

認を得て、2006年に岩手医大、07年に防衛医大と富山大で、08年に長良医療センター、防衛医大、島根県立中央病院で、09年には京都大、神戸大（2例）でCCMVIに対する免疫グロブリン療法が実施された。プロトコル作成前の4症例および研究会としてエントリーされた9症例、計13症例の免疫グロブリン投与ルートは、神戸大の母体静脈内1例を除きすべて胎児腹腔内投与を実施した。富山大と島根県立中央病院の2例は胎児腹水がなく、IFACに先行して母体静脈内投与を行った。神戸大の1例は母体静脈内投与と羊水腔内投与を併用した。研究会として評価を行った2009年7月時点で分娩直後であった京都大の1例、および神戸大の2例を除いた10症例の胎児治療評価を結果にまとめる。

### C. 研究結果

- 1) 生命予後：生存 8/10 例 (80%) ; 正常 1 例, 早期新生児死亡 1 例, 36 生日死亡 1 例, 発達遅滞 4 例, フォロー中 3 例 (現在まで異常なし)
- 2) 治療による CCMVI 症状変化：胸腹水消失ないし軽減 6/8 例, 児発育増加ないし維持 5 例.
- 3) 治療による CMV 検査値変化：腹水 CMV 消失 3/4 例, 新生児血液 CMV 陰性 2/8 例, 新生児尿 CMV 陰性 2/8 例.
- 4) 治療から分娩までの週数：1, 6, 6, 6, 6, 8, 12, 13, 23 週 ; 34 週以降の分娩 8/10 例
- 5) 安全性：抗体高力価免疫グロブリンを用いた母体静脈内投与や IFAC 実施にともない、母児への直接的な危険性は認

められなかった。しかし、穿刺を繰り返すことによる前期破水や早産リスクは存在する。

### D. 考案

現時点で正常発育が確認できているのは1例(13歳)である。3例は神経学的検査のフォローを受けているが、現時点(2歳1ヵ月, 1歳4ヵ月, 2ヶ月)ではABRを含めて異常を認めていない。呼吸不全で新生児死亡に至った1例では、IFAC後に胸腹水の軽減とIVCPLIの低下が観察されたが、治療後3日目にPROMに至り2日後に分娩となった症例であった。IFACの穿刺の1週間前にも羊水・帯・腹水穿刺を受けていた。PROMに至らなかった場合、生児を得られた可能性もあったと考えられる。また、36生日で死亡となった例は、出生後も大量腹水や横隔膜高位が持続し、胸郭低形成は重症であった。出生後、種々の治療に対する反応は不良で、血球貪食症候群および出血性ショックのため36生日死亡となった。

CCMVIは、出生前に診断に至っても経過観察がこれまでの一般的な管理法である。抗体高力価免疫グロブリンを用いた母体静脈内投与やIFACのプロトコルでの適応は症候性である。疫学調査では、症候性CCMVIの約90%が後障害を発症する。免疫グロブリン胎児治療後に、胸・腹水消失、軽減が6例、児発育増加・維持が5例、腹水中CMV消失が3例、新生児血液CMV陰性が2例、新生児尿CMV陰性が2例に観察された。10例全例において治療前に腹部所見(腹水ないし肝臓腫大)が認められた。丸山らの報

告によると、腹部所見のある児の死亡率は 60%とされる<sup>3)</sup>。したがって、生命予後のみで評価した場合、死亡率は 2/10 例 (20.0%) となり、本胎児治療法は有効であるかもしれない。

防衛医大 2 症例 (2007 年と 08 年) では治療前から多彩な症状 (肝腫大, 血小板減少, 腹水, IUGR ほか) が存在していた。この症候性 CCMVI 児 2 例で現在まで神経学的な後障害が認められていないため、本治療法には神経学的な予後改善効果があるのかもしれない。

## E. 結論

10 例の免疫グロブリン胎児治療後に、胸・腹水消失・軽減が 6 例, 児発育増加・維持が 5 例, 腹水中 CMV 消失が 3 例, 新生児血液 CMV 陰性が 2 例, 新生児尿 CMV 陰性が 2 例に観察された。生命予後のみで評価した場合、死亡率は 2/10 例 (20.0%) となり、本胎児治療法は有効であるかもしれない。また、神経学的な予後改善効果がある可能性がある。治療による母児への直接的な危険性は現時点では認められていない。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nishikawa A, Yamada H, Yamamoto T, Mizue Y, Akashi Y, Hayashi T, Nihei T, Nishiwaki M, Nishihira J. (2009) A case of congenital toxoplasmosis whose mother demonstrated serum low IgG avidity and positive tests for multiplex-nested PCR in the amniotic fluid. *J Obstet Gynaecol Res* 35(2),

372-378.

Yamada H, Atsumi T, Kobashi G, Ota C, Kato EH, Tsuruga N, Ohta K, Yasuda S, Koike T, Minakami H. (2009) Antiphospholipid antibodies increase the risk of pregnancy-induced hypertension and adverse pregnancy outcomes. *J Reprod Immunol* 79:188-195.

Sata F, Toya S, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamazaki A, Minakami H, Kishi R. (2009) Proinflammatory cytokine polymorphisms and the risk of preterm birth and low birth weight in a Japanese population. *Mol Hum Reprod* 15(2):121-130.

Shimada S, Yamada H, Hoshi N, Kobashi G, Okuyama K, Hanatani K, Fujimoto S. (2009) Specific ultrasound findings associated with fetal chromosome abnormality. *Congenit Anom (Kyoto)* 49(2):61-65.

Shimada S, Takeda M, Nishihira J, Kaneuchi M, Sakuragi N, Minakami H, Yamada H. (2009) A high dose of intravenous immunoglobulin increases CD94 expression on natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 62(5):301-307.

Yamada H, Atsumi T, Amengual O, Koike T, Furuta I, Ohta K, Kobashi G. (2010) Anti- $\beta$  2 glycoprotein-I

antibody increases the risk of pregnancy-induced hypertension: a case-control study. J Reprod Immunol 84:95-99.

## 2. 学会発表

山田秀人 (2009) 先天性サイトメガロウイルス感染症の予防と治療. 第1回周産期新生児感染症研究会 (特別講演), 7月2日, 神戸

山田秀人 (2009) 先天性胎児感染症に対する新たな出生前医療の展開. 第150回日本産科婦人科学会秋田地方部会学術講演会 (特別講演), 7月26日, 秋田

山田秀人 (2009) 先天性胎児感染症に対する新たな出生前医療の展開. 神戸市産婦人科医会研修会 (特別講演), 8月1日, 神戸

山田秀人 (2009) CMV 胎内感染の制御: 治療. 第16回ヘルペス感染症フォーラム (パネルディスカッション), 8月21-22日, 札幌

山田秀人 (2009) 先天性サイトメガロウイルス感染症. 神戸パースコホート研究講演会, 9月16日, 神戸

山田秀人 (2009) 先天性胎児感染症に対する新たな出生前医療. 済生会兵庫県病院講演会 (特別講演), 10月17日, 神戸

山田秀人 (2009) 先天性胎児感染症の新たな出生前医療の展開. 第299回岡山四水会 (特別講演), 10月28日, 岡山

山田秀人 (2009) 産科婦人科学分野の現状と今後-先天性胎児感染症の新たな出生前医療の展開. 第4回神戸大学医学部医学科ホームカミングデー, 10月31日, 神戸

山田秀人 (2009) 先天性感染胎児医療の新展開. 道南産科小児科合同研究会 (特別講演), 11月20日, 函館

山田秀人 (2009) 先天性感染症に対する新たな管理と胎児医療. 第110回播州産婦人科セミナー講演会 (特別講演), 12月12日, 姫路

山田秀人 (2010) 先天性胎児感染に対する新たな出生前医療. 第33回長崎大学産婦人科セミナー講演会 (特別講演), 1月26日, 長崎

## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

新生児の先天性サイトメガロウイルス感染スクリーニングと  
感染児フォローアップ体制構築に関するパイロット研究

研究分担者 久保 隆彦 国立成育医療センター 周産診療部

**【研究要旨】**

国立成育医療センター産科にて分娩を予定する妊婦より妊娠初期と 28 週の 2 回にわたり採血を行い抗 CMV 抗体の検出と CMV gH 蛋白質に対するサブタイプ特異的抗体の検出を行う。これらの解析を通じて、妊娠中の CMV 初感染および異なるサブタイプに属する CMV の再感染を明らかにする。妊婦への CMV に関する情報提供と教育について、産科ガイドラインへの記載を目的とする。

**A. 研究目的**

妊婦の CMV-IgG 抗体の陽性率、母子感染率を明らかにし、妊婦への CMV に関する情報提供と教育について、産科ガイドラインへの記載を目的とする。また新生児の先天性サイトメガロウイルス感染スクリーニングと感染児フォローアップの体制を構築すること。

（倫理面への配慮）

本研究は国立成育医療センター倫理委員会の承認を得ている。血液サンプルは名前などの個人情報を削除し、当院で管理する番号のみを付けて福島県立医科大学に送る。妊婦の名前と番号を結びつける匿名化照合票は個人情報管理者により厳重に管理されることで個人情報を守っている。

**B. 研究方法**

2009 年 2 月より 2010 年 1 月に国立成育医療センター産科で管理した妊婦より妊娠初期と 28 週の 2 回にわたり約 5ml の採血をおこない、福島県立医科大学で抗 CMV 抗体の検出と CMV gH 蛋白質に対するサブタイプ特異的抗体の検出を行う。

これらの解析から、妊娠中の CMV 初感染および異なるサブタイプに属する CMV の再感染を明らかにする。該当症例の先天性感染が母親の初感染、再感染、再活性化のいずれによるものであるかを推測する。

**C. 研究結果**

①現在までの妊婦採血数

1385 検体（初期：830 検体、中期：55 検体）、福島県立医大へ送付した検体数は 626 検体（初期：74 検体、中期：552 検体）うち児が CMV 陽性であった 2 症例につき経過を報告する。

②症例 1

41 歳 1 経妊 1 経産

前回妊娠：ICSI 妊娠、FGR、骨盤位のため帝王切開にて分娩、臍帯辺縁付着であった。

37 週 6 日 1778g 現在 3 歳

今回妊娠経過： ICSI 妊娠、子宮筋腫合併妊娠以外は妊娠分娩経過に特に問題なし

既往帝王切開の適応で 38 週 5 日選択的帝王切開にて分娩、2862g 男児 Ap9/10

新生児経過： 出生時特に異常なく、日令 2 に PVC が見付き、精査したが全身状態は良好であり、循環動態に特に異常なため退院の上 follow となった。退院後の日令 14 に児のサイトメガロスクリーニング結果が陽性であることが判明。児の発育に現時点では異常なし

#### <当院での検査>

妊娠 12 週 CMV-IgG 2.0(-) 陰性

出産後 19 日 CMV-IgG 15.4(+)

CMV-IgM 2.04(+)

#### <CMV 研究検体>

初期検体 なし

中期検体 (28 週)

福島県立医大に発送済み(検体番号 302)

### ③症例 2

33 歳 2 経妊 2 経産

#### <既往歴>

24 歳 パニック障害

30 歳 甲状腺機能亢進症

前回妊娠時投薬なし

#### <妊娠分娩歴>

27 歳 39 週 1 日 2680g の女児 経膈分娩

30 歳 38 週 5 日 2955g の女児 経膈分娩

妊娠初期に一過性甲状腺機能亢進あり

(TRAb 陰性)

<今回妊娠> 自然妊娠の 2 絨毛膜 2 羊膜

性双胎

妊娠初期： 悪阻と甲状腺機能精査のため入院管理

甲状腺機能亢進症に対し、MMI15mg、KI5mg 内服

妊娠 24 週 MMI15mg、KI5mg へ減量

妊娠 26 週 KI 中止

児の発育は順調

#### <分娩経過>

37 週 1 日 分娩誘発、経過に問題なく経膈分娩

第 1 子 2100g 女児 Ap9/9

第 2 子 2520g 男児 Ap9/9

#### <新生児経過>

母の合併症のため児は入院管理となったが、全身状態は落ち着いていた。

日令 14 第 2 子のサイトメガロスクリーニング結果が陽性であることが判明。

第 1 子は陰性であった

両児共発育に現時点では異常なし

#### <当院での検査>

妊娠 8 週 CMV-IgG 18.8(+)陽性

出産後 34 日 CMV-IgG 23.6(+)

CMV-IgM 0.43(-)

#### <CMV 研究検体>

初期検体 (8 週) あり

福島県立医大に発送済み

中期検体 (24 週) あり

福島県立医大に発送済み

産後 34 日の検体あり

福島県立医大に発送済み

### D. 考察

症例 1 では母の初期の CMV 抗体陰性

であり、産後の CMV 抗体が陽性になっていることを考慮すれば、妊娠中の初感染であろうと推測される。感染経路は上の児経由である可能性が一番に考えられた。そのためこのようなケースでは株の同定を行うためにも、上の児の検索も必要と思われた。

症例 2 では双胎の第 2 子のみ感染であり、母の初期の CMV 抗体陽性であった。一般に抗体陽性の母からは胎児の CMV 感染は否定的であり、感染経路の同定が困難である。

異なる株での初感染なのか、なぜ双胎の片方の児だけに感染したのかについて、今後胎盤の検索を含めた検討が必要と思われた。福島県立医大へ送った検査の結果も期待したい。また上の児の検索についても症例 1 と同様必要であろうと思われた。

現状の問題点としては、母体血をすべて検査することが予算上困難であるため、福島県立医大と以下のように計画している。まず、中期検体を福島に送り、中期検体で陽性であった者は詳細解析とする。陽性者については、福島から成育に連絡をもらい、その者の初期検体を改めて福島に送付。陰性者は検査せず。初期陽性者について再度福島に連絡し、詳細解析する。

期待される成果としては、以下を想定している。

- ・妊娠初期の CMV-IgG 抗体の陽性率
- ・妊娠初期 CMV-IgG 抗体陰性妊婦の母子感染率
- ・妊娠初期 CMV-IgG 抗体陽性妊婦の母子感染率
- ・妊娠中期の CMV-IgG 抗体の株別陽性

率

- ・妊娠中期 CMV-IgG 抗体陽性妊婦の母子感染率

今後の戦略として、CMV-IgG 抗体保有に関係なく、妊婦への情報提供と教育について、産科ガイドラインへの記載を目的としている。

## E. 結論

2010 年 1 月末現在までの CMV 研究の妊婦採血数は 1385 検体（初期：830 検体、中期：555 検体）であり、うち中期 552 検体を福島県立医大へ送付した。

そのうち児が CMV 陽性であった症例は 2 症例であった。1 例は母の妊娠初期の CMV 抗体陰性、産後の CMV 抗体陽性であり、妊娠中の初感染と考えられた。感染経路については、検索中である。もう 1 例は母の妊娠初期の CMV 抗体陽性であり、また双胎の第 1 子のみ感染であることから、感染経路の同定が困難であることが予想される。異なる株での初感染も考えられ、福島県立医大での検索結果に期待したい。

今後妊婦の抗体保有率を調査するとともに、CMV-IgG 抗体保有に関係なく、妊婦への情報提供と教育について、産科ガイドラインへの記載を目的としている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## CMV 先天性感染による高度感音難聴の診断および療育に関する研究

研究分担者 泰地 秀信 国立成育医療センター耳鼻咽喉科医長

### 研究要旨

非症候性の先天性あるいは遅発性難聴において保存臍帯で PCR を用い CMV DNA が陽性であった 2 例のその後の経過について検討した。また先天性の症候性 CMV 感染症に GCV を 6 週間投与し、一側の聴力の著明な改善をみた例について聴力のフォローを行った。濾紙尿を直接サンプルとする先天性サイトメガロウイルス感染マスキリングが当院でも開始されたが、尿中 CMV が陽性であった 3 例については聴力障害は生下時には認められなかった。

### A. 研究目的

近年わが国では妊婦の CMV 抗体保有率が大きく低下していることが報告され、妊娠中の初感染による先天性 CMV 感染症の増加が懸念されている。先天性 CMV 感染に伴う難聴は高度難聴の 20% 程度といわれており、先天性 CMV 感染に伴う難聴は年間 150 名以上が見込まれている。先天性 CMV 感染に伴う難聴は半数以上が出生時無症候（難聴の発症が生後 6 ヶ月以降）とした報告があり、現行の新生児聴覚スクリーニングでは半数以上が検出できないことになる。そのため本研究班では全新生児を対象とした先天性 CMV 感染スクリーニング体制の構築をめざしているが、今回は非症候性の CMV 感染児での難聴の特徴を検討するために、高度感音難聴児において乾燥臍帯からサイトメガロウイルス検出が検出された例の経過について検討した。また難聴に対するガンシクロビル（GCV）の長期効果を検証した。新生児尿中 CMV スクリー

ニングにて CMV 陽性であった例の聴覚スクリーニングおよびフォローを行った。

### B. 研究方法

1. 国立成育医療センター耳鼻咽喉科を受診した非症候性の先天性感音難聴および進行性感音難聴で、乾燥臍帯から CMV-DNA が検出された 2 児のその後の経過について検討した。

2. 先天性 CMV 感染に対する治療的介入として、ガンシクロビル（GCV）の難聴に対する有効性が報告されている。症候性の先天性 CMV 感染症で早期に GCV の投与を行った児につき、治療終了後に再度の聴力悪化がみられないかどうか経過を検証した。

3. 濾紙尿を直接サンプルとする先天性サイトメガロウイルス感染マスキリングが当院でも開始されたので、尿中 CMV が陽性であった 3 例について聴覚スクリーニングおよびその後のフォローを行った。

(倫理面への配慮)

ヘルシンキ宣言および疫学研究に関する倫理指針(平成19年文部科学省・厚生労働省告示第1号)、臨床研究に関する倫理指針(平成16年厚生労働省告示第459号)を遵守した。行政機関個人情報保護法(平成17年4月1日)に従い、個人情報の取り扱いについては十分な注意をもって行った。また実施に当たっては施設の倫理委員会の承認および対象者よりインフォームドコンセントを文書で得て実施した。

### C. 研究結果

1. 当院で非症候性の先天性難聴あるいは進行性・遅発性難聴において臍帯からCMV DNAが2例に検出された。2例の初診時所見は前回報告したが、今回はその後の経過について検討した。

症例1は初診時から両側難聴があり、その後難聴が進行してASSR検査で両耳ともすべての周波数でスケールアウトとなった例である。2歳2カ月で新版K式発達検査を施行したところ、

姿勢・運動：106.4、

認知・適応：106.4

言語・社会：85.9

全領域：95.0であった。

この時点での語彙数(手話・指文字にて)は約400語で、手話・指文字を使って多語文で話し、会話が成立していた。

2歳5カ月で人工内耳埋込術施行。

装用閾値25~30dBとなった。

現在の言語発達は、年齢相応で、3歳代までに習得すると言われている疑問詞「なに」「だれ」「どこ」「どうして」を習得助詞は「の」「と」「が」「を」「に」「で」を習得し、手話から音声への移行も徐々

になされている

症例2は初診が1歳8カ月で、そのときASSRで両側110dB以上と重度難聴が認められた。本例は当院来院まで聴力検査は受けていないため、難聴の発症時期は不明である。CORでも反応は悪い(100dB以上)。2歳6カ月を過ぎたが、まだ補聴器の装用が困難なため、人工内耳の適応ではあるが装用は困難と考え、引き続き補聴器装用を試みている段階である。

2. 先天性の症候性CMV感染症で生下時より難聴がみられた例にガンシクロビル(GCV)の投与を行ったので、その難聴に対する効果をみた。聴力の3ヵ月目までの経過は前回報告したが、ABRは左側については日齢6で閾値80 dBnHLであったものが、徐々に改善し日齢81には30 dBnHLと正常化した。右については、ABRは105 dBnHL無反応で、こちらは改善しなかった。

本例はGCVを12週間投与した後に、パルガンシクロビルを6ヵ月投与した。投与終了後、半年後にABR検査を行ったが、左の閾値は40 dBnHLであり、有効な聴力が保たれていた(図1)。右は変わらず無反応であった。

3. 濾紙尿を直接サンプルとする先天性サイトメガロウイルス感染マスキリーニングが当院でも開始された。尿中CMVが陽性であった3例について、DPOAEおよびABRによる聴覚スクリーニングを行ったところ、いずれも聴力障害はみられなかった。その後も引き続きDPOAEにより聴力のフォローを行っているが、いずれにも難聴は出現していない。またこの3児については神経症状などの症候性CMVの所見は認められて



いない。

#### D. 考察

サイトメガロウイルス (CMV) はヘルペスウイルスの一種であり、先天性難聴の原因として知られている。先天性 CMV 感染による難聴は半数以上が出生時無症候で、難聴の発症が生後 6 ヶ月以降のため、現行の新生児聴覚検査では半数以上が検出できない。また先天性 CMV 感染に伴う難聴は高度難聴の 20% 程度と頻度が高く、生後 4 ヶ月までは抗ウイルス薬 (ガンシクロビル) が難聴に対して有効である。そのため全新生児を対象とした先天性 CMV 感染スクリーニングの意義は大きい。

両側高度難聴児において、保存臍帯での検査から 2 例が先天性 CMV 感染と診断された。1 例は早期 (4 ヶ月) から療育を開始しており、補聴器から人工内耳、また手話から音声への移行がスムーズに行われたが、1 例は初診が 1 歳 8 ヶ月であり、また来院も不規則で補聴器の装用および聴能訓練が進んでいない。そのため人工内耳手術もまだ効果が期待できる段階になっていない。いずれも非症候性 CMV 感染に伴う重度難聴であるが、経過の違いには難聴の発見時期および療育の開始時期と頻度も関与しているものと考えられた。難聴の早期発見と早期介入は、言語習得の臨界期の問題のみでなく補聴器の装用や聴能訓練をスムーズに行うためにも重要であると思われた。

なお、先天性 CMV 感染では重度の精神運動発達遅滞を伴うものから、ほとんど遅滞がないものまでさまざまであるが、発達障害がある場合に人工内耳による聴覚支援がどの程度有効であるかどうかは

明らかになっていないため、ガイドラインでは“慎重な判断を要する”となっている。ただし近年は発達障害児における人工内耳の有用性が徐々に明らかになってきており、両側重度難聴では補聴器の装用が可能であれば人工内耳を活用するという方向に変わっていくものと考えられる。

先天性 CMV 感染に対する治療的としてガンシクロビル (GCV) 6mg/kg × 2 6 週間投与による難聴の改善が期待できるものとされている。今回 GCV 投与を行った症例でも、一側については最初 ABR 閾値が 80 dBnHL であったものが 30 dBnHL と正常化した。ただし治療終了後のウイルス学的リバウンドは必発とされ、長期にわたる治療の有効性を明らかにする必要があるとされている。今回の GCV 投与例は、パルガンシクロビルまで含めた投与終了後、半年後の経過で網脈絡膜炎のみでなく、難聴に対しても効果が持続していた (明らかな再増悪はみられなかった)。今後もさらにフォローする必要があるが、GCV 治療は難聴に対し長期的な効果が期待できるものと思われた。

また先天性 CMV 感染マスキングで陽性となった 3 例については、前回の研究報告通りの聴覚フォローアップ・プログラム (6 ヶ月、1 歳、2 歳、3 歳、5~6 歳) にてフォローを行っている。

#### E. 結論

1. 生後 6 ヶ月までに聴覚障害を発見し、すみやかに療育的介入を行うことが言語獲得において重要とされているが補聴器や人工内耳を用いた聴能訓練をスムーズに行うためにも早期発見・早期療育が推進されるべきであり、そのために

も先天性 CMV 感染マスキングの普及が期待される。

2. 先天性の症候性 CMV 感染症に GCV を投与し、一側の聴力の著明な改善をみたが、投薬中止後 6 ヶ月の時点での再評価では一側について有効な聴力が保たれていた。

3. 濾紙尿を直接サンプルとする先天性サイトメガロウイルス感染マスキングを開始し、3 例の陽性者がみられたが、現在のところ聴力障害は出現していない。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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 : 47-53, 2009
2. 泰地秀信：中等度難聴確定診断のための OAE・気導 ABR と ASSR。小児の中等度難聴ハンドブック，加我君孝ほか編，金原出版 p61-70, 2009
3. 泰地秀信：聴力検査。小児耳鼻咽喉科診療指針，日本小児耳鼻咽喉科学会編，金原出版 p73-77, 2009
4. 泰地秀信：小児急性中耳炎診療ガイドライン 2009 年版。今日の治療指針 2010，山口徹ほか編，医学書院 p1831-1835, 2010

### 2. 学会発表

1. 泰地秀信、守本倫子、南修司郎：全新生児に対する先天性サイトメガロウイルス感染スクリーニングと

感染児の聴覚フォローアップ体制。第 110 回日本耳鼻咽喉科学会，2009.5.16（東京）

2. 泰地秀信、守本倫子：突発性難聴の疑いにて来院され、原因が確定された小児 20 例の検討。第 54 回日本聴覚医学会，2009.10.22（横浜）
3. 中原奈々、泰地秀信、守本倫子、本村朋子：純音聴力と ABR 閾値に乖離のみられる蝸牛神経障害についての検討。第 186 回日耳鼻東京都地方部会，2009.11.14（東京）
4. 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，2010. 1.17（東京）

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

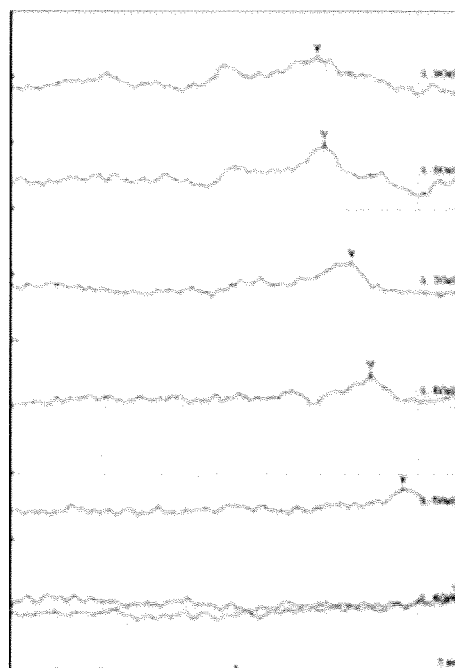


図1 GCV 投与を行い、左聴力が改善した例の投薬終了後 6 ヶ月後の ABR

## 先天性サイトメガロウイルス感染児の 母親のウイルス型別抗体検出法を用いた感染パターンの解析

研究分担者 錫谷 達夫 福島県立医科大学微生物学講座 教授  
浅野 仁覚 福島県立医科大学産婦人科学講座 助教  
研究協力者 生田 和史 福島県立医科大学微生物学講座 助教

### 【研究要旨】

妊娠中にサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus; CMV）の初感染を受けた場合、胎児は約 40 %の頻度で先天性 CMV 感染となる。出生時、感染児の約 90%は無症候性であるが、その 5-15%では後に様々な神経学的後遺症を呈する。先天性 CMV 感染は CMV の重感染によっても引き起こされることが知られているが、どの程度の障害を引き起こすのか、その詳細は不明である。我々は従来のウイルス抗体測定法に CMV の血清型別判定を組み合わせることにより、先天性 CMV 感染が妊娠中の CMV 初感染によるのか、異型 CMV の重感染によるのかを判別する ELISA を確立した。本研究では、この方法を用いて先天性 CMV 感染児 5 例の母親の妊娠中 CMV 感染パターンの解析を試みた。その結果、初感染と考えられる 2 例のほか、判定不能 2 例、母子ともに抗 CMV AD169 型 IgG 抗体のみを保有するにもかかわらず、新生児からは抗 CMV Towne 型 IgM 抗体が検出される特異な 1 例を見出した。

### A. 研究目的

先天性 CMV 感染症は出産 300 例に 1 例程度起こり、そのうち約 10%は症候性感染である。小頭症や水頭症、脈絡網膜炎、聴覚障害、精神発達遅延、紫斑、血小板減少、肝脾腫、肝炎などが認められ、重篤な場合は出生後早期に死亡する。無症候性感染児の多くは障害なく発育するが、約 10%では、後に精神発達遅延、視力障害、難聴、てんかん、けいれんなどを生じる。乾燥臍帯を用いた先天性 CMV 感染の後方視的な疫学調査より、日本人における聴覚障害の約 15%は先天性 CMV 感染

が原因であることが明らかとなった。CMV は既知の胎内感染では最も頻度が高い病原微生物である。先天性 CMV 感染が無症候性にとどまらず症候性感染症となる原因については、胎内感染の成立時期や感染が拡大しやすい妊婦の初感染が推定されている。一方、異なる型の CMV 株に重感染することでも先天性感染が発生することは明らかにされているが、症候性感染となる確率や重症度との関係は不明である。

そこで本研究では、先天性 CMV 感染児の母親の CMV 感染パターンと感染児の臨床経過を解析することを目的に、母児の抗 CMV 型別抗体の測定を

行った。

## B. 研究方法

### 1. 先天性 CMV 感染児の特定

本学附属病院産婦人科ならびに関連病院で出生した新生児の尿は、国立感染症研究所ウイルス一部においてリアルタイム PCR 法を用いた CMV スクリーニング検査に供され、先天性 CMV 感染児を診断した。先天性 CMV 感染児の血液と尿ならびに母親の血液はインフォームドコンセントを得て採取した。血液は Lympholyte H (Cedarlane Laboratories) を用いた密度勾配遠心法により血漿とリンパ球に分離し、-80°C に保存した。

### 2. ELISA 法による CMV 血清型の判定

CMV 血清型別判定には、CMV に対する免疫反応の主要なターゲットである glycoprotein H (gH) のエピトープを抗原とした ELISA 法を用いた。gH は CMV エンベロップ上の糖タンパクであり、ウイルスの細胞への吸着を担っている。CMV AD169 株と Towne 株のエピトープ領域をオリゴヌクレオチド合成により作製し、pGEX-5x プラスミド (Amersham Bioscience) に組み込んだ。作製プラスミドを大腸菌にトランスフェクションし、GST 融合タンパクとしてエピトープを発現させた。発現タンパクは GST カラムを用いて精製後、96 穴プレートに固相化して ELISA 系を作成した。検体として感染児・母親の希釈血漿を使用し、検出系には HRP 標識抗ヒト IgG (または IgM) 抗体、ELISA POD Substrate ABST キット (Nakarai) を

用いた。吸光度測定によって抗体の有無を判定した (図)。また市販のキット・エンザイグノストサイトメガロ/IgG (または IgM) (SIEMENS) により、抗 CMV IgG、IgM 抗体の有無も検討した。

### 3. ダイレクトシーケンス法による感染 CMV 型判定

先天性 CMV 感染児の尿より QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、Expand High Fidelity PCR System (Roche) を用いた PCR 法により CMV gH 領域を増幅した。PCR 産物を MinElute PCR purification kit (Qiagen) で精製し、DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing kit (GE Healthcare) でラベリング反応を行った後、ABI PRISM 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems) により塩基配列の決定を行った。決定された塩基配列はデータベース上の塩基配列：CMV AD169 株 (GenBank accession # NC001347) CMV Towne 株 (GenBank accession # FJ616285) とのホモロジー検索により、型別判定を行った。

## C. 研究結果

新生児尿のスクリーニング 1916 例中 5 例において CMV が検出された。CMV 型判定の結果は別表のとおりである。先天性 CMV 感染児 5 例について検討した結果、CMV IgG 抗体は母子ともに同型であり、4 例は AD169 型、1 例は Towne 型であった。新生児尿中の CMV 型をシーケンスで同定した結果は 5 例全て IgG から同定した型と一致した。市販キットを用いた IgM 検出では母子ともに

陽性が1例(20026)、母親または新生児のみ陽性例がそれぞれ1例であった(20040、20270)。母親でIgM陽性の2例は初感染による先天性CMV感染と考えられた。新生児のみIgM抗体陽性であった例は(20270)、IgG抗体は母子ともにAD169型であるにもかかわらず、IgM抗体はTowne型が検出された。この新生児尿からは、IgG抗体と同型であるAD169型のみが検出され、Towne型は検出されなかった。

#### D. 考察

先天性CMV感染の5例においてCMV IgGが母子ともに同型であるのは、新生児で母親の移行抗体が検出されているためである。母親にIgM抗体が検出できた2例(20026、20040)が妊娠中の初感染であることは明らかであったが、IgMが陰性であった20117と21558が初感染であったのか、既に潜伏感染していたウイルスの再活性化によるのか、あるいは本検査では区別できない第3のウイルス型の重感染であったのかは断定できない。今後、avidity testによって感染時期を推定していく予定である。

母親にはない抗Towne株IgMが検出された20270については、出産2ヶ月後の母親の抗体を再検したが、やはり母親は抗AD169 IgG抗体しか持っていなかった。また、出生直後の抗体検査も再検したが、胎児に抗Towne IgM抗体が検出され、結果は再現された。以上の結果から、母親がTowne型のウイルスに重感染していることは明らかではない。ではこの症例は何を意味するのであろうか。次のような仮説を立てた。

- ① AD169の重感染:もともとTowne型に感染していた母親が妊娠中にAD169に重感染し、そのウイルスが胎児に感染した。AD169に重感染した際、もともと潜伏感染していたTowneが再活性化し、胎児にも感染したが、免疫がないため増殖が活発であるAD169が新生児の尿から検出された。こう考えた場合、胎児が抗AD169 IgMを産生しない理由が説明できない。
- ② Towneの重感染:もともとAD169が感染していた妊婦にTowneが重感染した。この重感染に伴って、潜伏感染していたAD169が再活性化し、胎児には両タイプのウイルスが感染したという仮説である。しかし、既に妊婦が免疫を持っているAD169が、新たに感染したTowneよりも良く増殖し、胎児で主に増えているとは考え難いうえ、なぜ胎児の免疫がマイナーな株であるTowneに対して反応したかが説明できない。
- ③ 上行性のTowne感染:精液中に含まれるウイルスが上行性に胎児に感染する経路については、証明はないものの以前から想定されていた。もし、Towneが上行性に胎児に感染した場合、抗体検査の結果は全て説明が付く。しかし、胎児の尿からAD169が検出されるという事実は説明できない。

いずれにせよ、胎児の尿に本当にAD169しかいないのか、わずかにTowneが混在しているのかを精度を上げて検査する必要がある。現在行っているダイレクトシーケンスによる検査では、一方

の株がポピュレーションの9割程度を占める場合、少数の株は見落とされる。そこで、わずかな株の混在も定量的に検出できる新たな検査法を現在開発中である。

今回検査した5例中、症候性感染は20026のみであり、残念ながら重感染と疾患の関係は解析できなかった。今後、他施設の症例を含め、症例数を増やして検討して行くことが重要である。

## E. 結論

先天性CMV感染児5例について児と母親の抗体検査を行った。その結果、2例は妊娠中の初感染、2例は判定不能、1例は児にのみ混合感染が認められた。

## F. 健康危険情報

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. Association between antibody response against cytomegalovirus strain-specific glycoprotein H epitopes and HLA-DR. *Microbiol Immunol* 53; 412-416, 2009

### 2. 学会発表

- 1) Kazufumi Ikuta, Kimisato Asano,

Shin Koyano, Naoki Inoue, Kei Ishibashi and Tatsuo Suzutani. Strain-specific cytomegalovirus (CMV) seroepidemiology in mothers and neonates with congenital CMV infection. 14<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infection. Kobe 2009.

- 2) 生田和史、小川 洋、新井義文、小杉伊三夫、大森孝一、錫谷達夫. サイトメガロウイルス感染モデルマウスを用いた聴覚障害の解析. 第57回日本ウイルス学会. 東京、2009.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

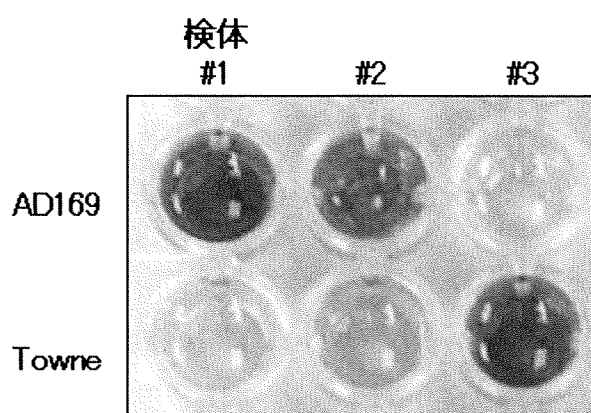


図. ELISA法による血清型の判別例

#1: AD169 型抗体陽性

#2: AD169 型、Towne 型陽性

#3: Towne 型抗体陽性

CMV 感染例	市販キット		gHIによる型判定		gB		尿中のウイルスDNA		
	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	Copies / ul	gH sequence	
20026	新生児	+	+	-	AD169	-	+	4.1x10 <sup>4</sup>	AD169
	母親	+/-	+	-	AD169	-	+		
20040	新生児	-	+	-	AD169	-	+	6.6x10 <sup>3</sup>	AD169
	母親	+	+	-	AD169	-	+		
20270	新生児	+	+	Towne	AD169	-	+	2.3x10 <sup>3</sup>	AD169
	母親	-	+	-	AD169	-	+		
20117	新生児	-	+	-	Towne	-	+	2.2x10 <sup>1</sup>	Towne
	母親	-	+	-	Towne	-	+		
21558	新生児	-	+	-	AD169	-	+	5.3x10 <sup>3</sup>	AD169
	母親	-	+	-	AD169	-	+		

表. 先天性 CMV 感染における血清型別抗体の検出と  
新生児尿中に排泄される CMV 型の判定

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

分担課題 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】**

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、昨年度に確立した HLA タイピング法、MHC tetramer を用いた CMV 特異的 T 細胞の検出・定量法、CMV 抗原刺激に応答して IFN- $\gamma$  を産生する CMV 特異的 T 細胞の検出・定量法を用いて、先天性 CMV 感染児 10 例について CMV 特異的免疫応答に関する解析を行った。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- $\gamma$  産生能などの機能を保持していること、しかしその応答性は健常成人の応答性と比較すると低いレベルにあることを示唆する解析結果が得られた。また、先天性 CMV 感染児の CMV 特異的免疫応答の特徴をさらに明らかにする目的で、後天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答との比較解析を開始した。

**A. 研究目的**

先天性 CMV 感染症の発症機構を解明する上で、先天感染児における CMV 特異的免疫応答は病態形成に影響を及ぼし得る宿主側の要因の一つと推定される。本研究は、未だ不明な点の多い先天性 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ことを目的とする。また、先天性 CMV 感染児の臨床経過（症候性・

無症候性・遅発性障害発症など）と CMV 特異的免疫応答との経時変化を追跡調査することで、両者の関連性の有無について明らかにし、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としての CMV 特異的免疫応答解析の有用性についても検討することを目的とする。

平成 21 年度は、平成 20 年度に確立した HLA タイピング法、MHC tetramer を用いた CMV 特異的免疫



細胞の検出・定量法、CMV 抗原刺激による IFN- $\gamma$  産生細胞の検出・定量法 (図 1、2、5) を用いて、先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の解析を継続した。また、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ために、健常成人に加えて後天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答についても解析を開始した。

## B. 研究内容

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

#### (方法)

先天性 CMV 感染児より採取した末梢血より genomic DNA を抽出し、HLA-A 遺伝子および 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。PCR に使用したプライマーは、HLA-A 遺伝子領域の増幅には

5'-TTCTCCCCAGACGCCGAGGATGGCC-3'および

5'-TGTTGGTCCCAATTGTCTCCCCTC-3'を用い、HLA-B 遺伝子領域の増幅には

5'-ACCCACCCGGACTCAGAATCTCCT-3'および

5'-GGAGGCCATCCCCGGCGAYCTAT-3'を用いた。シークエンス用プライマーとして、

5'-GGATCTCGGACCCGGAG-3'を用いて、ダイレクトシークエンス法により HLA-A 遺伝子および HLA-B 遺伝子領域の PCR 産物の塩基配列を決定

し、得られた塩基配列をデータベース (dbMHC) を用いて解析し、HLA タイピングを行った。

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 (Medical & Biological Laboratories) を用いて末梢血単核球 (PBMC) を染色し、フローサイトメーターにより CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞を検出した。さらに、CMV 抗原刺激に対する CMV 特異的 CD8 陽性 T 細胞の増殖能を解析する目的で、CMV 蛋白質 pp65 (65kDa lower matrix phosphoprotein)由来のペプチド抗原 (Miltenyi Biotec) を用いて PBMC を刺激し、IL-2 存在下で 1 週間培養した後、MHC tetramer を用いて CMV 特異的 CD8 陽性 T 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 (JPT Peptide Technologies) を用いて同様の実験を行った (図 1、2)。

#### (結果)

HLA タイピングの結果をもとに、MHC tetramer を用いて pp65 蛋白質を特異的に認識する CD8 陽性 T 細胞の検出を行った。9 例中 7 例において pp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞が検出された (CD8 陽性細胞の 0.1~0.6%)。次に、pp65 由来ペプチド抗原を用いて PBMC を刺激し、IL-2 存在下で 1 週間培養した後、pp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出を行った (図 4 に解析結果例を示す)。その結果、9 例中 6 例で pp65 特異的 T 細胞の増加 (0.2~1.1%)、2 例で減少 (0~0.2%) した。残り 1 例については、ペプチド

抗原の有無にかかわらず、pp65 特異的 T 細胞は検出されなかった。対照として、健常成人における pp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞を解析した結果、pp65 ペプチド抗原刺激前が 0.1%、刺激後には 4.5%に増加した（図 3 にフローサイトメーターを用いた解析例を示し、図 4 および表 1 に解析結果を示した）。

## 2) CMV 抗原刺激による IFN- $\gamma$ 産生 T 細胞の検出・定量

### (方法)

CMV 抗原に対する T 細胞応答は、先天性 CMV 感染児においても CMV 感染を制御する上で重要な役割を果していると推定される。先天感染児における CMV 特異的 T 細胞の CMV 抗原に対する応答性を明らかにする目的で、CMV 特異的 T 細胞の主要な標的蛋白質と考えられている pp65 および IE-1 (72 kDa major immediate early protein; Miltenyi Biotech) 由来のペプチド抗原を用いて、先天性 CMV 感染児の PBMC を刺激した後、ペプチド抗原に応答して IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞あるいは CD4 陽性 T 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（図 5）。

### (結果)

10 症例の先天性 CMV 感染児の PBMC を pp65 または IE-1 由来のペプチド抗原で刺激した後、IFN- $\gamma$  を産生する CD8 あるいは CD4 陽性 T 細胞をフローサイトメーターで検出した。その結果、pp65 ペプチド抗原で刺激

した場合、IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞は 0~0.5%の割合で検出され、IFN- $\gamma$  を産生する CD4 陽性 T 細胞は 0~0.4%の割合で検出された。健常成人では、IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞の割合はそれぞれ 1.2%、0.5%であった。一方、IE-1 ペプチド抗原で刺激した場合、IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞は 0~0.5%の割合で検出され、IFN- $\gamma$  を産生する CD4 陽性 T 細胞は 0~0.5%の割合で検出された。健常成人では、IFN- $\gamma$  を産生する CD8 陽性 T 細胞および CD4 陽性 T 細胞の割合はそれぞれ 4.5%、0.1%であった（図 6、7 にフローサイトメーターを用いた解析例を示し、図 8、9 および表 1 に解析結果を示した）。

## 3) 後天性 CMV 感染時における CMV 特異的免疫応答の解析

先天 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の特徴を理解するためには、健常成人の免疫応答に加えて、後天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答との比較解析が重要と考えられる。そこで、CMV の後天感染が明らかな症例について、CMV 特異的免疫応答の解析を開始した（図 10 に 2 歳 5 ヶ月の後天性 CMV 感染児における CMV ペプチド抗原刺激に対する T 細胞応答を解析した結果を示した）。

## 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を示唆する結果が得られている。また、CMV 特異的免疫細胞は CMV 抗原に反応して増殖反応および IFN- $\gamma$  産生能を示すことから、先天性 CMV 感染児においても機能性を保持する CMV 特異的免疫細胞が存在する可能性が示唆された。しかし、先天感染児の CMV 特異的免疫応答は、健常成人の CMV 特異的免疫応答と比較すると低いレベルにある可能性を示唆するデータも得られた。

先天性 CMV 感染児の CMV 特異的免疫応答の特徴を明らかにする上で、先天性および後天性 CMV 感染児間で CMV 特異的免疫応答を比較することが重要と考えられる。そのため、健常成人に加えて後天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の解析も開始しており、今後もより多くの症例の解析を行うことで、先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の特徴を理解することが可能になるものと考えられる。

また、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明らかにするためには、臨床経過ならびに免疫応答についての経時的な解析データの蓄積を引き続き行うことが重要と考えられた。

#### D. 研究発表

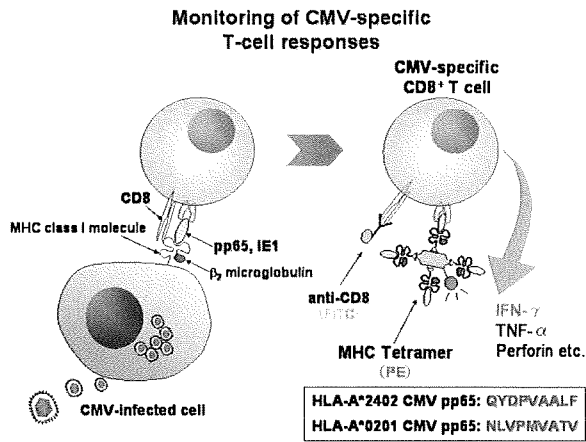
1. 論文発表  
なし
2. 学会発表

1. Hiroyuki Nakamura, Huanan Liao, Chizuka Henmi, Ken-ichi Imadome, Misako Yajima, and Shigeyoshi Fujiwar. Cellular immunological responses to CMV in congenitally CMV-infected infants. 14<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe, Japan, October 6-8, 2009.
2. 中村浩幸、廖 華南、逸見千寿香、今留謙一、矢島美彩子、藤原成悦. 先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の解析. 第 24 回ヘルペスウイルス研究会. 2009 年 7 月 2-4 日、裾野.
3. 中村浩幸、廖 華南、逸見千寿香、今留謙一、矢島美彩子、藤原成悦. 先天性 CMV 感染児における CMV 特異的 T 細胞応答. 第 57 回日本ウイルス学会学術集会. 2009 年 10 月 25-27 日、東京.

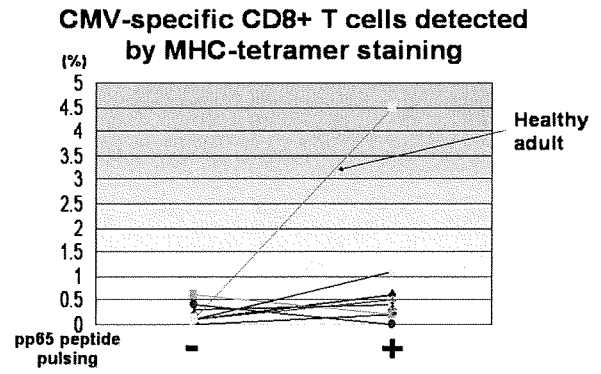
#### E. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

☒ 1

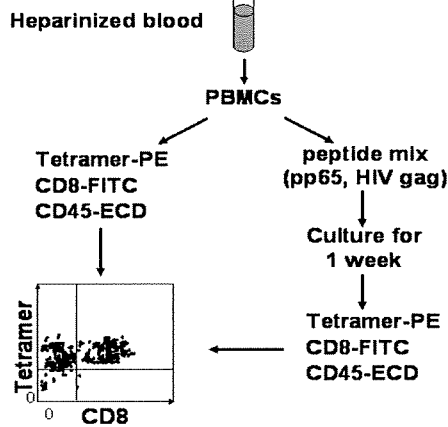


☒ 4

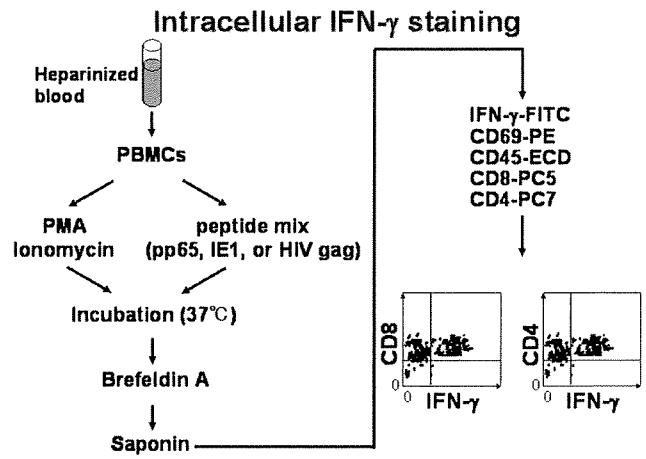


☒ 2

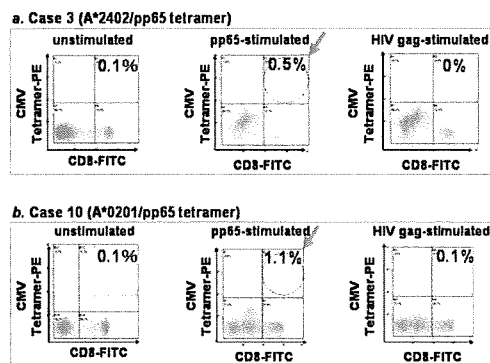
**MHC-peptide tetramer staining**



☒ 5



☒ 3



☒ 6

