表1　スクリーニング検査の実施状況

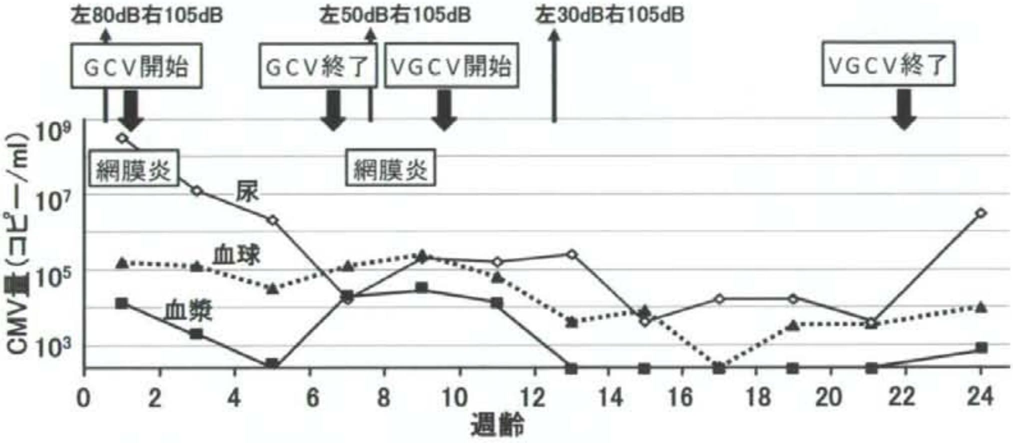
	旭川医大	北大	福島医大	東大	成育C	藤田保健大	長崎大	総計
検体収集数 (本年度以前)	3565 (2035)	123	530	414	120	356	856	5974 (2035)
先天性CMV	13 (8)	0	5	1	0	1	2	22 (8)
内症候性	2 (2)	0	2	0	0	0	1	5 (2)
先天性CMV 感染頻度(%)	0.36	0.00	0.94	0.24	0.00	0.28	0.23	0.37

3/6/2009までに感染研に到着した検体について

表2　同定された先天性 CMV 感染児の特徴

症例	担当施設	ID	母親年齢	兄弟	GA	出生体重(g)	出生時	CMV IgM	頭部画像	神経学的症状
1	旭川	C202	33	第2子	40w2d	2,265	顕性	+	石灰化	難聴
2	旭川	C97	33	第1子	39w6d	3,182	顕性	−	CT正常	難聴
3	旭川	12034	20	第2子	41w2d	3,488	なし	NA	CT正常	なし
4	旭川	12308	21	第1子	39w	3,362	なし	+	CT正常	なし
5	旭川	12542	30	第2子	39w6d	2,884	なし	+	CT正常	なし
6	旭川	12571	23	第2子	40w4d	3,228	なし	−	CT正常	なし
7	旭川	12999	31	第2子	38w6d	2,880	なし	+	CT正常	難聴・眼振
8	旭川	10744	29	第2子	39w4d	3,182	なし	−	CT正常	なし
9	旭川	16503	33	第4子	40w	2,796	なし	+	CT正常	なし
10	旭川	16987	36	第1子	39w4d	2,934	なし	−	CT正常	なし
11	旭川	16698	26	第1子	39w3d	3,040	なし	−	NA	なし
12	福島	20026	31	第2子	37w6d	2,338	小頭症	−	側脳室拡大	なし
13	藤田	71035	26	第2子	38w1d	2,646	なし	−	CT・MRI正常	なし
14	福島	20040	35	第3子	37w0d	2,304	なし	NA	CT正常	なし
15	福島	20270	NA	第2子	38w5d	2,590	なし	NA	NA	なし
16	旭川	17486	22	第1子	40w4d	2,758	なし	-	NA	なし
17	長崎	85075	NA	第1子	39w0d	3,100	なし	-	MRI正常	なし
18	福島	20096	29	第2子	38w2d	3,124	なし	NA	NA	なし
19	旭川	16261	21	第1子	41w3d	3,104	なし	NA	NA	なし
20	長崎	89001	NA	第1子	38w0d	2,080	顕性	+	両側脳室拡大	片側難聴

図１　症候性感染児の治療経過の１例



Ⅳ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
研究報告書

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染スクリーニングから判明した症候性先天性CMV感染症同胞例の臨床像と母体CMV特異的免疫機能の評価

研究代表者　藤枝　憲二　　旭川医科大学小児科
分担研究者　古谷野　伸　　旭川医科大学小児科
研究協力者　長森　恒久　　旭川医科大学小児科

【研究要旨】

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染パイロットマススクリーニングで同定した陽性例のうち、先天性CMV感染同胞例を有する一家系を経験した。その臨床像と母体免疫能を解析し、感染様式が再活性化あるいは持続感染による事を明らかにしたので報告する。第1子は健常新生児として出生した。第2子は重度の子宮内発育遅延（IUGR）をきたし症候性先天性CMV感染症と診断され、重篤な予後が予想されたため人工流産となった。第3子の妊娠中に異常はなく満期で出生した。しかし先天性CMV感染スクリーニングで第3子は陽性と判定され、新生児聴力検査でreferであった。その後のABRで、両側の難聴が明らかとなり症候性先天性CMV感染症と診断された。

この家系における感染様式を明らかにするために、CMV遺伝子解析、母体CMV IgGアビディティ測定を行った。また母体のCMV特異的免疫機能評価は、細胞内サイトカイン染色、リンパ球増殖試験で行った。その結果、①ウイルス遺伝子解析から人工流産となった胎児および第3子に感染したCMVは同一株であり、②母体IgG avidityの結果より、2回目の妊娠時に母体がCMVに初めて感染し、第3子には母体内に潜伏感染した同一株の再活性化あるいは持続感染によって垂直感染したが、③母体T細胞中のCMV特異的IFN-γ分泌CD4/CD8陽性細胞数とCMV特異的リンパ球増殖能はCMV IgG抗体陽性健常成人に比較して問題ないレベルにある事を明らかにした。

従って本家系は再活性化あるいは持続感染による症候性先天性CMV感染症を呈したものであることが示唆された。このような家系例は現在までに報告が無い。先天性CMV感染スクリーニングを行う事でこのような特殊な臨床例の存在を明らかにすることが出来、またスクリーニングにより先天性CMV感染症の全貌を把握することが重要であることが示唆された。

A. 研究目的

先進国における先天性中枢神経系障害の原因として、先天性CMV感染症は全出生児の200人に1人が胎内感染し、その約1割が重篤な症状を呈する事から、ダウン症候群と並び最多のものと推測されている。さらに出生時無症候児の一部が難聴・精神発達遅滞等の障害を遅発性に引き起す事が知られている。我々は、先天性CMV感染の全体像を把握し、障害に対する早期の診断・治療および療育的介入による社会的予後改善を目的として、先天性CMV感染の新生児パイロットマススクリーニングを実施してきた。その中で、前回の妊娠において先天性CMV感染症が証明され、その後の妊娠でCMV垂直感染が反復した一家系を経験した。我々はこの2度の垂直感染という特殊な事例がどのような機序により発生したかを明らかにするために本事例の詳細を解析した。

B. 研究方法

（1）症例

母体に特記すべき既往歴はない。第1子は健常である。2回目の妊娠時、胎児は妊娠20週で子宮内発育遅滞（IUGR)、胎児腹水、肝脾腫を指摘された。母体CMV-IgM陽性であり、妊娠21週の羊水、胎児腹水からもCMV-DNAが検出され、症候性先天性CMV感染症と診断された。両親の希望で妊娠21週4日に人工流産した。胎盤は305gで白色調、胎児は410gであった。第3子（3回目の妊娠）は在胎38週6日3284g、IUGRなく出生した。出生時先天性CMV感染を疑わせる症状はなかったが、我々が行っている新生児パイロットマススクリーニングで尿CMV-DNAが陽性であり、かつ血清のCMV IgM及びDNA陽性であった事から先天性CMV感染と診断した。新生児聴覚スクリーニングでは再検査となり、その後、聴性脳幹反応（ABR）で、左は90dBで反応無し、右は50dBで潜時の遅れが認められ、両側感音性難聴と診断された。その他、出生後より軽度の眼振を呈している。（図1、2）

（2）ウイルス遺伝子の解析

人工流産胎児（第2子)、第3子から検出されたCMVのglycoprotein B(gB)、glycoproteinN (gN)、UL144の3つの遺伝子についてダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を比較した。

（3）母体初感染時期の推定

人工流産時とその後の母体血清でCMV IgGアビディティ測定を行った。

（4）母体CMV特異的免疫機能の解析

細胞内サイトカイン染色法によるIFN-γ分泌細胞数と、[^{3}H]-methylthymidine取り込みを用いたリンパ球増殖試験を用いた。いずれも刺激抗原はHCMV purified viral lysate (Advanced Biotecnologies社)を使用した。

リンパ球増殖試験ではインデックスとしてCell division index(CDI)=（抗原を入れた検体のcpm）/（抗原を入れていない検体のcpm）を用い、CDI>1.5を反応陽性と判定した。同意の得られた健常成人21名(CMV IgG陽性15名、CMV IgG陰性6名）で得られたデータをコントロールとして、この母体のCMV特異的免疫機能を評価した。

（倫理面への配慮）

すべての検体の採取・使用には、その目的を明確に説明し保護者から同意を得た。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

人工流産胎児（第2子）腹水、及び第3子から検出されたCMV-DNA解析にて、gB、gN、UL144における塩基配列が完全に一致した。IgG avidity測定では、人工流産時のindexが37.9%、その2ヶ月後で67.5%、6か月後で69.0%であった（図3)。以上の結果より、人工流産された胎児には母体のCMV初感染で垂直感染が起こり、一旦母体内で潜伏感染した同一株が、第3子妊娠中に再活性化を起こし垂直感染を起こした、あるいは母体内のCMV持続感染が原因で垂直感染したものと推定された。また母親の初感染時期は人工流産時から数ヶ月前と推定された。

母体の免疫機能に関して一般的な免疫機能を解析したが特に問題になるものは無かった（表1)。CMV特異的IFN-γ分泌細胞数は、CD4陽性細胞ではCMV陽性健常成人の平均±標準偏差が4.64±2.65（%）であるのに対し5.31（%)、CD8陽性細胞では健常成人3.39±2.21に対し3.12（%）であった。リンパ球増殖反

応では健常成人 1.57±0.61 に対し 2.30 であり、いずれの結果も CMV IgG 陽性健常成人に比較して劣るものではなかった（図 4)。

D. 考案

先天性 CMV 感染は主に CMV 抗体陰性妊婦の初感染で起こる。初感染の約 6 割では母体のみの感染で終わるが 4 割で胎児に移行し先天性 CMV 感染となる。そのうち約 1 割で症候性先天性 CMV 感染症を発症し、無症候で出生した児でも約 1 割で 1 年から 3 年のうちに感音性難聴や精神運動発達遅滞などの後発性症状を呈することが報告されている。日本では妊婦の抗体保有率は1990年頃には90%台であったが、近年では約 70%台、20 歳代では 60%台にまで低下している。従って、今後さらに妊娠中の初感染による先天性 CMV 感染症児の出生が増加してくる事が危惧される。

一方、CMV 既感染母体からも約 0.18% の確率で再感染または再活性化による先天性 CMV 感染が起こっている事が知られている。既感染母体では母体 CMV 感染における胎児への移行率は初感染に比較して低く、また先天感染が成立したとしても症候性感染の発症率は圧倒的に低い。これは母体が獲得している CMV 特異的免疫が胎児へのウイルス移行を防ぎ、また移行したとしても重篤な症状を防ぐものと考えられる。よって既感染母体からの感染でも、獲得免疫が有効に働かない異なる CMV 株の再感染に比較して、獲得免疫を得た同じ株の再活性化の方がより胎児に移行しにくく、また症候性になりにくいと考えられる。

今回我々が経験した一家系は、母体の CMV 初感染時に重篤な胎児感染が発生し人工流産に至り、第 3 子妊娠時に母体内に一旦潜伏感染した同じ株の CMV が再活性化あるいは持続感染によって胎児に移行し、さらに症候性 CMV 感染症を発症させたと考えられる。CMV 既感染母体からの症候性先天性 CMV 感染症の報告は既にあるが、本事例の第 3 子のようにはっきりと再活性化あるいは持続感染からの症候性先天性 CMV 感染症が証明され得た報告は現在までない。再活性化では症候性感染がほとんど起こらないという認識は必ずしも正しいとは限らないと考えるべきであろう。

第 3 子は出生時に IUGR や紫斑などの症状はなく、新生児パイロットスクリーニングから判明した症例である。先天性 CMV 感染スクリーニングにより、このような再活性化による症候性感染児の事例を発見することが出来た意義は大きい。しかし母体の CMV 特異的免疫能は健常成人と比較して問題ないレベルであったことから、なぜ 2 度の症候性先天性 CMV 感染症を繰り返したか知ることは興味深い。今後さらなる検討が必要である。

E. 結論

①先天性 CMV 感染パイロットマススクリーニングにて CMV 垂直感染の反復した一家族例を経験した。
②再感染は再活性化あるいは持続感染を機序に惹起されたものと考えられる。
③母体の免疫能は正常で明らかな母体要因を同定できなかった。今後の検討を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Yan H, Asanuma H, Yagyu K, Osaki M, Seiwa C, Fujieda K. Dried umbilical cords in the retrospective diagnosis of

congenital cytomegalovirus infection as a cause of developmental delays. ***Clin Infect Dis.*** (in press)

2) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. ***J Gen Virol.*** 89: 2275-2279 (2008)

3) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. ***Arch Virol.*** 153: 667-674(2008)

2. 学会発表

1) Koyano S, Inoue N, Yan H, Asanuma H, Yagyu K, Osaki M, Seiwa C, Fujieda K. Late-onset developmental delay due to congenital cytomegalovirus infection, asymptomatic in naonate. 2008 Congenital Cytomegalovirus Conference, November 5-7, 2008. Atlanta.

2) 古谷野伸、井上直樹、長森恒久：新生児期以降に発達障害が顕在化した出生時無症候性先天性サイトメガロウイルス感染症の解析、第56回日本ウイルス学会、平成20年10月26-28日、岡山

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1　家系図

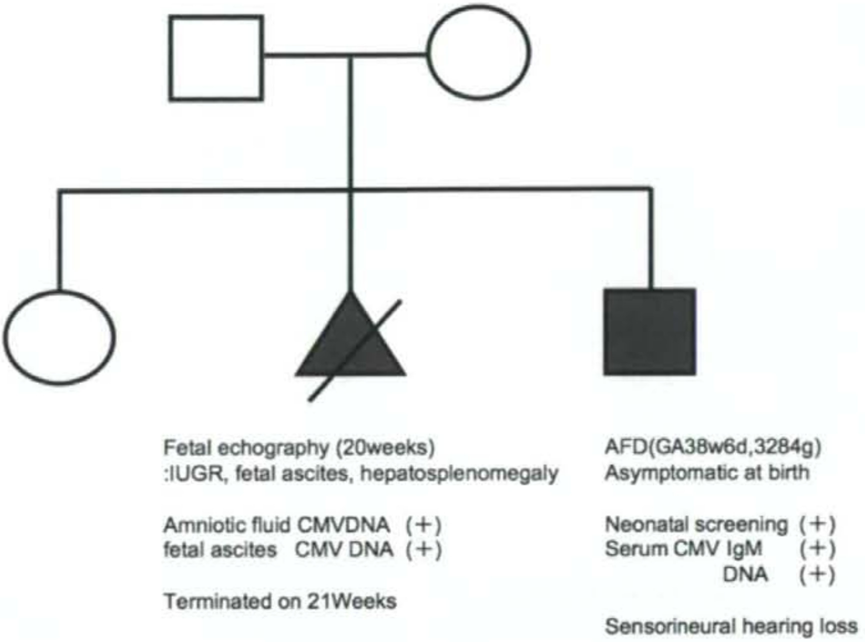


図2　第3子の聴性脳幹反応（ABR）
a) 左耳は90dBでも反応なし b) 右耳は50dBでI波からV波を確認できるが，潜時の遅れが認められる。70dBは正常反応である。

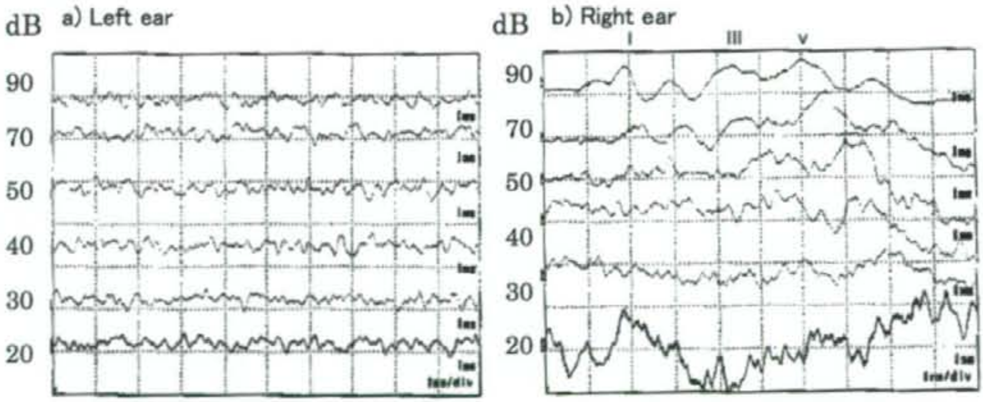


図3　母体血清 CMV IgG，IgM，IgG avidity index の推移

第2子人工流産時（37％）から3か月後にかけて（67％）急激に上昇。初感染は人工流産から数ヶ月前であったと考えられる。

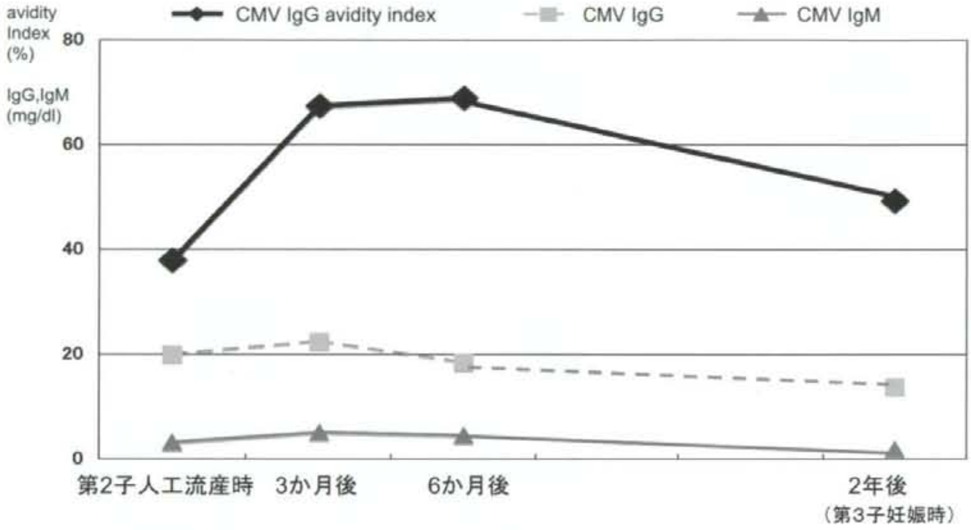
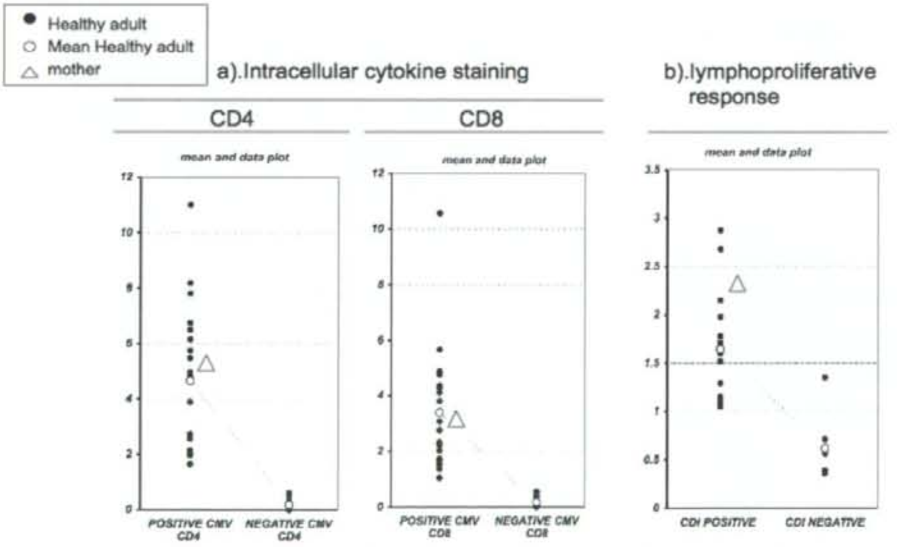


図4　母体の CMV 特異的免疫機能評価

a）細胞内サイトカイン染色，b）リンパ球増殖反応　の結果を示す（●；健康成人、○；健康成人平均値、△；患児の母）。母の値は成人コントロールと比較して問題ない。



	CMV positive	CMV negative	CMV positive	CMV negative	CMV positive	CMV negative	
健常成人	**4.64 ± 2.65**	0.18 ± 0.22	**3.39 ± 2.21**	0.16 ± 0.22	**1.57 ± 0.61**	0.61 ± 0.16	(Mean ±SD)
母	**5.31 (%)**		**3.10 (%)**		**2.30**		

表1　母体の免疫関連検査値

末梢血

WBC	6840	/μl
neut	4145	/μl
lym	2065	/μl
mono	410	/μl
RBC	465×10^4	/μl
Hb	13.3	g/dl
Ht	41.1	%
Plt	22.6×10^4	/μl

リンパ球サブセット

CD4+	36%	(743 /μl)
CD8+	44%	(923 /μl)

CD4/CD8ratio 0.8

CD20+ 4.4% (90.8 /μl)

NK細胞活性 14.7 %

免疫グロブリン

IgG	1417	mg/dl
IgM	297	mg/dl
IgA	220	mg/dl

IgG サブクラス

IgG	1782	mg/dl
IgG	2586	mg/dl
IgG	340	mg/dl
IgG	414	mg/dl

厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

保存臍帯を用いて診断した新生児期以降に発達障害が顕在化した出生児無症候性先天性サイトメガロウイルス感染症の臨床像の解析

研究分担者　古谷野　伸　　旭川医科大学小児科

【研究要旨】

【目的】先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は聴覚障害などの神経学的後遺症を起こす頻度が最も高い先天感染症である。本研究は先天性CMV感染症が発達障害の大きな原因となっていることを明らかにすると共に、その臨床像を解析することを目的とした。

【方法】原因不明の発達障害児20名を対象に、乾燥保存臍帯からDNAを抽出し、PCR法を用いてCMV DNAの検出を試みた。発達障害の程度は遠城寺式・乳幼児分析的発達検査表、新版K式発達検査、Wechsler Intelligence Scale for Children Third Edition（WISC-III）を用いて評価した。また聴力の評価は聴性脳幹反応（ABR）を用いた。

【結果】20名のうち5名の発達障害児からCMV DNAを検出し、5名の発達障害児のうち、重度2名、中等度2名、軽度1名であった。頭蓋内石灰化は4名、聴覚障害は3名に認められた。5名の発達障害児はすべて新生児期に先天感染を疑われておらず、1年以内に発達障害が顕在化した。

【考察】20名の原因不明の発達障害児のうち5名が先天性CMV感染症であることが判明し、先天性CMV感染症は原因不明の発達障害児の大きな原因となっていることが示された。聴力障害がない感染児も、後に発達障害が顕在化する例があることが明らかとなり、新生児期に先天性CMV感染を同定することは発達障害児に対する早期療育を可能にし、先天感染児への治療法策定に意義があると考えられた。

A．研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は最も多い先天感染のひとつであり、その頻度は全出生児のうちの0.3%から2.4%といわれている。そのうちのほぼ10%の感染児が出生時に点状出血、黄疸、肝脾腫、小頭症などの症状を伴っている症候性感染児である。一方、残り90%の先天性感染児は無症候性であるが、無症候性感染児の10%程度にCMV感染を原因とする聴覚障害や発達障害が遅発性に起こってくる。先天性CMV感染症によって起こる神経症状には精神遅滞、自閉症、学習障害、脳性麻痺、てんかんなどが含まれる。このような神経学的ダメージは動物モデルで不可逆的な事が証明されており、先天性CMV感染症は子どもの健康に対して重大な影響を与える疾患と言うことが出来る。

現在、後方視的な先天性サイトメガロウイルス感染症の診断は、新生児期

に採取された検体を用いて行う事が可能となっており、世界的に主な材料は先天代謝異常の検査のために新生児期に採取された濾紙血が使われている。しかし濾紙血はあくまでも先天代謝異常のスクリーニング目的に採取された検体のため、その使用には倫理的な問題もあり、すべての濾紙血を先天性サイトメガロウイルス感染症の後方視的診断に用いることは出来ない。そこで我々は日本人の誰もが出生時の記念品として持っている臍の緒を、後方視的診断の材料として使用する方法をすでに開発している。この方法を用いて我々は、重症感音性難聴患者のうち15%が、先天性サイトメガロウイルス感染症が原因であることを突き止め報告した。

現在までの先天性サイトメガロウイルス感染症により発達障害をきたした患者の臨床像の報告は限定的なものに限られている。そこで今回我々は、保存臍帯を用いた後方視的診断法を利用し、先天性サイトメガロウイルス感染症により発達障害をきたした患者の臨床像を明らかにすると共に、先天性サイトメガロウイルス感染症が発達障害の原因となる実態を明らかにする事を目的として研究を行った。

B．研究方法

＜対象患者＞

対象患者は本研究の趣旨を説明し臍帯供与の同意をいただいた、20 名の Developmental Quotient (DQ) が 70 未満の発達障害患者である。20 名は、染色体異常や出産時のトラブルなどの発達障害をきたす明らかな原因がなく、発達障害の原因は不明とされている。

＜DQ および聴覚の評価方法＞

DQ の評価は Wechsler Intelligence Scale for Children Third Edition (WISC-III)、遠城寺・乳幼児分析的発達検査表、新版 K 式発達検査を用いた。発達障害の重症度は DQ が 35 未満を重度、35 から 49 を中等度、50 から 69 を軽度、70 から 84 を境界領域、85 以上を正常とした。

聴力検査は聴性脳幹反応(ABR)で評価した。

＜臍帯からの CMV の検出＞

およそ 25mg の乾燥保存臍帯から、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) を使用し DNA を抽出した。

臍帯からの DNA 抽出液を検体として CMV UL83 を標的遺伝子としたリアルタイム PCR を行った。また患者間の CMV DNA 量を比較するため、ヒトアルブミン遺伝子も同様にリアルタイム PCR 法で定量し、CMV のコピー数を患者間で比較検討した。

＜CMV 遺伝子型の分類＞

CMV の遺伝子型は、glycoprotein B, N, O, H, UL144 の遺伝子配列をダイレクトシークエンス法で解析し決定した。

（倫理面への配慮）

すべての検体および臨床データは患者家族に文書で同意を得て収集・解析を行った。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得ている。

C．研究結果

陽性患者の臨床像（表 1）

20 名の発達障害患者のうち臍帯か

らCMV DNAが検出された患者は5名であった。すべての患者は妊娠満期で出生しており、低出生体重児はいなかった。先天性CMV感染が証明された5名の臨床像は以下の通りである。

患者1

新生児期に多呼吸、not doing wellを認め、何らかの新生児感染が疑われたため抗生剤の投与を8日間受けた。その後症状は軽快したが、生後1ヶ月時に体重増加不良と筋緊張の亢進を認め、頭部CT検査で孔脳症と側脳室前角に石灰化を認めた（図1）。6歳になった現在、重度の発達障害（DQ 22）があり、てんかんも発症している。しかし聴覚障害はない。

患者2

新生児期に聴力検査を含めて異常はなかった。しかし5ヶ月時に定頚が認められず、筋緊張が亢進し聴力障害が顕在化した。

患者3

新生児期に異常なし。定頚も4ヶ月時に認めたが、10ヶ月を過ぎてもお座りが出来なかった。1歳時に聴覚障害が明らかとなった。現在多動傾向を認め、てんかんも発症している。

患者4

新生児期に異常なし。5ヶ月で定頚を認めず、徐々に筋緊張が亢進した。また初めてのけいれんを1歳2ヶ月時におこし、現在14歳であるが重度の発達障害のため、日常生活の全面的な解除が必要である。聴覚障害も存在する。

患者5

新生児期に異常はなかったが、1歳児にお座りが出来ないということで、発達障害が明らかとなった。

ウイルス量および遺伝子型と臨床像の関係（表1）

重度発達障害患者2名（症例1, 4）の臍帯に含まれていたウイルス量は4.5x10^3, 6.5x10^3 copy/μgと他の3名よりも多かった。しかし陽性例が5名と少ないため、ウイルス量と重症度が比例するか否かの検討は出来なかった。またウイルス遺伝子型と臨床像の関係も、検出されたウイルスの遺伝型は多岐にわたっており、明らかな関係を見いだすことは出来なかった。

D. 考察

本研究で我々は、原因不明の発達障害患者20名を対象とした検討から、そのうち5名が、先天性CMV感染が原因で発達障害に至ったことを明らかにした。少人数を対象とした研究ではあるが、我々の予想以上に先天性CMV感染により障害を受けている患者が多く存在することを示す結果となった。5名全員が出生後、先天性CMV感染を疑われることなく新生児期を過ごし、中には聴力障害もなく1ヶ月以降に発達障害が顕在化した例もあることから、先天性CMV感染は新生児期以後に発達障害をきたす可能性のある疾患であることは明らかである。従ってCMVによる後発性の発達障害や聴力障害を未然に防ぐ対策として、新生児期に先天性CMV感染のスクリーニングを行う必要性が強く示唆される。

一方、我々は出生児に紫斑、肝機能異常、子宮内発育遅延などの症状のあ

る症候性 CMV 感染児 4 名の経過も追っている。しかし 4 名のうち 1 名は 4 歳になる現在まで発達障害などの後遺症は認められていない。先天感染児で発達障害などの後遺症が起こる場合と起こらない場合の臨床像の差は何に起因しているのか不明である。従って我々はまだ先天性 CMV 感染症の全貌をまったく理解していないと言わざるを得ない。スクリーニングで先天感染児を抽出し、彼らの経過を詳細に追跡して行くことで、その全貌が明らかになるものと思われる。

E．結論

新生児期無症候性の先天性サイトメガロウイルス感染が後発性の発達障害や難聴を起こしうることを本研究で明らかにした。先天性サイトメガロウイルス感染症の全体像を把握し、後発性の障害を防ぐ対策を講じるためにも、新生児マススクリーニングが重要である事が示唆された。

F．健康危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表

1) Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Yan H, Asanuma H, Yagyu K, Osaki M, Seiwa C, Fujieda K. Dried umbilical cords in the retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection as a cause of developmental delays. *Clin Infect Dis.* (in press)

2) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. *J Gen Virol.* 89: 2275-2279 (2008)

3) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M, Ushijima H, Kurane I, Inoue N. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. ***Arch Virol.*** 153: 667-674(2008)

2. 学会発表

1) Koyano S, Inoue N, Yan H., Asanuma H, Yagyu K, Osaki M, Seiwa C, Fujieda K. Late-onset developmental delay due to congenital cytomegalovirus infection, asymptomatic in naonate. 2008 Congenital Cytomegalovirus Conference, November 5-7, 2008. Atlanta.

2) 古谷野伸、井上直樹、長森恒久：新生児期以降に発達障害が顕在化した出生時無症候性先天性サイトメガロウイルス感染症の解析、第 56 回日本ウイルス学会、平成20年10月26-28日、岡山

H．知的財産権の出願・登録状況

なし

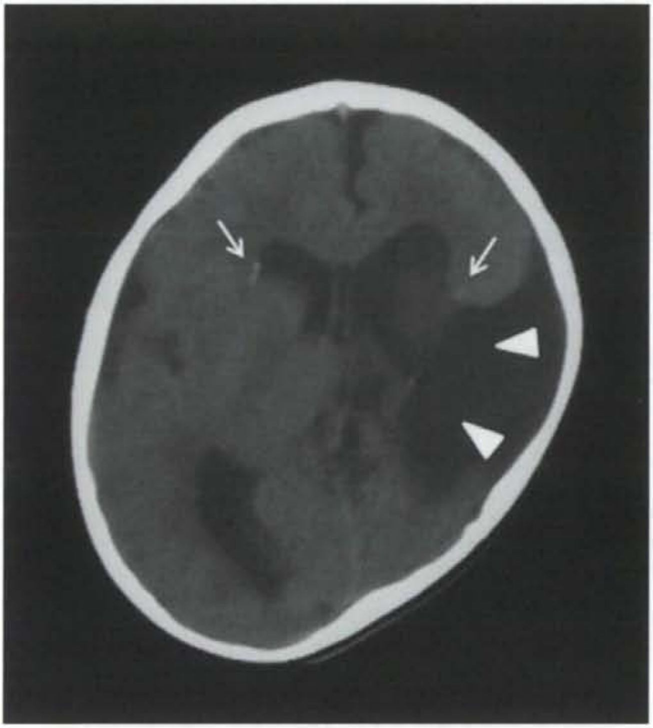
Table 1. Characteristics of late-onset developmental disability cases with congenital CMV infection.

Case no.	Sex	Developmental disability		Current age	Other findings		CMV diagnosis		CMV genotype				
		onset	severity		hearing defect	intracranial calcification	age	copy no.#	gB	gN	gO	gH	UL144
1	M	1 mo	severe	6 yr	-	+	1 yr	$4.5x10^3$	1	4c	5	2	A
2	F	5 mo	moderate	5 yr	+	+	1 yr	$1.0x10^3$	1	4b	4	1	C
3	M	10 mo	mild	4 yr	+	+	2 yr	$1.5x10^3$	3	4a	3	1	C
4	F	5 mo	severe	17 yr	+	+	14 yr	$6.5x10^3$	1	1	1a	1	B
5	F	12 mo	moderate	10 yr	-	-	7 yr	$3.2x10^2$	1	2	2b	1	A

+:present, -:absent #: CMV genome copy numbers/ g cellular DNA in dried cord specimens

図１.

The brain computed tomography of Case 1 showed porencephaly (arrowhead) and intracranial calcification (arrow) at age of 4 months.



厚生労働科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

長崎県における先天性サイトメガロウイルス感染症の実態に関する研究

研究分担者　森内　浩幸　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・小児科
研究協力者　増崎　英明　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・産婦人科
　　　　　　森内　昌子　　長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・感染免疫学

【研究要旨】
長崎県下の産科開業医の協力を得て、そこで出生した全ての新生児を対象とした前方視的なマススクリーニングを行って先天性 CMV 感染の頻度とその臨床像を明らかにすることを試みたところ、これまで検索された 712 例のうち 2 例（0.3%）に先天性 CMV 感染が証明され、うち一例は症候性、もう一例は無症候性であった。
また長崎県立聾学校の生徒を対象に、保存臍帯からの CMV DNA 検出を行うことで、両側性高度感音性難聴児における先天性 CMV 感染の関与を後方視的に調査したところ、26 例中 3 例（12%）で先天性 CMV 感染が証明された。

A．研究目的

多くの先進国では、先天性中枢神経系障害の原因として、先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染は Down 症候群に次ぐインパクトを持つと考えられているが、その疫学は社会経済的要因に大きな影響を受け地域差が顕著である。その重要性が認識されないでいる最大の要因は先天性感染児の存在が見過ごされているからであり、見過ごされている理由は感染児が出生時には無症候であるか症候性であっても非特異的であるために先天性感染の診断を下せる生後数週間の時期を過ぎてしまうからである。

従って、先天性 CMV 感染の実態を明らかにするためには、大規模な前方視的なマススクリーニングを行って全新生児の中での先天性 CMV 感染の頻度とその臨床像を明らかにすること（前方視的調査）や何らかの中枢神経系障害を有する小児において先天性 CMV 感染の関与を臍帯や先天代謝スクリーニング濾紙血検体などの材料を用いた後方視的診断法によって明らかにすること（後方視的調査）が有用であり、本研究では長崎県においてその両者を実施して、この地域における実態を解明することを目指した。

B．研究方法

1）前方視的調査（マススクリーニング）

①検体の収集：

長崎市とその近郊の 6 箇所の産科医院または病院と長崎大学医学部歯学部附属病院産科で出産された新生児で、保護者の同意を得ることができた全ての例を対象として、Nozawa ら（J Clin Microbiol 2007;45:1305）の手法に基づいて濾紙片に尿を採取した。

②スクリーニング検査および確定検査：

採取した尿は国立感染症研究所ウイルス第一部に搬送し、real-time PCR を用いたスクリーニング検査を受けた。陽性の場合は生後 3 週以内に改めて尿と血液を採取し、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染免疫学講座にて確認の real-time PCR を行うとともに、新鮮尿を国立感染症研究所ウイルス第一部に搬送しウイルス分離を行って、確定診断をした。

2）後方視的調査（臍帯検査）

① 研究対象者：

長崎県立聾学校は、聴力障害のために

特殊教育を必要とする生徒を収容する県内唯一の教育施設であり、聴力障害以外の知的または身体的障害がある場合には受入れていない。家庭に臍帯を保存しており、かつ文書での同意が得られた場合に、臍帯の一部を提供していただいた。

② 臍帯からの DNA 抽出と real-time PCR：

臍帯の一部（30 mg 前後）を検体毎に新しいブレードを使って切り出し、可能な範囲でさらに刻んだ砕片から、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出した DNA の量と質を確かめるため、tubulin 遺伝子の増幅を real-time PCR で行い、10^3 copies/µl 以上の増幅が見られた検体のみをその先の検査に用いた。CMV DNA の検出には Tanaka ら (J Med Virol 2000;60:455) の方法に従って real-time PCR を行った。

（倫理面への配慮）

前方視的マススクリーニングも後方視的調査も長崎大学医学部倫理委員会で審査され承認を受けている。研究協力者には口頭と文書で説明し、文書で同意を得ている。

C．研究結果

1）前方視的調査（マススクリーニング）

①先天性 CMV 感染の頻度：

2008 年 10 月 14 日以降 2009 年 2 月 12 日の時点までで合計 712 検体の検査が行われ、うち 2 例 (0.3%) が陽性であった。

②先天性 CMV 感染児の臨床像：

［症例 1］2008 年 12 月 26 日生まれの男児。母親は 0 妊 0 産で、接客業に携わっていたが妊娠中に特記事項なし。39 週 0 日に経膣自然分娩で出生（体重 3100 g）。新生児仮死もなく全身状態良好で、黄疸も強くなかった。マススクリーニング陽性を受けて生後 2 週 5 日に受診し、同日の尿と血液より CMV DNA を検出し確定診断を受けた。理学的に異常なく、聴力スクリーニングは両側とも pass、頭部 MRI にも異常所見なし。CMV IgM は陰性。血液検査では貧血や血小板減少はなく、肝機能も正常だったが、好中球減少（ANC 460）を認めた。好中球数は最低 360/µl まで減少したが、生後 52 日の時点でウイルス血症の消失とともに好中球数は正常化した。

［症例 2］2009 年 1 月 2 日生まれの男児。母親は主婦で 0 妊 0 産。34 週時の胎児エコーで両側脳室拡大が認められた。37 週 4 日の妊婦検診で高血圧と蛋白尿が指摘され長崎大学病院産科に入院。38 週 0 日に経膣自然分娩で出生。Apgar score 8/8。身長 43.5 cm、体重 2080 g、頭囲 29.5 cm であり、symmetrical IUGR と判定。出生後しばらくは呼吸障害が認められ酸素投与を要した。血小板数が 3~8 千程度に減少していた。他の血球数や肝機能は正常。生後 1 週以内の凍結保存尿をマススクリーニング用に供し陽性所見を得た。確認試験でも陽性で、CMV-IgM も陽性だった。聴力検査は、左 30 dB/右 80 dB と左右差のある難聴を認めた。頭部 MRI では、両側脳室拡大、白質のびまん性対称性の T1W1 低信号/T2W1 高信号、小脳半球低形成を認めた。生後 42 日の時点でウイルス血症は持続している。

2）後方視的調査（臍帯検査）

①両側性高度感音性難聴児における先天性 CMV 感染の頻度：

PCR 検査に供することができた 26 例のうち、3 例（12%）で CMV DNA が臍帯から検出され、先天性 CMV 感染が確定した。

②先天性 CMV 感染を伴う難聴児の臨床的特徴：

3 名とも今回の調査の結果が出るまでは先天性 CMV 感染が疑われたことはなかった。出生時に特に医学的に注意を払われることはなかったが、3 例中 2 例は子宮内発育遅滞（IUGR）が認められており、1 例では母親が妊娠中に無菌性髄膜炎に罹患している。3 例とも難聴の家族歴はない。3 例中 2 例では聴力の左右差が著しく、1 例は発症に気付かれたのが 10 歳と

非常に遅く、2 例では診断がついた後もさらに聴力障害が進行した。これらの特徴はCMVの関与がなかった23例とは対照的であった（表）。(Tagawa ら、投稿中)

D. 考察

1）前方視的調査（マススクリーニング）

2001~03 年に長崎県下の産科医院の協力を得て妊婦の血清学的調査を行ったところ、339 名の妊婦のうち 293 名 (87.3%) が CMV-IgG 陽性（既感染）であった。妊娠初期と後期のペアで検索できた 267 名のうち、妊娠中の seroconversion が 2 例、IgM 陽性かつ IgG avidity 低値を示したものが 2 例であり、妊娠中の初感染は 0.74~1.5%と推測された（Tagawa ら、投稿中）。過去の報告に基づき妊婦の初感染の 40%に胎内感染が生じると考えると、0.3~0.6%の確率で先天性 CMV 感染児が生まれることが予想された。

今回のマススクリーニング調査の途中経過では、その予想値の中では低い方（0.3%）の頻度で先天性 CMV 感染が見つかっている。今回の調査において考慮すべき点は、正常分娩を扱う産科開業医を対象としており、何らかの異常があるために開業医の元を離れる症例の中に先天性 CMV 感染児が含まれているのではないかということである。これらの開業医からの紹介先である大学病院産科にも検体提供をお願いしているが、残念ながら全例から協力を得られている訳ではない。また大学附属病院以外にも紹介先が有る点も考慮しなければならない。ただし、先天性 CMV 感染の約 9 割は出生時には無症候性であることを考えると、見落としの症例があるとしても全体のごく一部であるかも知れない。

今回私達が見出した 2 例のうち、一例は典型的な先天性 CMV 感染の特徴（symmetrical IUGR、脳室拡大、難聴、血小板減少、CMV IgM 陽性）を有しており、もう一例は無症候性で CMV IgM も陰性だった。しかし無症候性の一例も検査上ではウイルス血症が存在していた間に原因不明の好中球減少を認めており、おそらく CMV 感染によるものだと思われる。無症候性の例であっても、詳しい検索を行うと何らかの異常を呈することは多いのかも知れない。

2) 後方視的調査（臍帯診断）

出生時に無症候性であった先天性 CMV 感染児の約 1 割程度に遅発性に現れるとされる徴候のうち、最も重要なものの一つは感音性難聴である。欧米では両側高度感音性難聴の 20%以上は先天性 CMV 感染によるものと考えられているが、本邦においては最近 Ogawa ら(J Infect Dis 2007;195:782)が難聴児(その多くは精神発達遅滞やてんかんなどの障害を合併している）の後方視的調査を私達と同様の手法で行い、15%に先天性 CMV 感染を証明している。今回私達は難聴のみで他の障害はない小児を対象としたが、ほぼ同様の結果（12%）を得たことから、この辺りの頻度が本邦の実態であるのかも知れない。

先天性 CMV 感染に伴った難聴の特徴として以前から指摘されている遅発性、進行性、左右不均衡などの特徴は、今回私達が後方視的に診断した症例でも多く認められており、診断の手がかりになるものと思われる。

E. 結論

全ての新生児を対象とした前方視的なマススクリーニングは、先天性 CMV 感染の実態を明らかにする上で最良の手段であるだけでなく、感染児に最適なケアを行うことへと繋げることができる。また既に何らかの障害を有する小児に対して、後方視的に先天性 CMV 感染を診断することによって、特定の障害の成因の中に先天性 CMV 感染が占める割合を推定することができる。これら両者の調査を併行させることで先天性 CMV 感染の実態（頻度と臨床的なインパクト）を解明することが、これによる健康被害を防ぐために不