

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 泰地秀信：純音聴力検査とマスキング. JOHNS 24: 709-713, 2008
- 2) 泰地秀信：乳幼児難聴の取り扱いについて. 日本耳鼻咽喉科学会第22回専門医講習会テキスト p112-116, 2008
- 3) 泰地秀信、守本倫子、南修司郎：新生児聴覚スクリーニング偽陰性例についての検討. 小児耳鼻咽喉科 30, 2009(in press)

2. 学会発表

- 1) 泰地秀信：新生児聴覚スクリーニングでpassとなった先天性難聴についての検討. 日本小児耳鼻咽喉科学会, 2008. 6. 21 (鹿児島)
- 2) 泰地秀信：福祉医療と関連法規. 日本耳鼻咽喉科学会・補聴器相談医更新のための講習会, 2008. 6. 28 (東京)
- 3) 泰地秀信、守本倫子、南修司郎：Auditory neuropathyの乳幼児における聴性定常反応(ASSR). 第53回日本聴覚医学会, 2008. 10. 3 (東京)
- 4) 松永達雄、守本倫子、泰地秀信：小児

難聴に対する系統的遺伝子解析の第一次解析の検討. 第53回日本聴覚医学会, 2008. 10. 3 (東京)

- 5) 泰地秀信：小児難聴の精密検査. 日本耳鼻咽喉科学会第22回専門医講習会, 2008. 11. 16 (東京)
- 6) 泰地秀信：福祉医療と相談. 日本耳鼻咽喉科学会補聴器相談医講習会, 2009. 1. 18 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

図1 症例1、初診時の ASSR

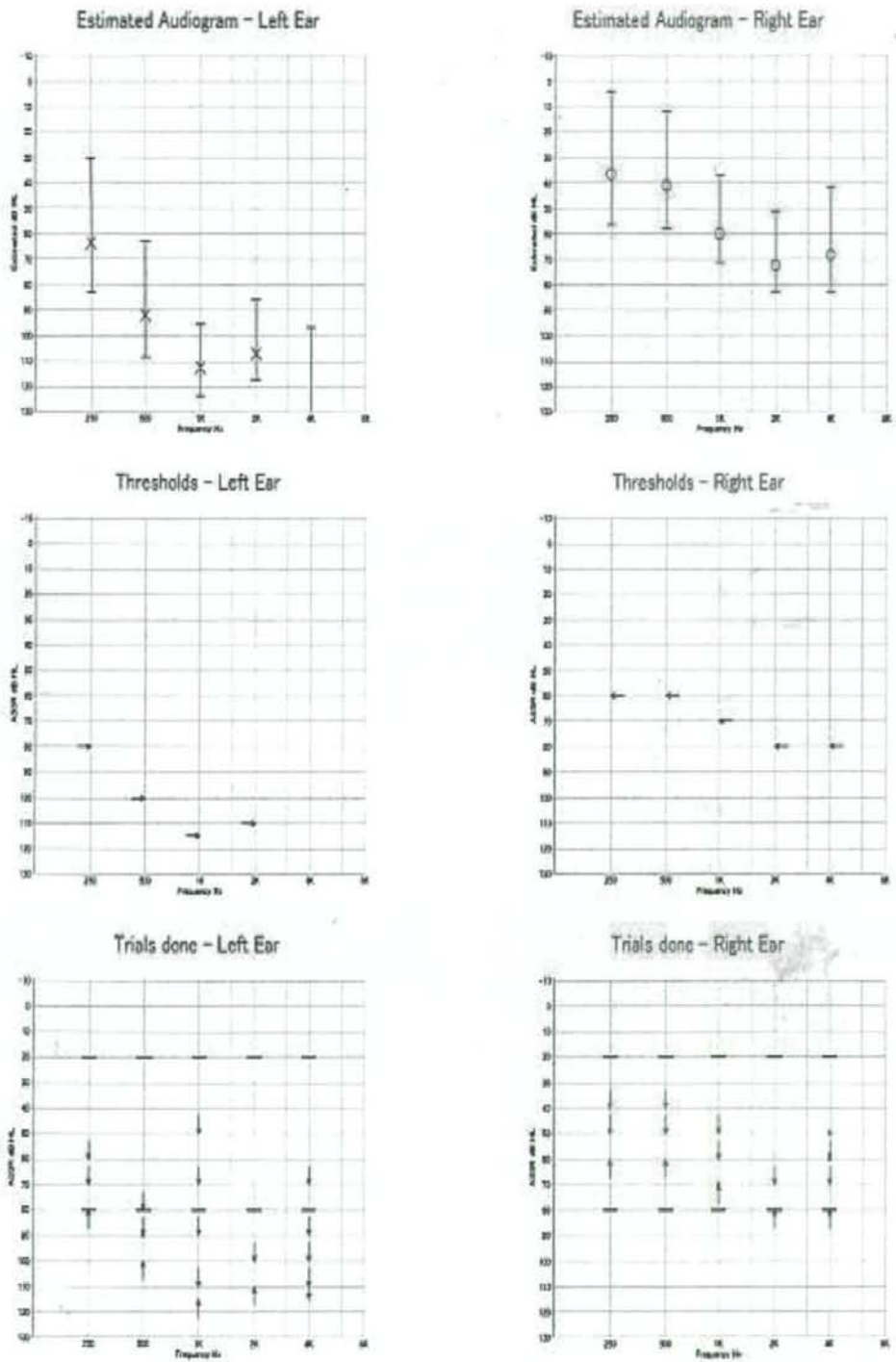


図2 症例1、月齢6カ月のCOR

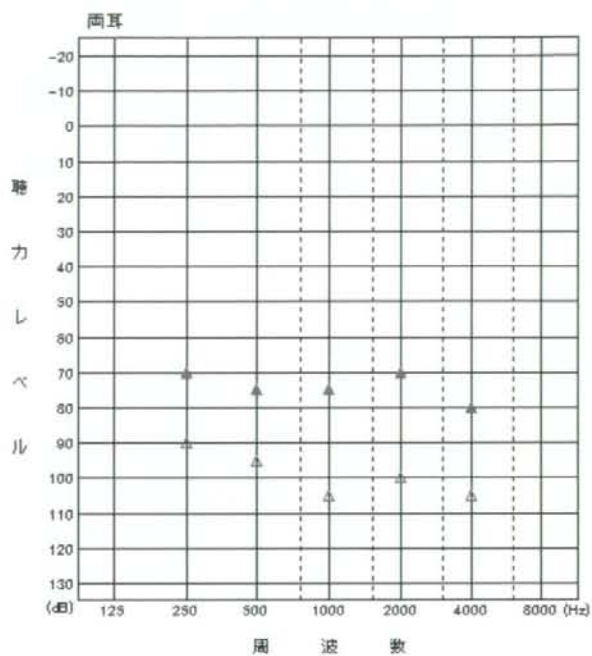


図3 症例1、月齢1歳6カ月のCOR

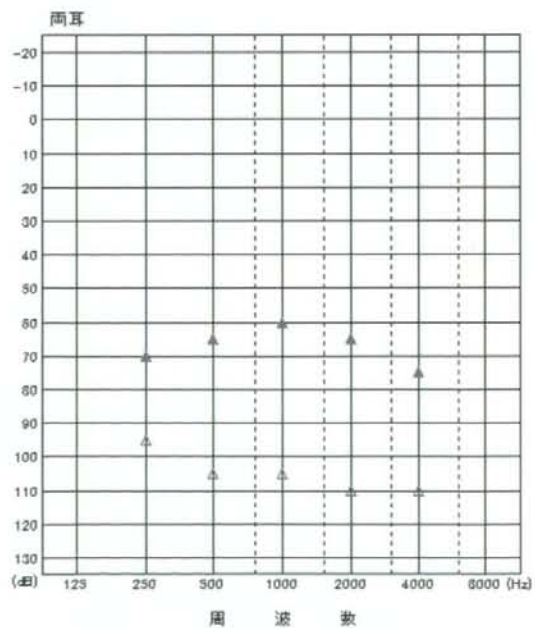


図4 症例1、1歳7カ月のASSR

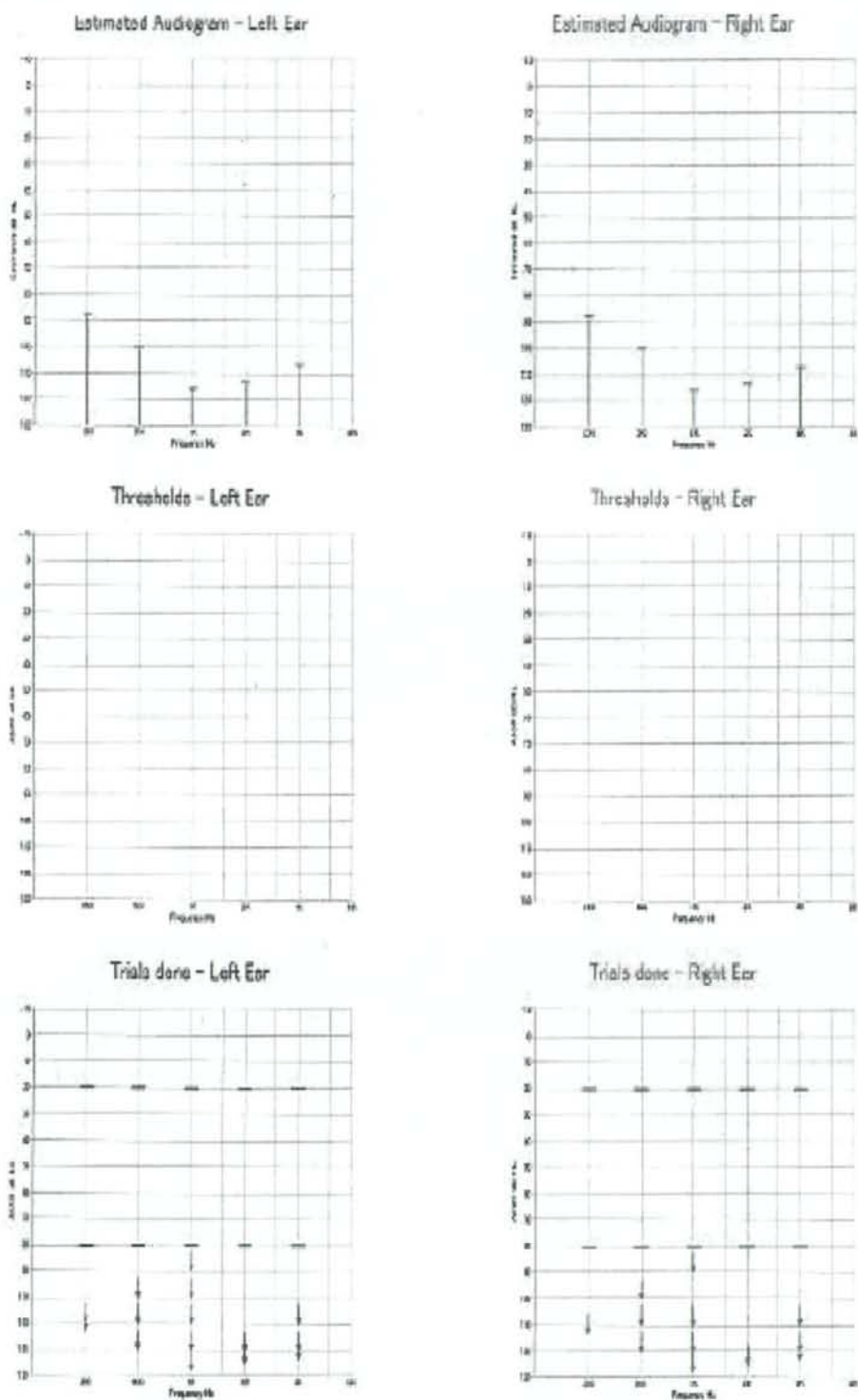


図5 症例3、日齢6の左ABR
閾値は80dB

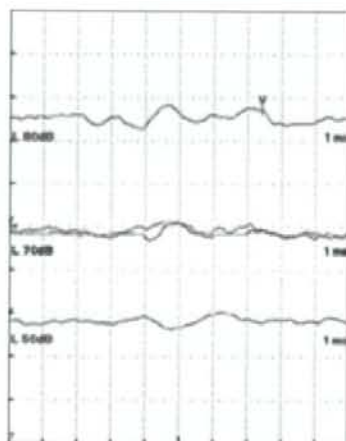
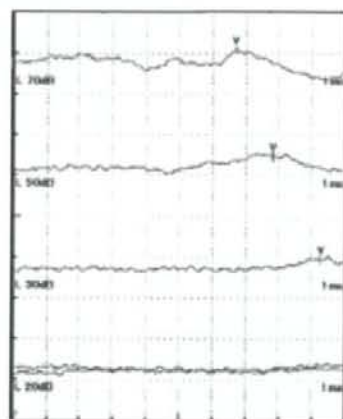


図6 症例3、日齢81の左ABR
閾値は30dB



先天性サイトメガロウイルス感染症と聴力障害の経過

研究分担者	坂田 英明	目白大学言語聴覚学科
研究協力者	安達のどか	埼玉県立小児医療センター耳鼻咽喉科
	荒井 孝	埼玉県立小児医療センター検査部
	藤田 英寿	愛和病院小児科

【研究要旨】

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は胎内感染の中で最も頻度が高い。難聴は、1000人に2人から3人の割合で発生するとされているが原因不明が多く、言語獲得の点から早期発見がきわめて重要である。正常分娩による先天性CMV感染症の発生率と、NHS後に要再検査となって受診した症例での先天性CMV感染症の発生率、聴覚障害の発生率、その後の聴覚障害の経過について検討した結果、CMV感染症は高率に発生していると考えられた。また、聴覚障害については、治療が可能な場合もあること、聴力が変動すること、聴覚障害後のコミュニケーション手段は様々であることが認識された。今後さらにCMV感染症による発生率を検討し、同時に難聴の発生率を調査し、発達評価とあわせ経過観察することはきわめて有意義であると考えられる。

A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は胎内感染のなかでもっとも頻度が高いと言われているが、全体の約90%は不顕性でありほとんどが気付かれない。早期発見されれば症候性については治療されてきたが効果の評価が難しかった。しかしCMV感染症の聴覚障害については、早期発見がされれば抗ウイルス剤による治療が可能なこともある。

一般に難聴は、1000人に2人から3人の割合で発生するとされているが原因

不明が多く、言語獲得や人格形成の点から早期発見がきわめて重要である。以前よりCMV感染症による先天性難聴の発生は指摘されていたが詳細な検討はなく聴覚障害の経過についても不明な点が多かった。海外の報告では先天性難聴の約3割がCMV感染症によるとされている。

日本において2000年に始まった新生児を対象とした新生児聴覚スクリーニング（NHS）は、現在約7割の受診率となっている。

そこで本研究では、正常分娩による先

天性 CMV 感染症の発生率と、NHS 後に要再検査となって受診した症例での先天性 CMV 感染症の発生率、聴覚障害の発生率、その後の聴覚障害の経過について検討することを目的とする。

B. 研究方法

対象 1 は、正常分娩による先天性 CMV 感染症の発生率についてである。埼玉県産科愛和病院にて親権者の同意が得られた 461 名の新生児に対して先天性 CMV 感染症の検査を行った。期間は、2008 年 12 月の開始より 2009 年 2 月までの 3 ヶ月間である。

対象 2 は、2006 年 1 月から 2007 年 9 月までに正常分娩後産科で行った新生児聴覚スクリーニング後により要再検となった症例に対し、親権者の同意が得られ先天性 CMV 感染症検査を実施した 245 例である。CMV 検査後、難聴の確定診断により聴覚障害の経過観察を行った。

CMV 検査は PCR 法 (real time 法) で行った。初診が生後 3 週以内に受診した場合は尿から施行した (尿パックをあて約 0.5cc 採取)。初診が生後 3 週以降の場合は、後天性感染も考慮しなければならないためガスリー検査時の乾燥濾紙に付着した乾燥血液を用い検査した。しかし、里帰り出産などで埼玉県以外の産科で出産した場合は出産した産科に問い合わせ可能な限り乾燥濾紙を取り寄せた。先天性代謝異常検査で使った乾燥濾紙が残存していない場合は、両親に臍帯保存の有無を聞き、保存している場合は臍帯に付着する乾燥血液を使用し CMV の DNA を

検査した。

耳鼻科初診時、難聴の確定診断についてはまず顕微鏡下に耳垢や中耳炎の存在を確認し、原則睡眠導入剤服薬下に気導 ABR 検査を施行した。気導 ABR はクリック刺激とトーンバースト 500Hz も同時に行った。睡眠導入剤はトリクロロエチルシロップ、あるいはラボナ、エスクレ座薬を適宜組み合わせ使用した。

外耳所見として、耳垢のある場合は除去、中耳所見のある場合は CT、骨導 ABR または骨導 ASSR を追加し伝音難聴か感音難聴かを鑑別した。

CMV 検査陽性で ABR 検査で両側高度感音難聴と診断された症例に対しては、入院管理とし抗ウイルス剤を原則 6 週間、体重あたり 12mg を一日投与量とし点滴投与した。

聴力障害の経過については療育を行いながら ABR を中心に行い、コミュニケーション手段を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究のすべてにおける検査および治療は、倫理委員会の審議によりなされ、書面および口頭にて十分な説明を行い被検者の代理人により事前の同意が得られるもののみとした。

C. 研究結果

愛和病院産科にて出産した 461 名の新生児に対して行われた先天性 CMV 感染症の検査において 3 名 (0.65%) が陽性であった。

聴力については 3 名とも両側正常であ

り現在3ヵ月毎に経過観察としている。

CMV検査を施行した245例の内訳は、初診が生後3週間以内で尿中PCR法により検査したのが115例(46.9%)、初診が生後3週間以降でガスリー検査用の乾燥濾紙が残存しており使用したのが98例(40.0%)、臍帯を使用したのが32例(13.1%)であった。すべてのCMV検査の結果CMV陽性例は245例中15例(6.1%)であった。そのうち13例(86.6%)は難聴であった。CMV検査は陽性であったが聴力正常だったのは2例であり、この症例はその後の難聴の出現の可能性があり得るので3ヶ月毎の厳重経過観察とした。

CMV検査陽性で聴力異常だった13例に対する治療効果は1例で著明改善、2例で改善、7例で不変、3例で悪化がみられた。3例の悪化症例は、ウイルス量の経過から治療にともなって悪化したというより先天性CMV感染症そのものによるものと考えられた。

経過観察した難聴13例のコミュニケーション手段は、人工内耳3例、補聴器7例、片側難聴経過観察3例であった。

D. 考察

CMV感染症は従来からよく知られており、産科や小児科領域の日常臨床では極めて一般的である。さらに先天性難聴の関係についても多くの報告がされている。しかし、そのほとんどが不顕性感染であり、明らかな所見や症候がない場合は、いつどのようにCMV感染症を診断するか困難であった。

また、NHSが普及してまもなく自動ABR

やOAEでパスになったにもかかわらず、後に難聴が発見された症例が多数認められた。OAEで検査した場合の後迷路性難聴は別として、当時はスクリーニング機器の偽陰性ではないか、原因不明の進行性難聴ではないかなどと考えられていた。

聴力が徐々に悪化する後天性難聴の原因としては、先天性CMV感染症のほかに、肺高血圧や前庭水管拡大症があるが、早期発見と経過観察がきわめて重要であることが改めて認識された。

今回、愛和病院産科にて先天性CMV感染症検査を受けた新生児0.65%がCMV感染陽性であったことによりCMV感染症が少なくない疾患であることが証明された。今後、現在行われているNHSとCMV感染症検査を有効に組み合わせ、全新生児への有効なスクリーニングをどう行うかが課題の一つである。

また、CMV感染の合併症や難聴の発生などで問題となるのは先天性感染の場合であり、後天性感染との鑑別が重要となる。先天性感染か否かは受診時期によって検査方法が異なると考えられる。今回われわれは、初診時が生後3週間以内の場合は比較的感度がよく簡易である尿を用いCMVのDNAをPCR法で行った。生後3週間以降の場合に尿を使用すると後天性感染との鑑別が困難となるため、ガスリー検査での乾燥濾紙に付着した乾燥血液を使用した。乾燥濾紙が残存していない場合は臍帯に付着した乾燥血液を使用した。今回の検討では53.1%が乾燥濾紙に付着した乾燥血液か臍帯に付着した乾燥血液を使用した。尿中PCR法の方が感度が高く検

査が容易であることもあり、今後は生後3週以内の受診を産科に啓蒙するなどの対策が必要である。

CMV陽性例は86.6%で難聴が合併しており直ちに治療を開始した。CMV陽性で難聴がなかった症例の嚴重な経過観察は重要である。

CMV感染症で難聴を合併した症例への治療についての報告は、抗ウイルス剤であるガンシクロビルが開発されて以来増加している。しかし、これらはCMV感染を疑わせる所見がありたまたま難聴も合併していたため治療したという報告である。本来不顕性感染がほとんどであるCMV感染ではいかに多くの症例をスクリーニングしNHSとからめ治療対象とするかが重要となる。

聴力障害後の療育はもっとも重要な課題である。療育は生後約2ヶ月頃より開始される。基本は健全な母子関係の構築である。これはホームトレーニングや音楽療法などで行われる。コミュニケーション手段についてはイヤーマールドの採取可能な月齢すなわち生後約4、5ヶ月でまず補聴器装用を開始した。補聴器の効果が乏しく、人工内耳適応基準を満たしていた症例については、手術を施行した。

今後は人工内耳の適応決定の際、先天性CMV感染症による脳の発達への影響を人工内耳手術時期である2歳頃にどこまで術前に診断できるかがきわめて重要となる。

2006年は日本で約106万人が出生しており、今回のCMV陽性率割合の0.65%をあ

てはめるとCMV感染症は年間約68900人となる。また、NHS後要再検となった0.29%をあてはめると感音難聴は約3074人となる。このなかで先天性感音難聴のCMVが原因である割合27.1%をあてはめると先天性CMV感染により感音難聴は年間約667人となりこれらの症例が治療対象となる。

現在日本人や欧米での抗CMV抗体保有率が以前に比べ急速に低下していることを考えれば、妊娠中に感染することは十分考慮しなければならず、今後全新生児を対象としたCMV感染症検査のスクリーニングとしての有用性が議論されると考えられる。

E. 結論

今回の検討によりCMV感染症は高率に発生している可能性が示唆された。また、聴覚障害については、治療が可能な場合もあること、聴力が変動すること、聴覚障害後のコミュニケーション手段は様々であることが認識された。

今後さらにCMV感染症による発生率を検討し、同時に難聴の発生率を調査し、発達評価とあわせ経過観察することはきわめて有意義であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 坂田明、安達のどか、安達正時、大

石勉、加我君孝：先天性サイトメガロウイルス感染症検査とその後の治療成績について（第二報）、第109回日本耳鼻咽喉科学会、平成20年5月15-17日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

サイトメガロウイルス感染による聴覚障害マウスモデルの作成

研究分担者 錫谷 達夫 福島県立医科大学微生物学講座
研究協力者 生田 和史 福島県立医科大学微生物学講座

【研究要旨】

先天性サイトメガロウイルス感染は日本人の聴覚障害の原因の15%を占める。しかし、臨床材料が得られないため、どのように聴覚障害が起こるのか、10~20%の感染者にのみこの障害が発生するのはなぜなのか、など不明な点が多い。そこで本研究では、マウスサイトメガロウイルスを用い、マウスで高率に聴覚障害を来すモデルの作成を行った。生後24時間以内に50%致死量のウイルスを脳内接種すると6週までに全例聴覚障害を発症し、両側性の高度難聴となることが解った。腹腔投与では4%のマウスにしか聴覚障害は起こらなかった。これまで100%聴覚障害を来す動物実験モデルはないことから、本モデルは新たな聴覚障害発症モデルとして有用であると考えられる。

A. 研究目的

20世紀初頭より多臓器の障害によって死亡した胎児、新生児の病理学的な解析が進められた。その原因としてサイトメガロウイルス(Cytomagalovirus; CMV)が分離され、病因が明らかにされたのは実に半世紀以上たった1957年のことである。

その後、このウイルスが胎児に感染する先天性CMV感染は出産100~400に1例存在する頻度の高いもので、日本人でも300例に1例程度存在することが明らかにされた。しかし、その中で出生時に障害が認められ、先天性CMV感染症と診断される例は10%以下であり、そのほかの例は不顕性感染として放置されてきた。ところが1990年代から、出生時に異常が認められない無症候性感染例の中に、後に聴覚障害を来す例があることが相次いで報告されるようになってきた。我々も2004~2006年度に厚生労働科学研究費補助金・感覚器障害研究事業の補助を受け、福島県内の聴覚障害児を調べた結果、日本人の聴覚障害のおよそ15%は先天性CMV感染が原因となっている

ことが明らかとなった。

以上の研究から、先天性CMV感染は聴覚障害の原因として1~2位の頻度を占める疾患であることが明らかにされたが、どのようなメカニズムで聴覚障害が起こるのか、先天性CMV感染者の中の10~20%のヒトにのみ聴覚障害が起こるのはなぜなのかなど、本疾患の治療や予防を考えていくうえで明らかにされなければならない問題は多々残されている。これらの問題解決に病態の解明は急務であるが、生検材料が取れない疾患であるため研究は進んでいない。そこで本研究では、聴覚障害発症のメカニズムを明らかにするためにマウスCMV(MCMV)を用いた聴覚障害モデルを作成した。

B. 研究方法

1. 細胞とウイルス

マウスCMV(MCMV)Smith株は浜松医科大学・筒井祥博博士より分与を受けた。ウイルスの培養は理化学研究所細胞バンクより提供を受けたBalb 3T3細胞によって行った。Balb 3T3細胞は10%牛血清加 Dulbecco modified Eagle minimum

essential medium (D-MEM/NCS10) で培養した。この細胞に MCMV を感染させ、CPE が 100% となった時に培地を回収し、3000 rpm 10 分遠心した。その上清をウイルス液として分注し、 -80°C に保存した。

2. マウスの感染実験

実験には出生後 24 時間以内の Balb/c マウスをオス、メス区別せずに用いた。ウイルスのタイターは血清を添加しない D-MEM で調整し、マウスの脳内あるいは腹腔内にマイクロシリンジと 2 段針を用いて $3\ \mu\text{l}$ 接種した。脳内接種は右耳と頭頂部を結んだ線に行った。接種後 1 日以内に死亡したマウスは感染による死亡とは考えられないため、実験からは除外した。2 日目以降 6 週まで毎日生死を観察し、生存曲線を描いた。

3. マウスの聴覚検査

ウイルス接種後 3 週、4 週、6 週の時点で聴覚検査を行った。

聴覚検査は電磁波の影響を最小限に止めるために金網でシールドされた聴力検査室で行った。生理食塩水 19.1 ml にセロクター 0.1 ml、ネプター 3 ml 加えた麻酔薬をマウスの腹腔に体重 100g あたり 0.6 ml 投与して麻酔を施した。ABR 検査は Tucker Davis 社製の機器を用い、両側耳介付着部に針電極を、腹部に接地電極を刺入した。刺激音発生装置 (Powerlab; ADInstruments 社製) とスピーカー (Tucker Davis 社製) を用い、20,000 Hz の tone burst を音刺激として与えた。この刺激に対する ABR を計測し、聴覚を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は文部科学省の指針を基盤とした福島県立医科大学動物実験指針を遵守し、動物実験指針の承諾を得て行った。

C. 研究結果

1. Smith 株の新生 Balb/c マウスに対病

原性マウスの感染実験を行うに当たって、培養細胞で増殖させた Smith 株の病原性を明らかにする必要から、生後 24 時間以内のマウスにウイルスを脳内接種または腹腔内接種し、生存曲線を求めた (図 1)。腹腔接種では 1.7×10^3 で約 40% の、 1.7×10^2 で 50% のマウスが生き残り、感染 3 週間までに死ぬものはほとんど死亡した。一方、脳内接種では腹腔内接種のほぼ 10 分の 1 のウイルス量でマウスは死亡し、 1.7×10^2 での生存率が約 35% であった。また死亡するものの多くは感染 1~2 週で死亡した。

2. マウスの聴覚検査

およそ半数のマウスが死滅するウイルス量を接種し、生き残ったマウスの聴覚を継時的に検査した。つまり、腹腔投与は 1.7×10^3 pfu/mouse、脳内接種は 1.7×10^2 pfu/mouse である。生後 2 週まではマウスが小さすぎて検査が行えなかった。3 週以降の聴覚障害の程度と頻度は表 2 のとおりである。腹腔内接種では 23 匹中 1 匹にのみ感染後 6 週の検査で両側性の高度難聴が認められた。一方、脳内接種の系では 3 週目の段階で 1/3 が両側性の、1/3 が片側性の難聴があり、残り 1/3 は健聴であった。この難聴は進行し、6 週までに全例両側性の高度難聴となった。

D. 考察

これまで、MCMV やモルモットの CMV を用いた感染実験系で聴覚障害を作るモデルは報告されている。ただ、100% の確率で聴覚障害を引き起こす実験系は本研究が初めてであり、今後の研究に有用なモデルになると期待される。

CMV はマクロファージやリンパ球など血液の細胞に感染することから、血管条から蝸牛回に入るとウイルスが侵入し、有毛細胞など聴覚に関与する末梢の部位を障害して聴覚障害を引き起こすのではないかと考えられてきた。ところが、モルモットの経胎盤感染の系を用いた研究で、感

染した胎児の病理組織ではウイルスは前庭回や螺旋神経節に存在することが明らかとなった。前庭回を満たす液が髄液であることを考えると、髄膜脳炎を起こしたウイルスが内耳に入ることが強く示唆される。マウスのサイトメガロウイルスを腹腔に接種後、LPSで脳炎を起こすと、炎症部位にウイルスが集まり、聴覚障害を引き起こすことを証明した小杉らの研究結果も髄液から内耳へのウイルスの波及を支持するものである。

先天性CMV感染による聴覚障害が人工内耳で治療できることは臨床例で明らかとなっている。動物実験でウイルスの感染部位が螺旋神経節であるとの結果が示されているが、もし螺旋神経節でウイルスが神経細胞の機能を完全に障害した場合、人工内耳は無効なはずである。人工内耳が有効な螺旋神経節の障害がいかなる障害であるのかは興味深い課題である。今後、本研究で作成したマウスの感染系を用いて明らかにしていきたい。

E. 結論

MCMVを生後24時間以内のマウスに脳内接種し、100%のマウスに両側性の高度聴覚障害を発症させるモデルが出来た。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Yamaguchi O, Toma H, Tanabe K, Suzutani T. Strain-specific seroepidemiology and reinfection of cytomegalovirus. *Microbes Infect* 10:1363-1369, 2008
- 2) Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani S, 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) Fukushima E, Ishibashi K, Kaneko H, Nishimura H, Inoue N, Tokumoto T, Tanabe K, Ishioka K, Ogawa H, Suzutani T. Identification of a highly conserved region in the human cytomegalovirus glycoprotein H gene and design of molecular diagnostic methods targeting the region. *J Virol Methods* 151: 55-60, 2008.
- 4) 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.
- 5) 錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感染による難聴. 医学のあゆみ 227:1086-1087, 2008.
- 6) 錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感染と難聴. 耳鼻咽喉科学会専門医通信. 96: 14-15, 2008.
- 7) 錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感染と聴覚障害. 第14回ヘルペス感染症フォーラム 95-98, 2008.

2. 学会発表

なし

3. 特別講演

- 1) 錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感染症と聴覚障害. 第11回熊本ウイルス感染症研究会 2008年10月16日 熊本市
- 2) 錫谷達夫. 先天性サイトメガロウイルス感染による聴覚障害 第20回岡山耳鼻咽喉科感染免疫研究会 2009年2月19日 岡山市

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

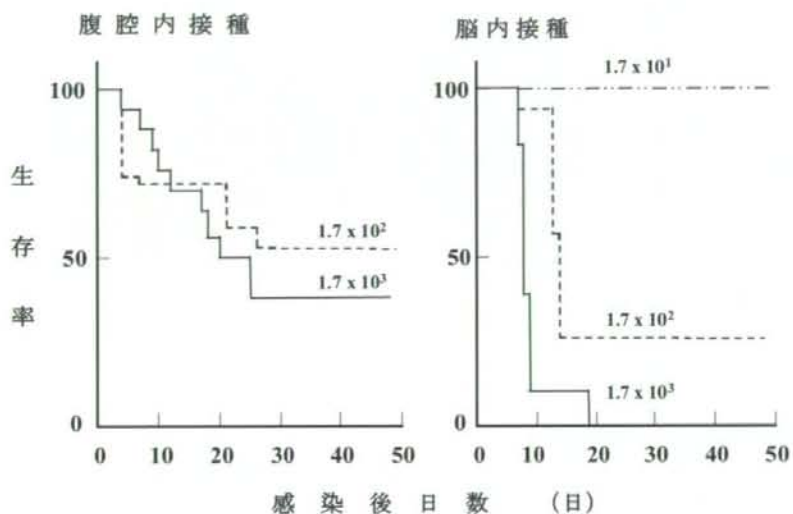


図1. マウスサイトメガロウイルスの病原性

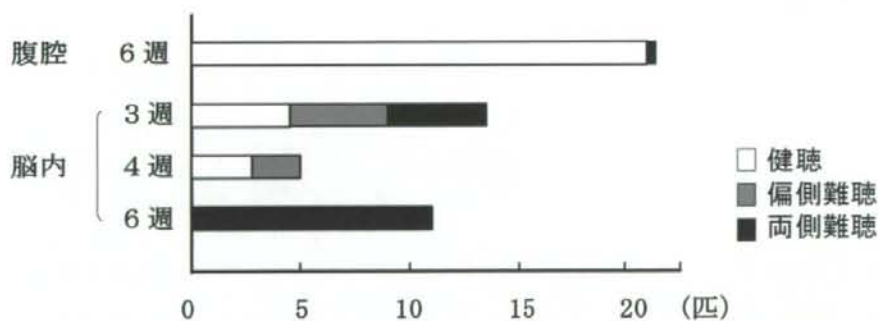


図2. サイトメガロウイルス感染による聴覚障害

先天性感染児の臨床像に関与する免疫学的要因の検討

研究分担者 藤原 成悦 国立成育医療センター研究所母児感染研究部

【研究要旨】

先天性 CMV 感染症児における CMV 特異的免疫応答の特長については不明な点が多い。また、先天性 CMV 感染児にみられる臨床経過の差異と CMV 特異的免疫応答との関連性についても未だ不明である。本研究は、先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の特徴を明らかにするとともに、先天性 CMV 感染児における臨床経過の差異と CMV 特異的免疫応答との関連性を明らかにするための基礎的データを蓄積することを目的とする。

本年度は、先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答を解析することを目的として、HLA タイピング、MHC tetramer を用いた CMV 特異的免疫細胞の検出・定量、CMV 抗原刺激による IFN- γ 産生細胞の検出・定量に関する実験方法を確立した後、先天性 CMV 感染症児 4 例について、CMV 特異的免疫応答に関する解析を行った。さらに、血液検体の保存条件が解析結果に及ぼす影響についても検討した。その結果、先天性 CMV 感染児において、CMV 抗原を認識する CMV 特異的免疫細胞が存在すること、CMV 特異的免疫細胞は、CMV 抗原に応答し細胞増殖能および IFN- γ 産生能などの機能を保持している可能性が示唆された。

A. 研究目的

先天性 CMV 感染症における病態形成には、ウイルス側の要因に加えて宿主側の要因が複雑に関与していると考えられるが、その詳細は不明である。

本研究は、先天性 CMV 感染症の宿主側の要因として重要と考えられる CMV 特異的免疫応答の特徴を明らかにするとともに、先天性 CMV 感染児にみられる症候性・無症候性・遅発性発症といった臨床経過の差異と CMV 特異的免疫応答との関連性を明らかにする上での基礎的データを蓄積することを目的とする。先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の特徴を明らかにすることは、先天性 CMV 感染症の病態を解明するとともに、先天性 CMV 感染児の臨床経過の予測や早期診断・早期介入などの指標を確立するという観点からも重要と考えられる。

平成 20 年度は、以下の研究計画に基づき研究を行った。

(1) CMV 特異的免疫応答を解析するための実験系を確立する。

(2) 先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の解析を開始する。

B. 研究内容

1) HLA (Human leukocyte antigen) のタイピング

<方法>

先天性 CMV 感染児より採取した末梢血よりゲノム DNA を抽出し、HLA-A、HLA-B 遺伝子をコードする領域の一部を PCR 法により増幅した後、ダイレクトシーケンシング法により PCR 産物の塩基配列を決定した。得られた塩基配列をデータベースで解析し、HLA のタイピングを決定した。

<結果>

先天性 CMV 感染児 4 例の血液より抽出されたゲノム DNA を用いて、HLA-A および HLA-B 遺伝子のタイピングを終了した。

2) MHC tetramer を用いた CMV 特異的免疫細胞の検出・定量

<方法>

HLA タイピングの結果をもとに、MHC クラス I/CMV ペプチドを 4 量体化した MHC tetramer を用いて末梢血単核球 (PBMC) を染色した後、フローサイトメーターにより CMV 特異的免疫細胞の検出を行った。さらに、CMV 抗原に対する CMV 特異的免疫細胞の増殖反応を解析する目的で、CMV 蛋白質の一つ pp65 由来のペプチド抗原を用いて、先天性 CMV 感染児由来の PBMC を刺激後 1 週間培養し、MHC tetramer を用いて CMV 特異的免疫細胞の検出を行った。対照として、HIV gag 蛋白質由来のペプチド抗原を用いて同様の実験を行った。

<結果>

HLA タイピングの結果をもとに、MHC tetramer を用いて PBMC を染色した後、フローサイトメーターによる CMV 特異的免疫細胞の検出を行った。その結果、pp65 ペプチド抗原刺激前の末梢血リンパ球において、CMV 特異的免疫細胞が 4 例中 3 例において同定された (それぞれ 0.1%、0.1%、0.6%)。さらに、CMV 抗原に対する CMV 特異的免疫細胞の増殖反応を解析する目的で、pp65 由来のペプチド抗原を用いて、先天性 CMV 感染児由来の PBMC を刺激した後 1 週間培養し、再度 MHC tetramer を用いて CMV 特異的免疫細胞の検出を行った。その結果、4 例中 2 例において CMV 特異的免疫細胞が増加、1 例で減少した (それぞれ 0.6%、0.5%、0.2%)。残り 1 例においては、pp65 ペプチド抗原刺激の有無にかかわらず、CMV 特異的免疫細胞は同定されなかった。図 1 および図 2 において、MHC tetramer によって CMV 特異的免疫細胞が検出され、pp65 ペプチド抗原刺激によって CMV 特異的免疫細胞が増殖した 2 症例の結果を示した。

3) CMV 抗原刺激による IFN- γ 産生細胞

の検出・定量

<方法>

CMV 特異的免疫細胞の機能を解析する目的で、先天性 CMV 感染児由来の PBMC を CMV 蛋白質由来のペプチド抗原 (pp65 または IE-1) で刺激した後、ペプチド抗原に反応して IFN- γ を産生する CD8 陽性細胞あるいは CD4 陽性細胞をフローサイトメーターで検出した。対照として、HIV gag 蛋白質由来のペプチド抗原を用いて同様の実験を行った。

<結果>

pp65 ペプチド抗原を用いて患児 PBMC を刺激した場合、IFN- γ を産生する CD8 陽性細胞はそれぞれ 0.5%、0.3%、0.4%、0.1% 同定され、IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞はそれぞれ 0.2%、0.1%、0.4%、0% 同定された。一方、IE-1 ペプチド抗原で刺激した場合、IFN- γ を産生する CD8 陽性細胞はそれぞれ 0.3%、0.1%、0.1%、0.2% 同定され、IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞はそれぞれ 0%、0.1%、0.4%、0.5% 同定された。対照として HIV gag ペプチド抗原を用いて患児 PBMC を刺激した場合、IFN- γ を産生する CD8 陽性細胞はそれぞれ 0.1%、0.1%、0%、0% 同定され、IFN- γ を産生する CD4 陽性細胞はそれぞれ 0%、0.2%、0.1%、0% 同定された。図 3 において、pp65、IE-1、HIV gag 由来のペプチド抗原刺激によって IFN- γ 産生 CD8 陽性細胞が検出された症例を示した。図 4 において同様のペプチド抗原刺激によって IFN- γ 産生 CD4 陽性細胞が検出された症例を示した。

4) ヘパリン全血の保存条件が MHC tetramer 解析に及ぼす影響の検討

<方法>

患者の血液検体は、日本各地より様々な条件下で搬送されることが予想される。そこで、ヘパリン全血の保存条件 (保存温度および保存時間) が、MHC tetramer 解析および IFN- γ 産生能などの解析に

及ぼす影響について検討した。健康成人ボランティアより採取したヘパリン全血を3種類の温度(37°C、25°C、4°C)で24時間保存した。その後、ヘパリン全血よりPBMCを分離しMHC tetramer解析を行った。対照として、同ボランティアより採取直後のヘパリン全血より分離したPBMCを用いて同様の実験を行った。

〈結果〉

新鮮血由来のPBMCにおいて、MHC tetramerに反応するCD8陽性リンパ球の割合は0.8%であった。3種類の温度処理後に分離されたPBMC由来のCD8陽性リンパ球の割合は、37°Cで1.1%、25°Cで0.7%、4°Cで1.0%という結果を得た。この結果から、採血後24時間の保存条件下では、各保存温度によるMHC tetramer解析への重大な影響は認めないと判断した(図5)。

5) ヘパリン全血の保存条件がIFN- γ 産生能の解析に及ぼす影響の検討

〈方法〉

健康成人ボランティアより採取したヘパリン全血を3種類の温度(37°C、25°C、4°C)および3種類の時間(24 h、48 h、72 h)で保存した。その後、ヘパリン全血よりPBMCを分離し、PMA/ionomycinを用いてPBMCを刺激した後、IFN- γ 産生リンパ球の割合をフローサイトメーターを用いて解析した。対照として、同ボランティアより採取直後のヘパリン全血より分離したPBMCを用いて同様の実験を行った。

〈結果〉

対照である新鮮血におけるIFN- γ 産生細胞の割合と比較して、24時間保存の場合、37°Cでは80.2%に減少したが25°Cおよび4°Cの温度条件下ではいずれも98.7%でありIFN- γ 産生能に影響を及ぼさなかった。48時間保存の場合、37°Cでは44.8%、25°Cでは37.1%と著しく減少したが、4°Cでは87.0%とわずかな減少であ

った。72時間保存の場合、37°Cで33.9%、25°Cでは55.7%と著しく減少したが、4°Cでは88.2%とわずかな減少であった。(図6)。

C. 考察

MHC tetramerを用いた解析結果より、先天性CMV感染児においてCMV特異的免疫細胞が存在することが明らかとなった。また、CMV特異的免疫細胞はCMV抗原に応答して増殖反応を示すことやIFN- γ 産生能を示すことから、機能性を保持している可能性が示唆された。今後は、さらに多くの症例において同様の解析を行い、先天性CMV感染児におけるCMV特異的免疫応答の特徴を明らかにするとともに、先天性CMV感染児と後天性CMV感染児におけるCMV特異的免疫応答の比較や、症候性・無症候性・遅発性障害発症など臨床経過の差異とCMV特異的免疫応答との関連について、経時的な解析データの蓄積が重要であると考えられた。

また、採血後の血液検体の保存条件については、MHC tetramerを用いた解析に関しては採血後24時間の保存時間内であれば保存温度による影響は少ないものと推測された。一方、IFN- γ 産生能を解析する上では、血液検体の保存温度が上昇するとIFN- γ 産生能の検出率が低下する傾向にあることから、血液検体の保存温度の上昇に注意する必要があると考えられた。また、可能な限り採血後24時間以内にPBMCを分離することも重要と考えられた。

D. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

A2402-Tetramer解析(No.1)

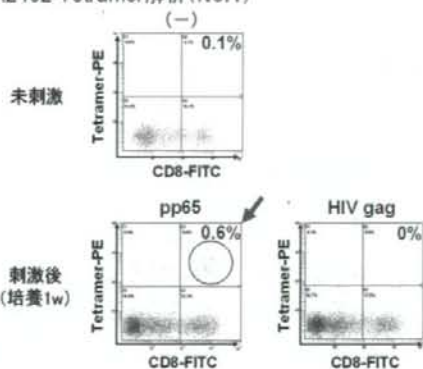


図 2

A2402-Tetramer解析(No.6)

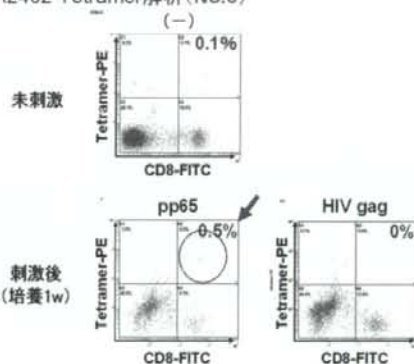


図 3

CMVペプチド抗原による刺激後の
IFN- γ 産生細胞の解析(No. 1)

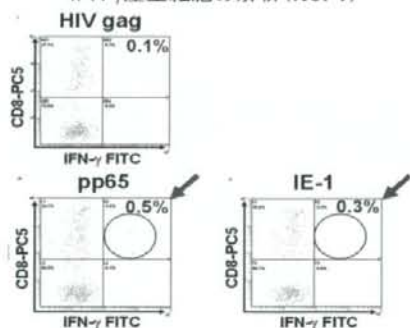


図 4

CMVペプチド抗原による刺激後の
IFN- γ 産生細胞の解析(No. 6)

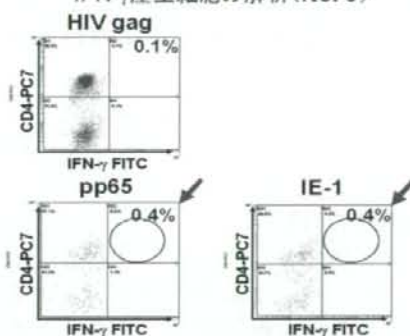


図 5

ヘパリン全血の保存温度の影響
~ MHC Tetramer解析の場合 ~

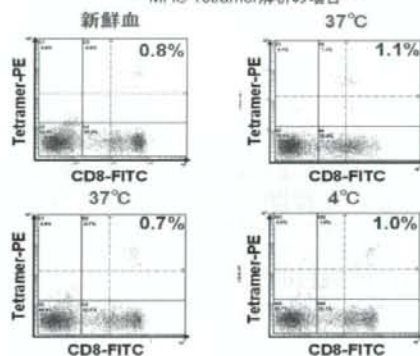


図 6

ヘパリン全血の保存温度の影響

~ PMA/Ionomycin刺激に対するIFN- γ 産生能の場合 ~

