

先天性サイトメガロウイルス感染スクリーニング検査の実施と 遺伝子型解析

研究分担者 井上 直樹 国立感染症研究所ウイルス1部

【研究要旨】

研究班全体として取り組む先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染スクリーニングのパイロット調査の検査を一元的に担当した。検査には、我々が開発した迅速簡便な尿濾紙片を直接鋳型とするリアルタイムPCR法を用いた。3月6日までに研究班班員から5,974検体が送付され、22検体がCMV陽性であることを明らかにした。検査結果は、96%が3日以内平均して翌日には、各班員に報告した。また、これまでに同定した感染児のうち11例についてウイルス学的フォローを行い、尿中にCMVが長期に排泄されること、血中からは極めて早期にCMVがクリアされることを確認した。感染経路を明らかにすることを目的として感染児とその同胞のCMV株の遺伝子型を比較検討し、解析したすべてのペア間でCMV株が同一であることから、年長児が妊婦に対する感染源である可能性が高いことが考察された。さらに、感染や後遺症のリスク因子を明らかにすることを目的とした遺伝子型検討において、CMVのgN、gO、及びgHの3遺伝子間に連鎖があること、遺伝子的に安定なCMVにおいては極めて珍しい遺伝子型の異なる株間での相同組換えがあることを見出した。

A. 研究目的

CMVは幼小児期に自然感染により症状のない不顕性感染を成立させ生涯その宿主に潜伏する。健常人にあっては何ら問題のないCMV感染ではあるが、妊婦に初感染が起ると胎盤を通して胎児へ感染し（先天性感染）、流産や出生児の発達障害の原因となることが知られている。世界的にみて全出生児の0.1-1%に先天性CMV感染が発生していると見積もられている。胎内感染児の約1割が出生時に重篤な症状を呈する。これに加え、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。出生児の発達障害の大きな原因をなしてきた風疹ウイルスによる先天性感染は、ワクチンの浸透に伴い激減した。しかしながら、CMVの場合、ワクチンの開発が遅れており、CMV感染歴のない妊婦を初感染から守る方法がない。先天性CMVによる

障害は早期診断できれば言語・認識能力形成等の早期介入により一定の機能的回復を図ることができる。また、抗ウイルス薬による予後の改善が欧米から報告されている。しかし、聴覚障害に限ってみても、現行の新生児聴覚検査では先天性CMV感染に伴う難聴の半数以上が検出できない。従って、出生時に先天性CMV感染児をスクリーニングにより同定し、抗ウイルス薬による早期治療やフォローアップによる難聴や精神発達遅滞などの後遺症発症時の早期介入することが現時点で最善の対策と考えられる。先天性感染の同定には、尿に高力価のCMVが排泄されることを利用して、出生後2-3週以内に採取した尿中のCMVを検出する方法が用いられてきた。しかしながら、これまで大規模なスクリーニング調査が行われ難かった背景としては、尿の収集・保存、尿からのウイルス分離やPCRな

どには膨大な労力と費用が必要であることがあげられる。欧米では、乾燥血、いわゆるガスリー血濾紙、を用いたスクリーニングが試みられているが、血液中のCMV量が極めて少ないためスクリーニングの感度が低い。我々は、簡便迅速かつ安価な先天性CMVのスクリーニング法として、尿を吸収した濾紙片そのものを鋳型としてリアルタイムPCRを行う方法を開発し、その臨床的応用が可能であることをすでに示してきた。研究班では、この方法を採用し、3年間で約2万人のパイロット調査を行い、全新生児を対象としたCMVスクリーニング体制の構築が可能かを検討する。そのために、他の分担研究者の関連施設において採取される濾紙尿を感染研の当研究室において一元的に検査し、その結果を各分担研究者に報告する。また、すでに同定した感染児の血中及び尿中のウイルス量の変化を経時的に測定し、臨床像との関連が今後検討できる基礎データとする。さらに、同定された感染児の感染ルートを検討することや特定のCMV株が先天感染及び発症リスクに繋がるかを検討するためにCMVの遺伝子型解析を行う。

B. 研究方法

1) 臨床検体

各分担研究者の関連施設で両親の同意のもとに採取された新生児の尿濾紙検体をスクリーニングに用いた。また、以下の臨床材料からDNAを精製した。高度難聴児で先天性CMV感染が同定された症例の乾燥臍帯、スクリーニングで陽性となった児の尿濾紙・尿及び血液、陽性児の兄弟の尿、出生後自然感染(後天性感染)を受けたと思われる健康小児の尿。尿検体にはQIAamp Viral RNA kit (QIAGEN)を、乾燥臍帯及び血液検体にはQIAamp DNA Mini kit (QIAGEN)をそれぞれ用いてDNA精製を行った。

2) 尿濾紙片のリアルタイムPCR

尿を含む特殊濾紙より3ミリ径の濾紙片をパンチにて打ち抜く。次の濾紙検体にコンタミネーションすることを防ぐため、3MM濾紙を検体の後3-5回打ち抜く。濾紙片は、200 μ lの水で洗い、そのままリアルタイムPCR反応に供する。濾紙片は、ピンセットなどで摘むことなく、ピペットマンの200 μ l用チップを付けたアスピレーション装置(Coaster)を用いて移動する。検体ごとにチップを代えることでコンタミネーションを防ぐ。

Brilliant QPCR Master MixにCMV UL83遺伝子を標的とした0.2 μ Mプライマーと0.125 μ Mプローブ(表1)、5 μ g BSA(NEB)と100ngサケ精子DNAを加えた50 μ l反応液に、3ミリ径の濾紙片を加え、50 $^{\circ}$ C 2分と95 $^{\circ}$ C 15分の初期ステップ、95 $^{\circ}$ C 15秒58 $^{\circ}$ C 30秒及び72 $^{\circ}$ C 1分の増幅サイクルで、MX3000P(Stratagene)を用いて測定した。

3) 濾紙片からのDNA溶出とリアルタイムPCR

3ミリ径の濾紙片を数枚打ち抜き、ependorfチューブに入れ、1mlの水で洗浄後、アスピレーション装置を用いて濾紙片を新しいチューブに移し、100ngのサケ精子DNAを含む50 μ lの水を加え、30分間98 $^{\circ}$ Cで処理する。遠心後、上清を回収しDNA溶出液として用いる。なお、回収効率はおおよそ20%である。

液体サンプルについても、濾紙片の場合と同様UL83遺伝子に対するプライマーとプローブを用いた。但し、25 μ lスケールでBSAを含まないTaqMan Universal PCR Master Mix (ABI)を反応液とし、表1に示した条件で増幅した。Applied 7500 (ABI)、MX3000Pのいずれの装置でも同条件で測定可能である。なお、UL83をコードするプラスミドDNAの希釈をスタンダードとして使用した。

4) ウイルス分離

ヒト2倍体細胞HELは、10%牛胎児血清(FBS)添加Dulbecco's MEM(DMEM)培地にて培養した。テロメラーゼ遺伝子により不死化されたヒト繊維芽細胞hTERT-BJ1は、10%FBS添加DMEM:199(4:1)培地にて培養した。尿検体1-5mlを、HELもしくはhTERT-BJ1細胞に加え2-3時間培養後、培地を交換し1-2週間培養した。先天性感染の場合、1週間以内に細胞変性効果が出てくるので、非感染細胞を適宜加えながら2-4回継代し、感染細胞及び培養上清をそれぞれ回収しストックを作成した。回収したストックウイルスをhTERT-BJ1細胞に感染3日後、抗CMV IE2抗体(Chemicon)を用いて免疫染色し、CMVであることを確認した。細胞変性効果が接種した細胞で観察されない場合には1週間に1回程度の頻度で1:2に細胞を数回継代した。1ヶ月程度継代しても細胞変性効果が見られない時には、ウイルス分離不可とした。

5) CMV 遺伝子型の解析

リアルタイムPCRにより求めたコピー数をもとに、各反応約100コピーのCMV DNAを鋳型としてnested PCRにより目的領域を増幅した。PCRに用いたプライマー・プローブ及び増幅サイクル条件は表1にまとめた。電気泳動後、QIAEXII(QIAGEN)を用いて目的DNA断片を精製後、塩基配列をBigDye Terminator cycle sequencing kit(Applied)を用いて決定した。Genbankに登録された各遺伝子型の配列をレフェレンス配列として、ClustalWプログラムを用いて各遺伝子型に分類し、TreeViewプログラムにて作図した。また、株間の相同組換え現象をSimplotプログラムにて解析した。

(倫理面の配慮)

本研究は、研究班に参加する各研究者の

関連機関及び国立感染症研究所の倫理委員会の承認を受けて行われた。研究の目的をよく説明し、保護者の書面での同意に基づき検体を採取し、検体をコード番号化することで連結可能匿名化を図り、適切に行われた。

C. 研究結果

1. スクリーニングの進捗状況

研究代表者の総括報告にあるように、長崎大・藤田保健衛生大・東大・成育医療センター・福島医大・北大・旭川医大を中心に検体が収集され、当研究室で検査を行った。各施設からの検体収集状況を表2に示す。検体受領後から検査結果報告までに要した日数は平均1.02日で、最長6日であった(図1)。日数を要したケースは、金曜午後に検体が到着し、月曜が休日などの理由によるものが大半であった。

3月6日までに総計5,974検体をスクリーニングし、た。一次検査において陽性であり、二次検査においても陽性が確認された件数は、19件であった。一方、一次検査で陽性ないしは判定不能のため二次検査を行ったが陰性と最終的に判定したものは11件であった。これらはすべて一次検査で濾紙片あたり20コピー以下で、念のために再検査したものであった。

スクリーニングを待たずして臨床症状から先天性CMV感染が3例で疑われ確定診断がなされた。従って、総計22例の先天性CMV感染症例が同定されたこととなり、先天性CMV感染の頻度は0.37%であった。施設ごとの陽性率の内訳は、表2に示した。なお、このうちの2035検体(うち8例は感染児)は、旭川医大で昨年度までに収集し、当研究室で検査したものである。

陽性児の全般的な特徴については、研究代表者の総括報告を、個々の先天性感染症例の詳細については、各分担報告で述べられている。

2. 先天性感染児のウイルス学的フォロー
旭川医大で収集した検体のうち先天性感染を確定した児のうち、近々に同定された2例を除き顕性2例不顕性9例について、出生後の時間経過のなかで、血中および尿中でのCMV量がどう変化していくかを解析した(図2)。血漿中のウイルスDNAが速やかに消失していく一方、血球中には時として陽性細胞が出現している。尿中のウイルス量は出生直後血中の1000倍以上で比較的長期に高値が持続する。このことは、アラバマ大グループなどが報告してきた結果と一致している。

3. 遺伝子配列解析による感染経路の検討
現在までのCMV感染症22例中12例に年長同胞があり(22例中2例については患者情報収集が未実施)、現在までに、そのうちの8例について感染児とCMV遺伝子配列を比較した。遺伝子型が多く型間配列も大きく異なるgNやUL144などの遺伝子の塩基配列を解析したところ、すべてのペアで配列の完全な一致が見られた(表3)。また、遺伝子型は様々な組合せであることから、特定の遺伝子型株が、先天性感染に関与するわけではないとみられる。

4. CMV遺伝子型の連鎖

乳幼児より得たCMV 63株のgN, gO, gHの各遺伝子配列を解析し、以下のことが明らかになった。

- 1) gOの遺伝子型の分布が、日本人ではgO5型が存在することから欧米人と若干異なった。
- 2) gNとgO遺伝子間の連鎖がMatickらにより最近示唆されていたが、日本人小児からの分離株でも同様の連鎖があり、7つの連鎖群にほとんどの株が分類された(表4)。
- 3) gN, gOに加えてgH遺伝子も連鎖していたが、gB遺伝子との連鎖はなかった。

4) 連鎖群に分類されなかったCMV 3株の塩基配列の解析から、これらの株は同一のgN及びgO遺伝子配列を有していた。そして、gN1-gO1aとgN3a-gO1bという2つの連鎖群の株がgO遺伝子の3'末端から200 bp上流で相同組換えして生まれた株であった(図3)。

D. 考察

倫理委員会承認後スクリーニングは順調に進んでおり、本年度末までに総計7000人(内2000人は本年度以前の分)の新生児をスクリーニング検査できる予定である。予想された200-250人にひとりの頻度で先天性感染児が同定され、その5人に1人が症候性であることから、あらためて新生児CMVスクリーニング体制の必要性が明確になっている。試薬・消耗品と人件費を含め、一人当たり800円程度で検査が実施できると試算しているが、実際の検査コストの計算には全施設で安定して検体採取が行えるようになるまでもう少し時間をおいてみた方がいいと思われる。

同定した陽性児のうち2例において、尿濾紙検体が当研究室で受領されるまでにすでに出生後2週間が経過し、感染児を実際に診察し、検体の取り違えや検査ミスがないことを確かめるために再度、検体を採取した時点ですでに生後3週を越えていた。このため、尿ではなく臍帯を用いて確認検査を行った。今後、関連病院から班員へ、班員から当研究室への検体移動時間を短縮する工夫が必要と思われる。各病院でスクリーニング検査ができるように、より迅速簡便な検査法の開発も今後の課題になってくるとと思われる。

感染児と同胞兄弟間で、感染しているウイルスの塩基配列解析が同一であることは、家族内感染がCMVの主要な感染ルートであることを示している。今回の解析した内の1組では、感染児出生後3週以内に第

1子から尿検体を採取でき、兄弟間に実質的接触機会もなかったことから、妊娠中に母親が第1子の排泄したCMVに暴露され初感染が成立し、その結果、第2子に先天性感染が起こったと考察される。このことは、妊娠可能年齢女性のCMV既感染率が低下傾向にある昨今、第1子妊娠時にCMVの暴露による初感染を回避する方策を講じて、第1子が自然感染し数年にわたって大量のCMVを尿に排泄するため第2子妊娠時の初感染が回避できないと想定される。従って、先天性CMV感染を防ぐにはCMVワクチンの開発・実用化が急務と考えられる。

最近我々は、どういった遺伝子型のCMV株であろうと先天感染を起こしえることを報告しており、今回の結果も、それを支持するものである。また、いくつかの論文において、CMV遺伝子型と病原性の関連が議論され、その有無については賛否両論がある。我々は難聴というこれまで検討されてこなかった「病原性」について検討し、gB遺伝子型にのみ差があるのではないかと結論したが、症例数が少ないなどの制約があった。本研究では、3カ年の計画で症例数をできるだけ多くし、遺伝子型と出生時症候性となるリスクや後遺症が発生のリスクとの関連を明らかにしたいと考えている。

gN-gM、gH-gO-gLは粒子構成成分として複合体を形成するため、感染において重要な役割を果たすと考えられている。また、中和抗体の標的となる。7つの連鎖群とCMVの増殖性・病原性に何らかの関連があるかは興味のもたれるところであり、今後さらに検討を進めたい。

E. 結論

約6000千人の新生児をスクリーニングし、22検体がCMV陽性であった。感染児の尿から長期にCMVが排泄され続けている。また、年長児が妊婦に対する感染源である

可能性が高い。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H Yan, S Koyano, Y Inami, Y Yamamoto, T Suzutani, M Mizuguchi, H Ushijima, I Kurane, N Inoue. (2008) Genetic linkage among cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and postnatally infected Japanese infants. *J. Gen. Virol.* 89:2275-2279
- 2) S Koyano, N Inoue, T Nagamori, H Yan, H Asanuma, K Yagyu, M Osaki, C Seiwa, K Fujieda. Dried umbilical cords in the retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection as a cause of developmental delays. *Clin. Infect. Dis.* *In press.*

2. 学会発表

- 1) 顔海念, 古谷野伸, 稲見有希, 山本由美子, 錫谷達夫, 水口雅史, 牛島廣, 倉根一郎, 井上直樹「サイトメガロウイルスgN、gO及びgH遺伝子間の連鎖と相同組換え」第23回ヘルペスウイルス研究会、鳥取、2008年6月
- 2) 井上直樹 シンポジウム講演「サイトメガロウイルスの新生児マスキリーニング・レトロスペクティブ診断・遺伝子型解析」第44回日本周産期新生児医学会学術集会、横浜、2008年6月
- 3) 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の検討」第56回日本ウイルス学会学術集会、岡山、2008年10月

- 4) S Koyano, N Inoue, H Yan, H Asanuma, K Yagyu, M Osaki, C Seiwa, K Fujieda. Late-onset developmental delay due to congenital cytomegalovirus infection, asymptomatic in neonate. 2008 Congenital Cytomegalovirus Conference. 2008年11月
- 5) N Inoue Invited talk at Roundtable Presentations for 'Neonatal

screnning'. 2008 Congenital Cytomegalovirus Conference. 2008年11月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

表1 用いたプライマー及びプローブ

Genes & primers	Round	Sequence (5' to 3') #	Amplicon (bp)*	PCR conditions
UL83				
UL83-F	TaqMan	CGCAACCTGGTGCCCATGG	136	50C/2m, 95C/10m, [95C/30s, 60C/1m] x n ‡
UL83-R		CGTTTGGGTTGCGCAGCGGG		
UL83 probe		FAM-TTCGGCGAAGATGC-MGB		
UL144				
UL144-F	1st	TCTCGTATTACAAACCGCGGAGAGGA1	738	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m] x 40, 72C/10m
UL144-R		ACTCAGACACGGTTCCGTAAAGTGCTT		
UL144-F2	2nd	TTCCGGTAGGAGGCATGAAG	587	94C/2m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/1m20s] x 40, 72C/10m
UL144-R2				
gN				
gN-F1	1st	GACAGTACCAGTTGAGAGTCG	595	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m] x 40, 72C/10m
gN-R1				
gN-up	2nd	TGGTGTGATGGAGTGAAC	420	94C/2m, [94C/45s, 60C/45s, 72C/1m] x 40, 72C/10m
gN-lw				
gO				
5'-terminal part				
gO-5'	1st	AGCAGCAAACGACCAGAATCAG	1236	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m15s] x 40, 72C/10m
gO-R2				
gO-5X	2nd	ATCAGCAGTGAGTACACGCAGGC	697	94C/2m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/1m45s] x 40, 72C/10m
gO-M1				
middle part				
gO-F1	1st	CTGGTTAACGCCATGAGCCG	724	96C/5m, [94C/45s, 65C/45s, 72C/90s] x 40, 72C/10m
gO-R1				
gO-F2	2nd	CGCGTYCCYAAGTATATTAAC	442	94C/2m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/1m] x 40, 72C/10m
gO-R2				
3'-terminal part				
gO-F2	1st	CGCGTYCCYAAGTATATTAAC	731	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m] x 40, 72C/10m
gO-3X				
gO-M2	2nd	GAAACRCCGTACACTATTTAYGG	308	94C/2m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/1m] x 40, 72C/10m
gO-3'				
gH				
gH-F1	1st	CCTTCTCTCGGGTGTAAACGC	446	96C/5m, [94C/45s, 50C/45s, 72C/90s] x 40, 72C/10m
gH622				
gH203	2nd	CCACCTGGATCAGCCCGCTG	214	94C/2m, [94C/45s, 60C/45s, 72C/1m] x 40, 72C/10m
gH172				

R=A/G, S=G/C, Y=C/T. ‡ 濾紙片を検体とする場合の条件は異なる

表2 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3 遺伝子型解析による感染経路の検討

先天感染児	兄弟	遺伝子型	
		UL144	gN
C97(顕性)	C211(兄)	B	4c
12034	C206(姉)	B	1
12542	C168(姉)	A	2
12571	C218(姉)	A	3a
12999	C195(姉)	C	4b
	C199(胎児)*		
10744	C231(姉)	B	4b
20270	F03(姉)	C	3a
71035	F05(兄)	A	1

*先天性CMV感染のため産産

表4 gN-gO-gH 遺伝子型の連鎖

Strain	Genotypes			Linkage group
	gN	gO	gH	
ASA12	1	1a	1	1
ASA59	1	1a	1	1
C102	1	1a	1	1
C106	1	1a	1	1
C140	1	1a	1	1
C141	1	1a	1	1
N42C	1	1a	1	1
C177	3a	1b	1	2
C83	3a	1b	1	2
FUK32	3a	1b	1	2
FUK72	3a	1b	1	2
FUK82	3a	1b	1	2
J60250	3a	1b	1	2
U02	3a	1b	1	2
Y01	3a	1b	1	2
ASA16	3b	2a	1	3
FUK19U	3b	2a	1	3
U01	3b	2a	2	3'
U06	3b	2a	2	3'
ASA68	2	2b	1	4
C134	2	2b	1	4
C164	2	2b	1	4
N66	2	2b	1	4
N69	2	2b	1	4
ASA15	4a	3	2	5
C145	4a	3	2	5
FUK03	4a	3	2	5
FUK20	4a	3	2	5
FUK31	4a	3	2	5
J60236	4a	3	2	5
U03	4a	3	2	5
C49	4a	3	1	5'
J60249	4a	3	1	5'
J60248	4a	3	1	5'
ASA19	4b	4	1	6
C110	4b	4	1	6
C122	4b	4	1	6
C14	4b	4	1	6
C170	4b	4	1	6
FUK74	4b	4	1	6
J60223	4b	4	1	6
J60299	4b	4	1	6
N22	4b	4	1	6
X01	4b	4	1	6
C135	4b	4	2	6'
U07	4b	4	2	6'
ASA01	4c	5	2	7
ASA70	4c	5	2	7
C149	4c	5	2	7
FUK28	4c	5	2	7
N59	4c	5	2	7
C154	3a	1a	1	rec
FUK16	3a	1a	1	rec
S01	3a	1a	1	rec
J60284	3a	2b	1	rec
J60298	4c	1a	2	rec

図1 検体受領から結果報告までの日数

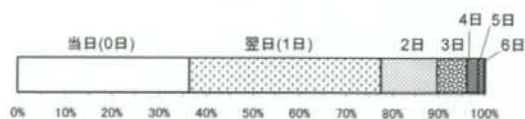


図2 先天性 CMV 感染児のウイルス学的フォロー

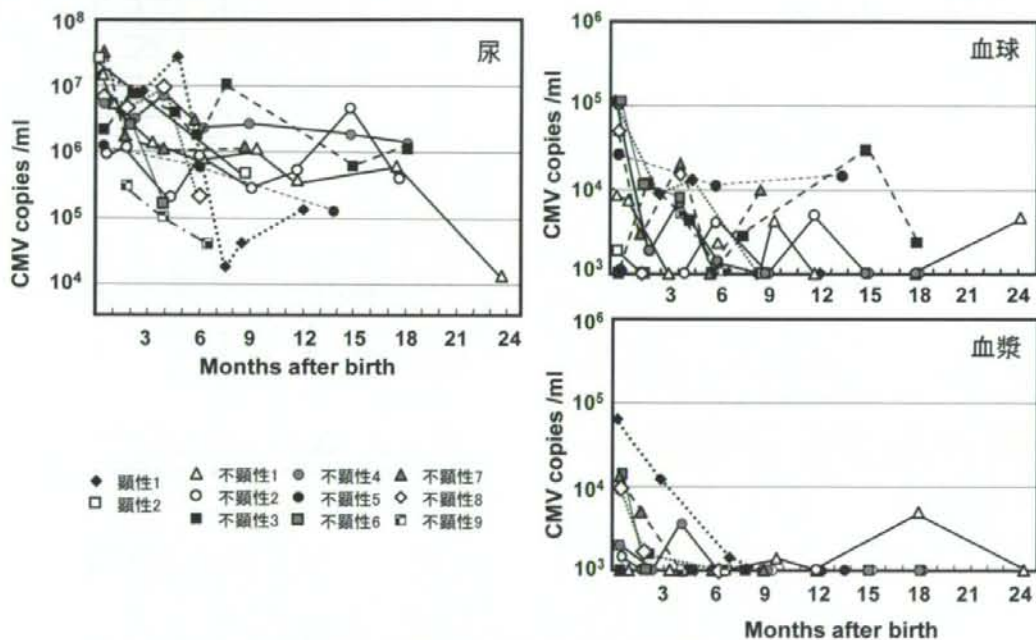
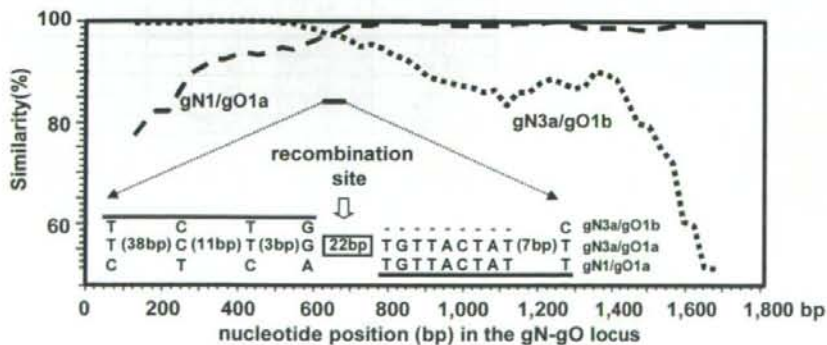


図3 gN-gO 間で生じた相同組換え



V. 診療ガイドライン

1. 先天性CMV感染児への初回治療プロトコル案

【対象】症候性先天性CMV感染児で、(1) 治療開始時点で原則として生後30日以内、(2) 治療開始時点の体重が 1,200 g以上、(3) 妊娠週数32週以上。^{1,2)}

除外項目：(1) valganciclovir (VGCV)の投与に関しては、薬物の吸収に支障をきたすような消化管障害の存在または既往（例えば壊死性腸炎）、(2) クレアチニン >1.5 mg/mLまたはCCr <10 mL/min/1.73 m²、^{1,2)} (3) VGCVまたはganciclovir (GCV)による治療の実施が困難となるような他の重症疾患を有する場合。

なお、「症候性」には

- CNS障害：(1) 小頭症、(2) 脳の画像異常、(3) CSF検査値異常、(4) 脈絡網膜炎、(5) 聴力障害、(6) CSFよりCMV-DNAを検出
- CNS外障害：(1) 血小板減少、(2) 紫斑、(3) 肝腫大、(4) 脾腫、(5) 子宮内発育遅滞、(6) 肝炎

を含む。

注1) 文献1)2)では他の抗ウイルス薬や免疫グロブリンを使用した場合は適応外としているが、このプロトコルは「研究」である以上に「診療」の指針であるので、それは問わないことにしている。またこれらの文献では「HIVキャリア妊婦からの出生」を除外規定に含めていたが、同様の理由でそれは問わないことにしている。

注2) 文献1)2)では治療開始時点で生後30日以内であることを明示しているが、ここではあくまでも「原則」としており、主治医の判断でこの時期を過ぎても適応可能とした。

【治療方法】

valganciclovir (VGCV) 経口投与（授乳後） 16 mg/kg/回 x 2回/日 x 6週間¹⁾
または ganciclovir (GCV) 点滴静注 6 mg/kg/回 x 2回/日 x 6週間²⁾

注1) いずれの薬剤も先天性CMV感染に対しては保険適応がない。どちらの薬剤を選択するかは主治医と家族との話し合いで個々に決めて行くが、消化管障害がある場合や重症例では GCVの使用を優先して考える。

注2) VALIXA（バリキサ）錠（パルカンシクロピル塩酸塩製剤）はフィルムコ

ーティングしてあるが、乳児への投与はこれを砕いて調整することになる。1錠（重さ 620 mg）中に 450 mgのVGCVを含むので、VGCV 16 mg/kg はバリキサ錠粉碎粒 22 mg/kgに相当する。Galliらの研究³⁾でも450 mg錠を用いているが、Kimberlinらの研究¹⁾では VGCV oral solutionを用いているので、全く同じ薬物動態を示す保証はない。

注3) バリキサ錠の価格は 1錠 2,942.90円である。体重6 kgの児の場合は上記用量で 6週間使用した場合のコストは 54,934円になる。一方デノシン点滴静注の 500 mgバイアルの価格は 13,718円であり、バイアル内では注射用水で溶解後24時間は安定しているので、1日に 1バイアル使用するとして、6週間使用した場合のコストは 576,156円になる（これにはルートの確保や維持に必要なコストは含まれていない）。

【効果判定 および 副作用評価】

1. ウイルス量

測定法：real-time PCR (Tanaka et al., J Med Virol 2000;60:455)

検体：(1) 全血と尿、(2) 髄液

測定時期：(1) 治療前に最低1回、できれば2回（無治療での変動の有無をみるため）。その後治療中と治療終了後最低 2週間までの間は週1回チェック。できれば治療の継続（追加治療プロトコル参照）の有無に関わらず、投与開始から24週間（6カ月）の時点でもチェックする。(2) 治療前に1回施行し、CMV DNAが検出された場合は治療開始後2週間の時点でもう1回、その段階でもCMV DNAが検出されたら治療終了後2週間の時点でもう1回チェックする。できればCMV DNAの検出の有無に関わらず、そして治療の継続の有無に関わらず投与開始から24週間（6カ月）の時点でもチェックする。

注1) DNAを保存し、後日 reference lab（国立感染症研究所ウイルス第一部）が一括測定できるようにしておく。

注2) 追加治療の是非を判断する際には全血と髄液を用い、尿は参考データとする。

注3) 髄液の採取にあたっては、ウイルス量の定量に加えて、圧測定、外観観察、細胞数と分画、蛋白定量、糖定量を行う。

2. ウイルス分離と薬剤感受性試験（または薬剤感受性関連遺伝子配列の解析）

採取時期：治療前。治療の各クール終了後に再燃が見られたらその都度。

検体：尿、血液

搬送：国立感染症研究所ウイルス第一部へ匿名化したうえで送付。事前に連絡の上、冷蔵（禁・凍結！）で翌日（祝祭日を除く）までに届くように手配する。

3. GCV血中濃度

測定時期：第5治療日（± 1日）に実施。VGCV投与後、30分（15-45分）、90分（1-3時間）、6時間（5-7時間）、11時間（10-12時間）の4回採血（EDTA加で 0.2 ml ずつ）¹⁾。困難であれば、90分（1-3時間）（予想Cmax）と11時間（10-12時間）（次回投与の直前；Cmin）の2回³⁾。

測定法：液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー法（田辺三菱に依頼）。

4. 聴力検査

実施時期：治療前、治療開始後 6週間、6カ月、1年、2年の 5回実施¹⁾。困難であれば、治療前と治療開始後 6カ月の2回実施。

測定法：ABR

5. 眼底検査

実施時期：治療前と治療開始後 6カ月の 2回。

6. 発達評価

評価時期：通常の乳幼児検診の key months（修正4カ月、7カ月、10カ月、18カ月）に遠城寺式発達評価を行ない、DQを算定する。

7. 脳画像評価

評価時期：治療前と治療開始後 6カ月の 2回。

評価法：MRIを原則とする。ただし鎮静等の問題でどうしても実施困難な場合はCTを施行する。

8. 副作用チェック

最低測定項目：CBC/diff, ALT, 総ビリルビン、尿酸、クレアチニン²⁾

測定時期：治療前に1回、その後治療中と治療終了後最低 2週間までの間は週1回チェック。

注1) grade 2以上の副反応が出現したら、原則投与中止とする。

注2) 好中球減少に関しては、ANC 500未満になったらいったん中止して ANC >750になるまで待って full dose で再開する。再び ANC が 500未満になったら、50% dose にして ANC >500となるのを待つ。この用量で ANC の上昇が認められなければ投与中止とする²⁾。

【文献】

1. Kimberlin DW, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J. Infect. Dis.* 2008;197:836-45.
2. Kimberlin DW, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J. Pediatr.* 2003;143:16-25.
3. Galli L, et al. Valganciclovir for congenital CMV infection: a pilot study on plasma concentration in newborns and infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007;26:451-3.

2. 先天性CMV感染児への追加治療プロトコル案

【対象】 症候性先天性 CMV 感染に対する初回治療を行った児で、(1) 治療終了後に臨床的再増悪がみられた場合、(2) 治療終了時点でなお血液中から 1×10^4 copies/ml 以上のウイルス DNA を検出、または髄液から検出限界以上のウイルス DNA を検出した場合、または(3) 治療終了後 2 週間までにリバウンドして血液中から 1×10^4 copies/ml 以上のウイルス DNA を検出、または髄液から検出限界以上のウイルス DNA を検出した場合 に考慮する。

【治療方法】

VGCV 経口投与（授乳後） 16 mg/kg/回 x 2回/日 x 6週間

- 注1) 一回目の追加療法の後でも上記(1)～(3)のいずれかに該当する場合は、同様の追加療法を繰り返し最長 24 週間（6 カ月）まで延長する。
- 注2) 追加療法の有効性や安全性は不明であるため、主治医が総合的に適応の判断を下し、保護者へ十分に説明し同意を得られた場合にのみ実施する。
例えば(1) + (2) または(1) + (3) の場合にはより積極的に適応を考える。
- 注3) 追加療法を実施する症例からは、積極的にウイルス分離を行うよう心掛ける。

【効果判定 および 副作用評価】

初回治療プロトコルを参照のこと。

VI. 会 議 記 録

厚生労働科学研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

「全新生児を対象とした
先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染
スクリーニング体制の構築に向けたパイロット調査と
感染児臨床像の解析エビデンスに基づく
治療指針の基盤策定」
に関する研究班

平成20年度 第一回班会議プログラム

日時：平成20年5月9日（金） 13時30分～17時30分

場所：国立成育医療センター研究所 2階セミナールーム21

13:30～

開会の挨拶 研究代表者 藤枝憲二（旭川医科大学小児科）

1. 厚生労働省母子保健課 課長補佐 小林秀幸先生：ご挨拶
2. 分担研究者・研究協力者：自己紹介

14:00～16:00 〈研究の概要に関する発表〉

1. 研究代表者 藤枝憲二（旭川医科大学小児科）：研究の概要
2. 古谷野伸（旭川医科大学小児科）
CMVスクリーニングシステムの流れと感染児の臨床像の解析
3. 井上直樹（国立感染症研究所ウイルス1部）
尿を材料としたCMV検査法の実際
/遺伝子型による感染経路の解析
4. 藤原成悦（国立成育医療センター研究所母子感染研究部）
先天性CMV感染児のウイルス特異的免疫応答の解析
：方法論と研究計画
5. 錫谷達夫（福島県立医科大学微生物学教室）
CMVの血清型別中和抗体価の測定法
6. 岡明（東京大学小児科）
先天性サイトメガロウイルス感染症に伴う中枢神経系異常
7. 泰地秀信（国立成育医療センター第2専門診療部耳鼻咽喉科）
乳幼児聴力検査と遅発性・進行性難聴

16:00～17:25 〈研究計画などについての討議〉

1. 討議1 各施設のスクリーニング実施目標
2. 討議2 倫理委員会、同意書、ポスターなどについて
3. 症候性感染児の治療実態アンケート調査の方法・形式について
4. フリーディスカッション
5. オブザーバー 川名 尚先生
（帝京大学医学部溝口病院産婦人科教授）からのコメント

17:25～17:30

事務連絡（経理、報告書形式、次回班会議の予定）

閉会の挨拶 藤枝憲二

厚生労働科学研究費補助金

(子ども家庭総合研究事業)

「全新生児を対象とした
先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染
スクリーニング体制の構築に向けたパイロット調査と
感染児臨床像の解析エビデンスに基づく
治療指針の基盤策定」
に関する研究班

平成20年度 第二回班会議プログラム

日時： 平成20年12月19日（金） 13時～17時
場所： 国立感染症研究所 共用第2会議室

13:00~13:10

開会の挨拶 研究代表者 藤枝憲二 (旭川医科大学小児科)
厚生労働省母子保健課よりご挨拶

研究の概要に関する発表 (一人 5~10分程度)

13:10~14:20 <スクリーニング・治療>

1. ○井上直樹 (国立感染症研究所ウイルス1部)
新生児スクリーニング調査の進捗概況
および「2008年先天性CMV学会」概要報告
2. ○古谷野伸、長森恒久、藤枝憲二 (旭川医科大学小児科)
旭川医大のこれまでのスクリーニング進捗状況と
母体のCMV特異的免疫能の解析
3. ○中井英剛、加藤伴親、菅田健、浅野喜造、吉川哲史 (藤田保健衛生大学小児科)
藤田保健衛生大学・豊川市民病院の進行状況：
スクリーニング陽性例の詳細について
4. ○浅野仁覚 (福島県立医科大学総合周産期母子医療センター)
福島県内の進行状況と経過報告
5. ○森内浩幸 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)
先天性CMV感染の疫学：
日越の比較、先天性CMV感染児の治療ガイドライン作成と治験に向けて
6. ○伊藤裕司、庄司健介 (国立成育医療センター周産期診療部新生児科)
バルガンシクロピルの長期投与を要している症例の検討
7. ○久保隆彦 (国立成育医療センター周産期診療部産科)

14:20~14:40 <検査・免疫>

8. ○山田秀人、峰松俊夫 (北海道大学生殖・発達医学講座)
妊婦CMV IgMスクリーニングとIgG avidity測定による初感染妊婦同定の試み
9. ○逸見千寿香、今留謙一、○中村浩幸、藤原成悦
(国立成育医療センター研究所母子感染研究部)
先天性サイトメガロウイルス感染児のウイルス特異的T細胞免疫応答の解析

14:40~14:50

休憩