., 1979; Goldblum et al., 1984; Speer et al., 1986). This procedure may inactivate CMV in human milk without affecting the nutritional and immunological qualities of human breast milk.

Although one might conceivably remove cell associated virus by filtering, free viral particles are difficult to eliminate. Pasteurization to  $62.5^{\circ}\text{C}$  will destroy infectious viral particles, but this also alters milk composition to a significant degree, and In practical

terms is often limited by the requirement for scrupulous hygiene (Lawrence, 1999; Wright and Feeney, 1998).

Immunological factors may be associated with the pathogenesis of neurological and other sequelae in CMV-infected infants (Numazaki et al., 2002). It is possible that progression of neurologic complications is related to the persistent viral infection and replication of CMV or host immunological response to infection. Protective mechanisms of the innate and cellular immune system at work during lactation could potentially be exploited by vaccination. Most of seropositive breastfeeding mothers had selective reactivation of CMV in their breast milk with an incidence of acquired CMV infection in the neonatal unit. The rate of CMV acquisition in the neonatal unit appears to be high in which did not take preventive measures against CMV.

Hamprecht et al. (2001) have reported that 52% of mothers in their study were CMV-seropositive, and 22% of uninfected infants exposed to CMV-infected breast milk acquired the virus. The only difference in CMV specific preventive measures taken between these studies was the routine freezing of mother's milk at  $-20^{\circ}\text{C}$  in the neonatal unit when an excess of milk was available. This milk was then used at a later date, usually after 72 hours of freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$ . A study by Friis and Anderson (1982) previously showed that freezing of breast milk at  $-20^{\circ}\text{C}$  for more than 72 hours reduces CMV viral titers by 99%. Another showed that overnight freezing of breast milk at  $-20^{\circ}\text{C}$  reduced CMV infectivity of milk by 90%, and storage over seven days reduced CMV infectivity by 100% (Stagno et al., 1980). Routine freezing of breast milk at  $-20^{\circ}\text{C}$  may reduce transmission of CMV from breast milk of seropositive mothers to their uninfected preterm infants.

#### CONCLUSIONS

CMV is an agent which causes CID in infants who have acquired the virus in utero, and causes severe systemic disorders due to viral reactivation in patients who are immuno compromised due to HIV-1 infection, organ transplantation, and immunosuppressive chemotherapy. The increase in the popularity of breastfeeding and use of child care arrangements are having a major effect on the epidemiology of cytomegalovirus infections (Stagno et al., 1994). We previously conclude that CMV excreted into milk whey may be more important in vertical infection than that of milk cells infected with CMV for breast-fed infants (Numazaki et al., 2001).

In prospective studies there was a high incidence of CMV infection in preterm infants from seropositive and negative mothers. The most premature infants are at greatest risk of acquiring an early and symptomatic CMV infection. Term infants can be breast-fed when the mother is shedding virus in her milk because of the protection of transplacental maternal antibodies.

Premature infants with low concentration of transplacental antibodies can acquire the disease from the fresh breast milk containing the virus. Freezing breast milk at -20 degrees C for 7 days can inactivate the virus and this may be a protective for the preterm infant until the titer of serum antibody against CMV received by breastfeeding increases.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by research grants from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

## REFERENCES

- Ahlfors K, Ivarsson SA (1985). Cytomegalovirus in breast milk of Swedish milk donor. *Scand. J. Infect. Dis.* 17: 11-13.
- Asanuma H, Numazaki K, Nagata N, Chiba S (1995). Cytokine response and polymerase chain reaction study of peripheral blood mononuclear cells in infants with human cytomegalovirus infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 12: 153-158.
- Asanuma H, Numazaki K, Nagata N, Hotsubo T, Horino K, Chiba S (1996). Role of milk whey in the transmission of human cytomegalovirus infection by breast milk. *Microbiol. Immunol.* 40: 201-204.
- Ballard RA, Drew WL, Hufnagle KG, Riedel PA (1979). Acquired cytomegalovirus in preterm infants. *Am. J. Dis. Child.* 133: 482-485.
- Diosi P, Babusceac L, Nevinglovski O, Kun-Stoicu G (1967). Cytomegalovirus infection associated with pregnancy. *Lancet* ii: 1063-1066.
- Dworsky M, Stagno S, Pass R, Cassady G, Alford C (1982). Persistence of cytomegalovirus in human milk after storage. *J. Paediatrics* 101: 440-443.
- Dworsky M, Yow M, Stagno S, Pass RF, Alford C (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Paediatrics* 72: 295-299.
- Fujikawa T, Numazaki K, Asanuma H, Kudo R, Tsutsumi H (2003a). The frequency of human cytomegalovirus-specific T cells during pregnancy determined by intracellular cytokine staining. *J. Med. Virol.* 71: 527-531.
- Fujikawa T, Numazaki K, Asanuma H, Tsutsumi H (2003b). Human cytomegalovirus infection during pregnancy and detection of specific T cells by intracellular cytokine staining. *Int. J. Infect. Dis.* 7: 215-221.
- Friis H, Andersen H (1982). Rate of inactivation of cytomegalovirus in raw banked milk during storage at -20°C and pasteurisation. *Brit. Med. J.* 285: 1604-1605.
- Goldblum RM, Dill CW, Albrecht TB, Alford ES, Garza C, Goldman AS (1984). Rapid high temperature treatment of human milk. *J. Paediatrics* 104: 380-385.
- Goldman AS, Garza C, Nichols, Goldblum RM (1982). Immunologic factors in human milk during the first year of lactation. *J. Pediatrics* 100: 563-567.
- Grundy JE, Shanley JD, Griffith PD (1987). Is cytomegalovirus interstitial pneumonitis in transplant recipients an immunopathological conditions? *Lancet* ii: 996-999.
- Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Christian P, Speer CP, Gerhard J (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* 357: 513-518.
- Harmsen MC, Swart PJ, de Béthune MP, Pauwels R, de Clercq E, The TH (1995). Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication *in vitro*. *J. Infect. Dis.* 172: 380-388.
- Hayes K, Danks DM, Gibas H, Jack I (1972). Cytomegalovirus in human milk. *N. Engl. J. Med.* 287: 177-178.
- Hirota K, Muraguchi K, Watanabe N, Okumura M, Kozu M, Takahashi K, Machida Y, Funayama Y, Oshima T, Numazaki Y (1992). Prospective study on maternal, intrauterine, and perinatal infections with cytomegalovirus in Japan during 1976-1990. *J. Med. Virol.* 37: 303-306.
- Hotsubo T, Nagata N, Shimada M, Yoshida K, Fujinaga K, Chiba S (1994). Detection of human cytomegalovirus DNA in breast milk by means of polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 38: 809-811.
- Iles R, Lyon A, Ross P, McIntosh N (1996). Infection with *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* and the development of chronic lung disease in preterm infants. *Acta Paediatrica* 85: 482-484.
- Kinoshita K, Hino S, Amagasaki T, Ikeda S, Yamada Y, Suzuyama J, Momita S, Toriya K, Kamihira S, Ichimura M (1984). Demonstration of adult T-cell leukemia virus antigen in milk from three sero-positive mothers. *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)* 175: 103-105.
- Kumar ML, Nankervis GA, Cooper AR, Gold E (1984). Postnatally acquired cytomegalovirus infections in infants of CMV-excreting mothers. *J. Pediatr.* 104: 669-673.
- Lawrence RA (1999). Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatrica* 88 (Suppl): 14-18.
- Minamishima I, Ueda K, Minematsu T, Minamishima Y, Umemoto M, Take H, Kuraya K (1994). Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection. *Microbiol. Immunol.* 38: 549-552.
- Nishimura N, Kimura H, Yabuta Y, Tanaka N, Ito Y, Ishikawa K, Suzuki C, Morishima T (1999). Prevalence of maternal cytomegalovirus (CMV) antibody and detection of CMV DNA in amniotic fluid. *Microbiol. Immunol.* 43: 781-784.
- Numazaki K, Chiba S, Kogawa K, Umetsu M, Motoya H, Nakao T (1986). Chronic respiratory disease in premature infants caused by *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Pathol.* 39: 84-88.
- Numazaki K, Asanuma H, Nagata N, Chiba S (1994). Analysis of human cytomegalovirus-infected peripheral blood mononuclear cells from infants with liver dysfunction by flow cytometry and the polymerase chain reaction. *J. Leukocyte Biol.* 56: 187-191.
- Numazaki K, Asanuma H, Hotsubo T, Chiba S (1996). Anti-human cytomegalovirus effects of breast milk. *J. Infect. Dis.* 174: 444.
- Numazaki K, Chiba S (1996). PCR detection cytomegalovirus DNA in serum as test for congenital cytomegalovirus infections. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1871-1872.
- Numazaki K (1997). Human cytomegalovirus infection of breast milk. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 18: 91-98.
- Numazaki K, Asanuma H, Chiba S (1997). Relationship between cytokines and human cytomegalovirus infection of breast milk. *J. Infect. Chemotherapy* 3: 58-61.
- Numazaki K, Chiba S (1997). Current aspects of diagnosis and treatment of cytomegalovirus infections in infants. *Clin. Diagn. Virol.* 8: 169-181.
- Numazaki K, Asanuma H, Ikehata M, Chiba S (1998). Detection of cytokines and cytomegalovirus DNA in serum as test for congenital infection. *Early Human Dev.* 52: 43-48.
- Numazaki K, Fujikawa T, Chiba S (2000). Relationship between seropositivity of husbands and primary cytomegalovirus infection during pregnancy. *J. Infect. Chemotherapy*. 6: 104-106.
- Numazaki K, Chiba S, Asanuma H (2001). Transmission of cytomegalovirus. *Lancet* 357: 1799-1800.
- Numazaki K, Fujikawa T (2002). Prevalence of serum antibodies to cytomegalovirus in pregnant women in Sapporo, Japan. *Int. J. Infect. Dis.* 6: 147-148.
- Numazaki K, Fujikawa T, Asanuma H (2002). Immunological evaluation and clinical aspects of children with congenital cytomegalovirus infection. *Congenital Anomalies* 42: 181-186.
- Numazaki K, Fujikawa T (2004). Chronological changes of incidence and prognosis of children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection in Sapporo, Japan. *BMC Infectious Diseases*, 4: 22.
- Pierce MR, Bancalari E (1995). The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Paediatrics Pulmonol.* 19: 371-378.
- Prosch S, Lienicke U, Priemer C, Flunker G, Seidel WF, Kruger DH,

- Wauer RR (2002). Human adenovirus and human cytomegalovirus infections in preterm newborns: no association with bronchopulmonary dysplasia. *Paediatrics Res* . 52: 219-224.
- Sawyer MH, Edwards DK, Spector SA (1987). Cytomegalovirus infection and bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. *Am. J. Dis. Child.* 141: 303-305.
- Skansén-Saphir U, Lindfors A, Andersson U (1993) Cytokine production in mononuclear cells of human milk studied at the single-cell level. *Paediatrics Res.* 34: 213-216.
- Snydman DR, Werner BG, Meissner HC, Cheeseman SH, Schwab J, Bednarek F, Kennedy JL Jr, Herschel M, Magno A, Levin MJ (1995). Use of cytomegalovirus immunoglobulin in multiply transfused premature neonates. *Paediatrics Infect. Dis. J.* 14: 34-40.
- Speer CHP, Gahr M, Pabst MJ (1986). Phagocytosis-associated oxidative metabolism in human milk macrophages. *Acta Paediatrics Scand.* 75: 444-451.
- Stagno S, Reynolds DW, Pass RF, Alford CA (1980). Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N. Engl. J. Med.* 302: 1073-1076.
- Stagno S, Cloud GA (1994). Working parents: the impact of day care and breast-feeding on cytomegalovirus infections in offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 2384-2389.
- Van de Perre P, Simonon A, Hitimana D-G, Dabis F, Mstellati P, Mukamabano B, Butera JB, Van Goethem C, Karita E, Lepage P: (1993). Infective and anti-infective properties of breast milk from HIV-1-infected women. *Lancet* 341: 914-918.
- Vochem M, Hamprecht K, Jahn G, Speer CP (1998). Transmission of cytomegalovirus to preterm infants through breast milk. *Paediatrics. Infect. Dis. J.* 17: 53-58.
- Wang EEL, Ohlsson A, Kellner JD (1995). Association of *Ureaplasma urealyticum* colonization with chronic lung disease of prematurity: results of a metaanalysis. *J. Paediatrics* 127: 640-644.
- Welsh JK, Arsenakis M, Coelen RJ, May JT (1979). Effect of antiviral lipids, heat and freezing on the activity of viruses in human milk. *J. Infect. Dis.* 140: 322-326.
- Wright KC, Feeney AM (1998). The bacteriological screening of donated human milk: laboratory experience of British Paediatrics Association's published guidelines. *J. Infect.* 36: 23-27.
- Yeager AS, Palumbo PE, Malachowski N, Ariagno RL, Stevenson DK (1983). Sequelae of maternally derived cytomegalovirus infections in preterm infants. *J. Pediatr.* 102: 918-922 .

# Human Cytomegalovirus Genetic Variability in Strains Isolated From Japanese Children During 1983–2003

Kaori Tanaka, Kei Numazaki, and Hiroyuki Tsutsumi\*

Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine, Sapporo, Japan

The genetic variability of 74 human cytomegalovirus (HCMV) clinical isolates from 60 Japanese infants and children during 1983–2003 was investigated, and the relevance to their clinical course was studied. The patients consisted of 10 asymptomatic congenitally infected babies, 45 infected perinatally or postnatally resulting in HCMV mononucleosis/hepatitis and 5 immunocompromised hosts. The hypervariable region of the HCMV genome, that is the *a* sequence and UL144 region was analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) and unrooted phylogenetic trees. HCMV glycoprotein B (gB) polymorphism was also studied. Unrooted phylogenetic trees of *a* sequence and UL144 allowed the isolates to be grouped to 5 and 3 clades, respectively. Three gB genotypes were also determined. However, there was no correlation between specific genotypes of these three genes and clinical forms, except for congenital infection which fell into one of three clades of the *UL144* gene. In addition, the variability of the three genes had no correlation with each other. This implies that study of a single gene is insufficient for investigating the molecular epidemiology of HCMV. This study provides basic data on the genetic variability of HCMV in an Asian population and should help to determine the strains for vaccine candidates. **J. Med. Virol. 76:356–360, 2005.** © 2005 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** molecular epidemiology; congenital infection; human cytomegalovirus (HCMV); HCMV glycoprotein B; HCMV *a* sequence; HCMV *UL144*

ine infection with HCMV carries the risk of a possible severe neurologic outcome in infants [Fowler et al., 1992; Murph et al., 1998; Demmler, 1999; Noyola et al., 2000]. HCMV antibodies are found in about 40%–60% of adults in Western countries [Clarke et al., 1996], and about 80%–90% of Japanese adults [Tanaka et al., 1998]. However, in recent years the HCMV infection rate in adult women has been decreasing, raising concerns of an increase in congenital infections secondary to primary maternal infection during pregnancy. Furthermore, current studies suggest that HCMV seropositive pregnant women can be re-infected with different HCMV strains and those re-infections may lead to intrauterine transmission and symptomatic congenital infections [Adler et al., 1995; Boppana et al., 1999, 2001].

The relationship between HCMV genetic variability and disease outcome has been the focus of many studies because this is expected to provide the basis for preventing infection or improving disease prognosis. Molecular epidemiological studies revealed the hypervariability of the glycoprotein B (*gB*) gene among HCMV; however, the correlation between gB genotypes and clinical symptoms remains unclear [Lukacsi et al., 2001; Humar et al., 2003; Rasmussen et al., 2003]. In addition, HCMV congenital infections have seldom been considered from the point of view of viral genetic heterogeneity [Bale et al., 2000].

HCMV is composed of unique long (L) and short (S) sequences containing terminal segments with repeating elements. The HCMV *a* sequence is located in the joining region between L and S sequences [Zaia et al., 1990; Boger et al., 2002]. Recently, the epidemiological relationships between variation of the *a* sequence gene and HCMV clinical isolates were reported [Zaia et al., 1990; Bale et al., 1996, 2001; Walker et al., 2001].

## INTRODUCTION

Human cytomegalovirus (HCMV) is a herpes virus and contains approximately 240 Kb DNA and over 200 open reading frames (ORFs) [Bale et al., 2001; Walker et al., 2001; Schleiss, 2003]. Although HCMV infection is usually asymptomatic, it is the most common cause of intrauterine infection throughout the world. Intrauter-

\*Correspondence to: Hiroyuki Tsutsumi, MD, PhD, Department of Pediatrics, Sapporo Medical University School of Medicine, S-1, W-16, Chuo-ku, Sapporo 060-8543, Japan. E-mail: tsutsumi@sapmed.ac.jp

Accepted 7 December 2004

DOI 10.1002/jmv.20366

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com)