

図 7

b. Case 4

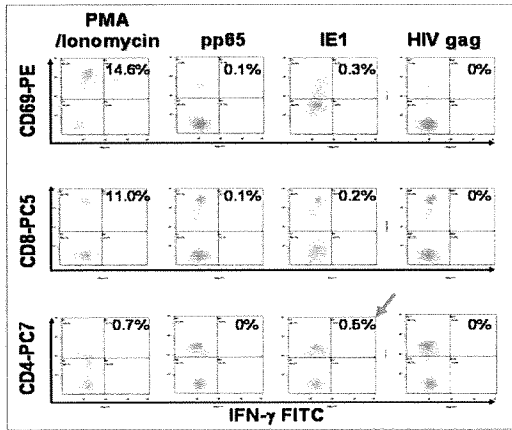


図 10

CMVペプチド抗原刺激によるIFN- γ 産生細胞の検出
(後天性CMV感染児)

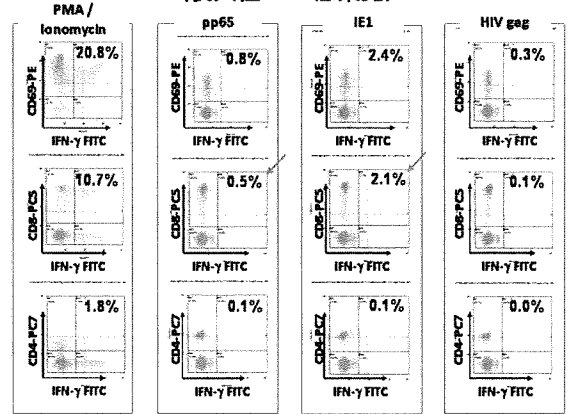


図 8

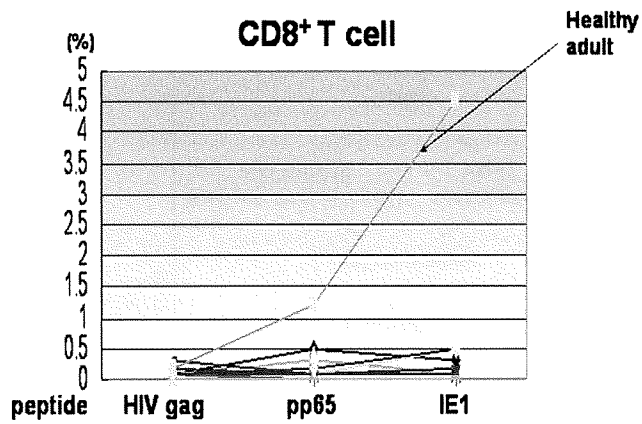
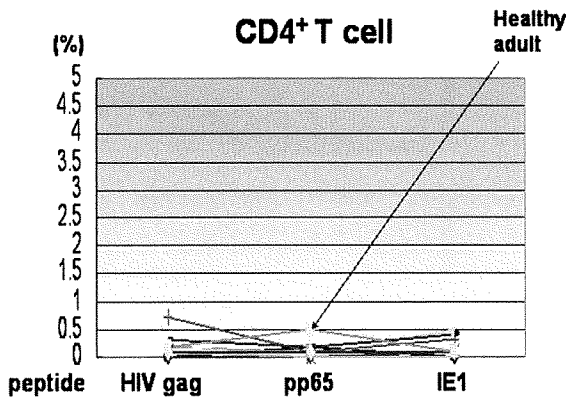


表 1

Case	Symptom	Age	HLA type	MHC tetramer		IFN- γ producing cells (Upper row: CD8 ⁺ ; lower row: CD4 ⁺)		
				pp65 unstimulated	pp65 stimulated	HIV gag	pp65	IE1
1	AS	6 m	A*2402	0.1%	0.6%	0.1%	0.6%	0.3%
2	AS	6 m	A*0206	0.6%	0.2%	0.0%	0.2%	0.0%
3	AS	2 m	A*2402	0.1%	0.6%	0.2%	0.1%	0.1%
4	AS	2 m	A*0201	0.0%	0.0%	0.0%	0.4%	0.1%
5	AS	3 m	A*0201	0.3%	0.4%	0.0%	0.1%	0.2%
6	AS	1 m	A*0201	0.4%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
7	AS		A*0201	0.1%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%
8			A*2402	0.0%	0.2%	0.7%	0.1%	0.3%
9						0.3%	0.2%	0.4%
10	AS—hearing loss	2 y	A*0206	0.1%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%
Control	Healthy adult		A*0201	0.1%	4.6%	0.1%	0.0%	0.0%
						0.2%	1.2%	4.5%
						0.2%	0.6%	0.1%

AS, asymptomatic; NT, not tested.

図 9



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】

昨年度に引き続き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。これまでに 16,842 検体を検査し、55 検体が CMV 陽性であることを明らかにした。本年度分に限ると、2 月末までの 11 ヶ月間で 10,278 検体を検査し 33 検体が CMV 陽性であった。同定した感染児のうち 23 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 株の遺伝子配列を比較した。解析した 17 中 3 例が同胞尿中に十分な CMV 量がない、もしくは陰性のため遺伝子型解析が確保できなかったが、14 例については解析ができ、1 ペアを除き残りの 13 ペア間で CMV 株が同一であることを明らかにした。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。また、今年度、他の分担及び協力研究者からの CMV 定量などの検査を総計 353 検体について行った。

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、妊婦に初感染が起こ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採取された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常小児の尿。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 プロブ(表 1)、5 μ g BSA(NEB)と 100ng サケ精子 DNA 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°C 15 秒 58°C 30 秒及び 72°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、eppendorf 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°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 のいずれでも同条件で測定可能である。なお、UL83 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。

(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・神戸大・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、本年度分については平均 1.1 日で、4 日を越えたケースは全体の 1.8% で最長 7 日であった(図 1)。日数を要したケースは、金曜午後検体が到着し、月曜が休日であったり、5 月の連休などの理由によるものが大半であった。

2 月末日までに総計 16,842 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、57 例であった。5 例が 2 次検査で反応当り 9-90 コピー、即ち、元の尿で 1ml 当り 3×10^4 - 10^5 コピー程度であった。このうち、3 例が、追加の尿検体においても陽性で、予想された程度の低値の CMV 量であった。これらのうち 2 例ではウイルス分離も可能であった。このことは、スクリーニングで従来考えられたよりも低い CMV 量を陰性・陽性を判定するための閾値に設定する必要があることを示唆している。一方、2 次検査陽性の 5 例のうち、2 例については擬陽性であることがわかり、最終的に 55 例が先天性感染と確認された。なお、スクリーニングを待たずして典型的な臨床症状から先天性 CMV 感染が 6 例で疑われ、スクリーニングが確定診断とされた。施設ごとの陽性率の内訳は、表 2 に示したが、55 例

の先天性 CMV 感染症例に有為な地域差は認めなかった。なお、2035 検体(うち 8 例は感染児)は、旭川医大で本研究班が成立する以前に収集し、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を中心に先天性感染確定した児 23 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。近々に同定された例を除き顕性 2 例不顕性 15 例の結果を図 2 に示した。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

現在までに判明して範囲で、CMV 感染症 47 例中 31 例に年長同胞がいる。同胞からの検体の入手が可能であった 15 例中 12 例が尿中に遺伝子型解析に十分な CMV 量が確保できた。また、スクリーニング以外で入手された 2 ペアを加え、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 14 ペアで解析した。1 ペアを除き残りの 13 ペア間で CMV 株が同一であった(表 3)。これらの結果は、先

天性感染が同胞から妊婦へ感染した結果、もしくは、母親から家族内に存在した株が再活性化により感染した結果と考えられた。

4. 抗ウイルス治療などに伴う CMV 量のモニター

本年度は、スクリーニングで同定し難聴のため治療を行った東大の症例のほか、顕性感染のため治療を行った横浜市大、東京医大の症例など抗ウイルス薬治療を行った 4 例について、ウイルス分離とウイルス DNA 量の経時的変化を解析した。東京医大の症例では、昨年度の成育医療センターの症例同様、血漿中 CMV 量と臨床症状との間に相関が見られたので、さらに多くの症例で同様の結果となるか慎重に検討していきたい。

先天性感染を疑うような症例の確定診断などにも相当の精力を注いで協力した。今年度これまでの 11 ヶ月間で、班員及びその協力研究者から送付された尿検体 114、血液検体 90 (血漿・血球に検査するため、検査検体としては 180)、乾燥臍帯検体 42、母乳・髄液・羊水などその他の検体 17、総計 353 検体を解析した。

D. 考察

昨年度秋までに各倫理委員会の承認が終了して以降スクリーニングは順調に進んでおり、本年度 4 月 1 日からに限ってみると、11 ヶ月間で 10,278 検体を感染研で検査したこととなり、年間 1 万人のスクリーニング目標を超過達成できた。予想された 200-250 人にひとりの頻度より若干少ない 300 人にひと

り、すなわち今年度 33 検体が CMV 陽性であった。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、あらためて全新生児 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 600 円程度で検査が実施できると試算しているが、施設ごとに 1 検体収集するために使用した濾紙枚数が 1.1-2.0 程度とバラつきがあり、さらに 1 次検査で陽性となったものの 2 次検査や最終確認のための追加検体からの DNA 精製と定量に要する費用も勘案すると、スクリーニングの実際のコストは一人 800-850 円程度になっている。

感染児と同胞兄弟間で、1 例を除き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。母親の血清学検査が最終的には必要であるが、ウイルスの遺伝子検査結果は、多くの場合、同胞の尿などの体液を起源として、母親から第 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も、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。

これまで、当研究室は藤枝班の検査センター的役割を担ってきているが、班員や協力研究者からの検査依頼が膨大であり、完全にリソースが不足している。今後こうした状況をどう改善している

かについては検討の余地がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 井上直樹 「母子感染」(川名尚、小島俊行編)4-3章 CMV 児の診断と疫学
- 2) N Inoue. Chapter 36 Cytomegalovirus, *In Molecular Detection of human viral pathogens*. (Ed) D. Liu, Taylor & Francis CRC Press, *In press*.
- 3) S Koyano, N Inoue, T Nagamori, H Yan, H Asanuma, K Yagyū, 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* 2009, 48:e93-5.
- 4) K Shoji, N Ito, Y Ito, N Inoue, S Adachi, T Fujimaru, T Nakamura, S Nishina, N Azuma, A Saitoh. Is a six-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J. Pediatr. In press*.
- 1) N Inoue. Newborn CMV screening and genotyping of congenital cases. (Invited lecture) 12th International CMV & Betaherpesvirus Workshop, Boston, USA, May 2009.
- 2) S Yamada, N Nozawa, H Katano, Y Fukui, M. Tsuda, Y. Tsutsui, I. Kurane, N. Inoue. Characterization of the guinea pig CMV genome locus that encodes homologs of human CMV major immediate-early genes, UL128, and UL130. 34th International Herpesvirus Workshop, Ithaca NY, USA, July 2009.
- 3) S Yamada, M Kato, H Katano, Y Fukui, M Tsuda, Y Tsutsui, N Nozawa, I Kurane, N Inoue. Characterization of guinea pig CMV GP129 and GP131, orthologs of HCMV UL128 and UL130, which are essential for efficient viral growth in vivo but not in vitro. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe, Oct. 2009.
- 4) T Nagamori, S Koyano, N Inoue, H Yamada, M Oshima, K Fujieda. A congenital cytomegalovirus case occurred by viral reactivation more than 2 years after an abortion due to the same strain. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe, Oct. 2009.
- 5) M Ikuta, K Asano, S Koyano, N Inoue, K Ishibashi, T Suzutani. Strain-specific cytomegalovirus (CMV) seroepidemiology in mothers and neonates with congenital

CMV infection. 14th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Kobe, Oct. 2009.

- 6) 井上直樹、古谷野伸、山田壮一、錫谷達夫、倉根一郎:ゲノムタイプ解析から予想されるヒトサイトメガロウイルス株間での高頻度な相同組換え:第57回日本ウイルス学会学術集会、東京、2009年11月
- 7) 井上直樹「出生直後の自動 ABR で発見された先天性サイトメガロウイルス

感染症の1例」(演者:中島準也先生)に対する指定発言、第570回日本小児科学会東京都地方会講話会、東京、2009年12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	TCTCGTATTACAAACCGCGGAGAGGATG	738	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m] x 40, 72C/10m
UL144-R		ACTCAGACACGGTCCGTAAGTGCTTC		
UL144-F2	2nd	TTCCGGTAGGAGGCATGAAG	587	94C/2m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/1m20s] x 40, 72C/10m
UL144-R2				
gN				
gN-F1	1st	GACAGTACCAGTTGAGAGTCCG	595	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m] x 40, 72C/10m
gN-R1				
gN-up	2nd	TGGTGTGATGGAGTGGAAC	420	94C/2m, [94C/45s, 60C/45s, 72C/1m] x 40, 72C/10m
gN-lw				
# 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

	施設(数)	旭川(3)	札幌(1)	福島(4)	成育(1)	東大(1)	千葉(1)	藤田(3)	神戸(3)	長崎(6)	全体
	分担者	古谷野	山田	浅野	伊藤	岡	岡	吉川	山田	森内	
スクリーニング数 [先天性感染児]	20年度以前	2,035 [8]									2,035 [8]
	20年度	1,583 [4]	139 [0]	622 [4]	212 [0]	138 [1]	439 [1]	377 [1]		1,019 [3]	4,529 [14]
	21年度 (2月末現在)	1,488 [8]	211 [0]	1,427 [2]	1,015 [4]	800 [4]	1,820 [2]	714 [5]	691 [3]	2,112 [5]	10,278 [33]
	総数	5,106 [20]	350 [0]	2,049 [6]	1,227 [4]	938 [5]	2,259 [3]	1,091 [6]	691 [3]	3,131 [8]	16,842 [55]
先天性CMV感染頻度(%)		0.39	0.00	0.29	0.33	0.53	0.13	0.55	0.43	0.26	0.33

表3 遺伝子型解析による感染経路の検討

No.	施設	先天感染児		遺伝子型		同胞 尿(*羊水)	塩基配列 の一致	遺伝子型	
		ID	尿検体	gN	UL144			gN	UL144
1	旭川	C97	C97	4c	B	C211	同一	4c	B
2	旭川	10744	C196	4b	B	C231	同一	4b	B
3	旭川	12034	C106	1	B	C206	同一	1	B
4	旭川	12542	C164	2	A	C168	同一	2	A
5	旭川	12571	C177	3a	A	C218	同一	3a	A
6	旭川	12999	C185	4b	C	C195 C199	同一	4b	C
7	旭川	19382	C369	4a	C	C372	同一	4a	C
8	福島	20270	/	3a	C	(福島)	同一	3a	C
9	藤田	71035	F04	1	A	F05	同一	1	A
10	藤田	72072	F49	3b	C	F50	同一	3b	C
11	藤田	70462	F47	1	C	F48	同一	1	C
12	その他		Y34	2	A	Y35	同一	2	A
13	その他		Y42	4c	A	Y45	同一	4c	A
14	長崎	83436	F32	1	B	F33	異なる	1	A
15	旭川	16503	C251	3a	B	C253-5	陰性		
16	旭川	19389	C373			C376	陰性		
17	藤田	71306	F51			F52	陰性		

図1 検体受領から結果報告までの日数(平成21年度分)

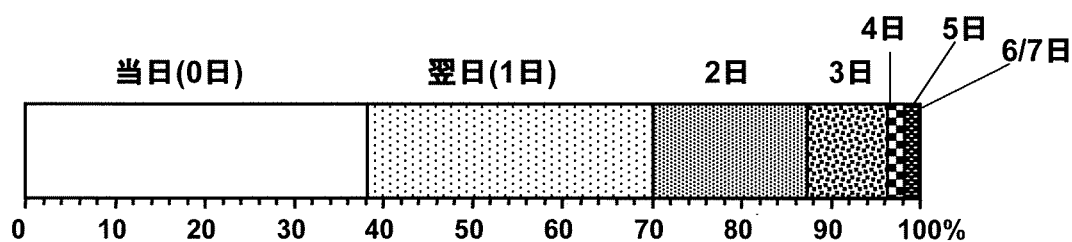
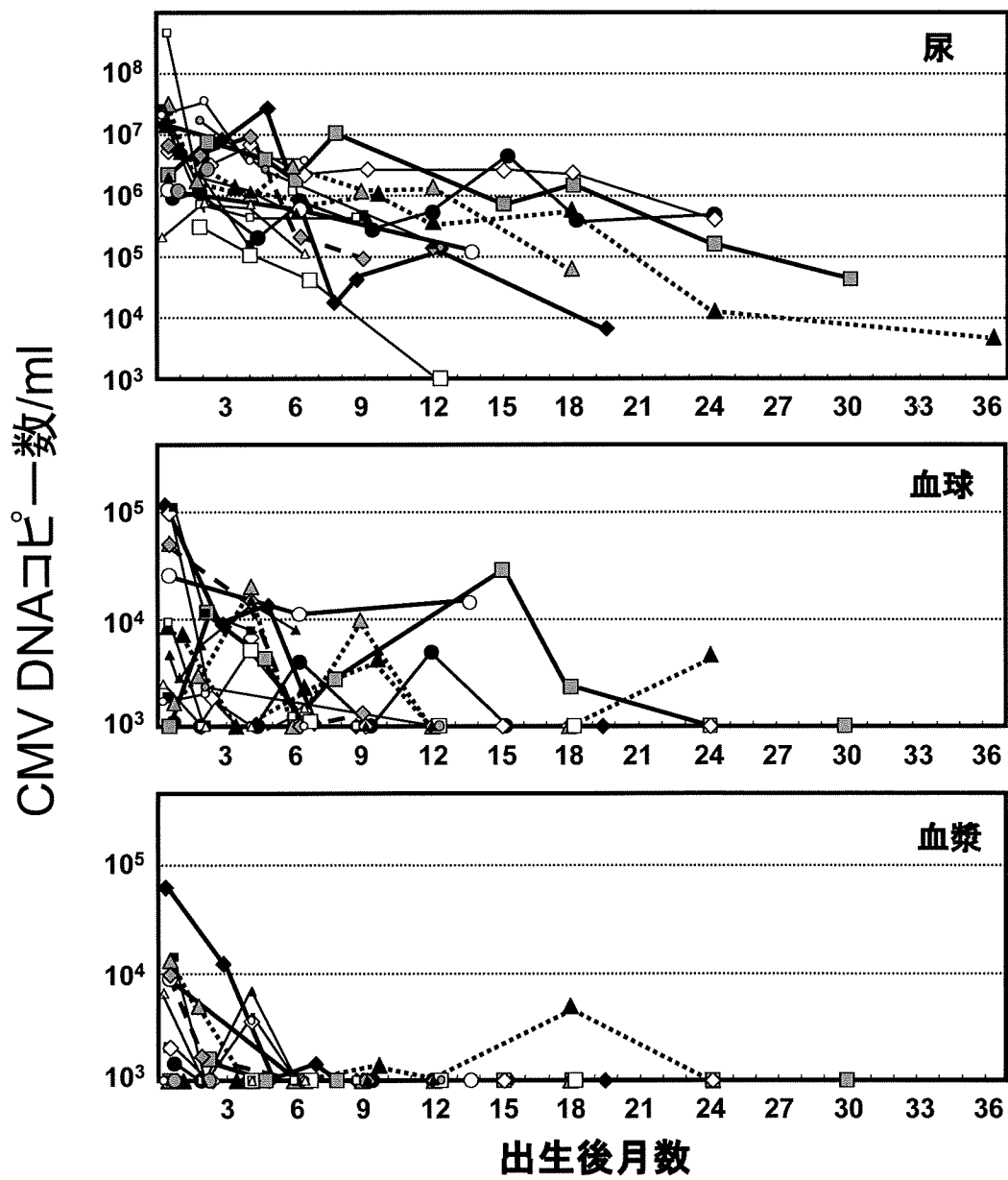


図2 先天性CMV感染児のウイルス学的フォロー



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（バルカンシクロビル塩酸塩製剤）はフィルムコ

ーディングしてあるが、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 はバリキサ錠粉砕粒 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 未満となったら、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 21 年度第 1 回班会議プログラム

時： 平成 21 年 6 月 26 日（金）、13 時～17 時
場所： 国立感染症研究所 共用第 1 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のご挨拶

<スクリーニング>

13:10～14:10

1. ○井上直樹(国立感染症研究所ウイルス1部)
スクリーニングの進行状況及び遺伝子型解析の結果
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
3. ○中井英剛、田中健一、大橋正博、吉川哲史(藤田保健衛生大学小児科)
先天性CMV感染スクリーニング：藤田保健衛生大学関連の現状
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)
福島県内のスクリーニング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感染マススクリーニング in 長崎：経過報告
6. ○大石勉(埼玉県立小児医療センター感染免疫科)
先天性サイトメガロウイルス感染スクリーニングの進捗状況

<検査・免疫>

14:10～14:30

7. ○中村浩幸、今兼謙一、廖華南、逸見千寿香、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感染児におけるCMV特異的免疫応答の解析
8. ○生田和史、錫谷達夫(福島県立医科大学微生物学教室)
サイトメガロウイルスの型別抗体価測定の中間報告

14:30～14:40 休憩

<臨床像に関する研究>

14:40～15:40

9. ○岡明(杏林大学小児科)
先天性サイトメガロウイルス感染症の頭部画像所見と診断用シート作成