

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 法により増幅した後、PCR 産物の塩基配列をダイレクトシーケンシング法により決定し、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 タイプが、HLA-A*2402、-A*0201、-A*0206、-B*1501 である検体については、MHC クラス I 分子および CMVpp65 (65kDa lower matrix phosphoprotein) 由来ペプチドを 4 量体化した MHC tetramer を用いて末梢血単核球 (PBMC) を染色し、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 由来のペプチド抗原 (Milteny Biotech 社) を用いて PBMC を刺激し 1 週間培養した後、MHC tetramer を用いて CMVpp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞の検出を行った。対照実験として、HIV gag 蛋白質由来のペプチド抗原 (JPT Peptide Technologies 社) を用いて同様の実験を行った。

2) CMV 抗原刺激による IFN- γ 産生 T 細胞の検出・定量

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) 由来のペプチド抗原を用いて PBMC を刺激し IFN- γ 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。

(倫理面への配慮)

本研究は、各研究者が所属する機関および関連機関の倫理委員会の承認を得て行われた。研究目的を十分説明した上で、書面での同意に基づいて検体採取を行い、採取された検体はコード番号化することで連結可能匿名化が行われた。

C. 研究結果

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

後天性 CMV 感染児 4 例における HLA タイピングの結果は、A*2402 が 2 名、A*0201 が 1 名、B*1501 が 1 名であり、MHC tetramer 法により 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。その結果、4 例中全てにおいて pp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞は検出されなかった (表 1)。次に、pp65 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結果、4 例中 1 例で pp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞の増加 (0.2%) を認めた。残り 3 例については、pp65 ペプチド抗原刺激後も pp65 特異的 T 細胞は検出されなかった (表 2、図 2)。

2) CMV 抗原刺激による IFN- γ 産生 T 細胞の検出・定量

後天性 CMV 感染児 4 症例の PBMC を pp65 または IE-1 由来のペプチド抗原で刺激した後、IFN- γ 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- γ を産生する CD8 陽性 T 細胞は 0~0.5%の割合で検出され、IFN- γ を産生する CD4 陽性 T 細胞は 0~0.2%の割合で検出された。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 T 細胞は 0~2.1%の割合で検出され、IFN- γ を産生する CD4 陽性 T 細胞は 0~0.2%の割合で検出された (表 2、図 3)。

D. 考察

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、本年度は先天性 CMV 感染児の解析に加えて、後天性 CMV 感染児 4 例についても CMV 特異的免疫応答を解析した。

MHC tetramer を用いた解析結果より、後天性 CMV 感染児全例において CMV 特異的免疫細胞を pp65 ペプチド抗原刺激前には検出することはできなかった。また、pp65 ペプチド抗原刺激後に pp65 特異的 CD8 陽性 T 細胞の増加を認めたのは 1 例のみであった。また、CMV ペプチド抗原に反応して IFN- γ 産生能を示す T 細胞については、2 歳 5 ヶ月の症例において IE-1 ペプチド抗原刺激により明らかな産生細胞の増加を認めた(表 2、図 3a)。

これらの結果から、後天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答は、一部の症例で認めたものの、先天性 CMV 感染児の場合と同様に、健常成人と比較すると低いレベルにあることが示唆され、先天感染児と後天感染児との間で、CMV 特異的細胞性免疫応答についての明らかな差異は認めなかった。

2 歳 5 ヶ月の症例において、IE-1 刺激に

伴う IFN- γ 産生 CD8 T 細胞が増加を示したことから、先天感染児および後天感染児において、発育に伴う CMV 特異的免疫応答の継時変化を比較解析することが先天性 CMV 感染児の免疫応答の特徴を明らかにする上でも重要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. Nakamura H, Liao H, Fujiwara S, et al. Cellular immunological responses to CMV in congenitally CMV-infected infants identified by a pilot newborn CMV screening study in Japan. 3rd Congenital Cytomegalovirus Conference. September 23, 2010.
 2. 廖 華南、Jung-Hyun Lee、井上直樹、宮戸健二、藤原成悦、中村浩幸. ヒトサイトメガロウイルス UL136 領域に見出された新規遺伝子産物. 第 58 回日本ウイルス学会学術集会. 2010 年 11 月 7-9 日、徳島.

H. 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

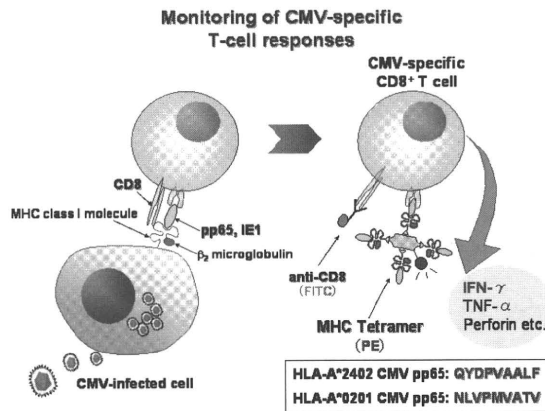


図 2

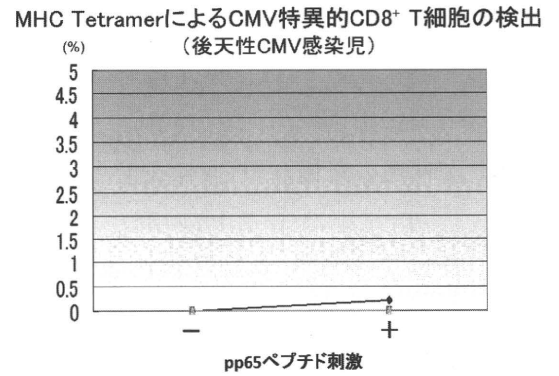


表 1

CMV特異的細胞性免疫応答(先天性CMV感染児)

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	6m	A*2402	0.1%	0.6%	0.1%	0.5%	0.3%
2	AS	6m	A*0206	0.6%	0.2%	0.1%	0.3%	0.1%
3	AS	2m	A*2402	0.1%	0.5%	0.0%	0.4%	0.1%
4	AS	2m	A*0201	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.2%
5	AS	3m	A*0201	0.3%	0.4%	0.1%	0.0%	0.1%
6	AS	1m	A*0201	0.4%	0.0%	0.1%	0.1%	0.1%
7	AS		A*0201	0.1%	0.5%	0.1%	0.1%	0.3%
8			A*2402	0.0%	0.2%	0.3%	0.1%	0.2%
9	AS		NT	NT		0.0%	0.0%	0.0%
10	AS		A*1101	NT	NT	0.1%	0.1%	0.1%
11	AS	4m	NT	NT		0.0%	0.1%	0.0%
12	AS		A*2419	NT	NT	0.1%	0.2%	0.1%
13	難産	2y	A*0206	0.1%	1.1%	0.1%	0.2%	0.2%

AS, asymptomatic; NT, not tested.

図 3

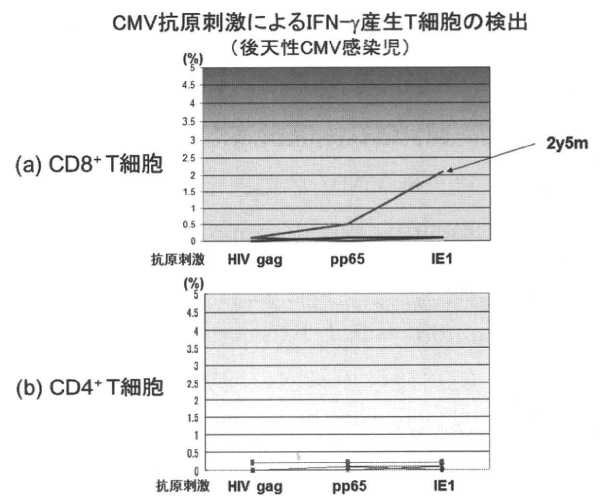


表 2

CMV特異的細胞性免疫応答
(後天性CMV感染児および健常成人)

Case	Age	HLA type	MHC tetramer		IFN- γ producing cells (upper row: CD8+; lower row: CD4+)		
			pp65- unstimulated	pp65- stimulated	HIV gag	pp65	IE1
1		A*2402	0.0%	0.2%	0.0%	0.0%	0.0%
2	11m	A*2402	0.0%	0.0%	0.1%	0.0%	0.1%
3	2y5m	B*1501	0.0%	0.0%	0.1%	0.5%	2.1%
4	4m	A*0201	0.0%	0.0%	0.0%	0.1%	0.1%
5	健常成人	A*0201	0.1%	4.5%	0.2%	1.2%	4.5%

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】

過去2年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。本年度分とし、2月18日現在までの約11ヶ月間で6,192検体を検査し17検体がCMV陽性であった。3年間のスクリーニング結果をまとめるために、各班員の協力を得て、スクリーニングの対象となった新生児の在胎週数・出生体重・同胞の有無などの基本情報を収集し、感染児との比較を行った。感染経路を明らかにすることを目的として、昨年度に続き感染児とその同胞のCMV株の遺伝子配列を28例で比較解析し24例で同一株の感染があり、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改めて考察された。今年度、班員及び協力者からの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の見積もられている。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、その結果を各研究分担者に報告する。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

各研究分担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 プローブ【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°C 2 分と 95°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 ミリ径の尿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。一方、ガスリー濾紙(乾燥血)については、3 ミリ径の濾紙片を数枚打ち抜き QIAamp DNA Mini kit のプロトコールに従って、DNA を精製した。

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。テロメラゼ遺伝子により不死化されたヒト線維芽細胞 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. 新生児CMVスクリーニング

研究主任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。本年度分として、2月18日までの11か月弱に総計6,192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、17例であった。昨年度までの結果と合わせ、23,757人に先天性感染73例が同定されたこととなり、先天性CMV感染頻度が0.31%であることが明らかになった。

個々の先天性感染症例の詳細については、他の研究分担者の報告で述べられている。

2. ガスリー濾紙(乾燥血)法と尿濾紙法の感度比較

本スクリーニング調査で同定された感染児のうち、旭川医大(古谷野)で同定された感染児12例のガスリー濾紙(乾燥血)検体の送付を受け、我々の尿濾紙法との感度の比較を行った。また、感染児の出生時の血液及び液体尿からそれぞれ精製したDNAの定量結果とも比較した。【図1】に示すように、以下のことが明らかになった。1) ガスリー濾紙から溶出したDNAを用いて推定した血中CMVコピー数と液体の血液から精製したDNAを用いた血中CMVコピー数の間には高い相関がある。2) 溶出したDNAを用いて推定した血中CMVコピー数と液体の血液から精製したDNAを用いた血中CMVコピー数の間には高い相関がある。3) 血液中のCMV量は尿中に比べ、1/100から1/1000程度しかない。4) ガスリー濾紙を用いた方法では25%程度が偽陰性となる可能性がある。

3. 新生児基本情報の解析からみた感染児の特徴

25施設中18施設から報告されたスクリーニングの対象となった新生児に関する基礎情報をもとに、先天性CMV感染児の特徴を解析した。【表2】に示すように、母親の年齢、児の性別・在胎週数は、非感染児と感染児群間で有意な差は認められなかった。出生体重を単純に比較すると両群で差は認められないものの、2500g以下の低体重出生や在胎週数からみて平均体重より1.5標準偏差(SD)以下の児の割合をみると、両群間に有意な差があった。出生

時症候性の児における低体重は、より顕著であった。最も重要な特徴は、先天性CMV感染児が同胞（年長児）を有する頻度が有意に高いことであった。

4. 遺伝子配列解析による感染経路の検討

昨年度に続き感染児とその同胞のCMV株の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。比較可能であった28例中24例が同一株に感染していた。なお、4例のうち1例は看護師であった。

5. 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。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た。

6. ウイルス量と発症との相関

出生時に明確な症候性、軽度の症状、無症候性の3分類で、血中及び尿中のウイルス量を比較した。症候性群には、肝脾腫・点状出血など典型的臨床症状が複数ある場合、難聴、網膜炎、脳室拡大など明確な頭部画像所見を有する場合に限り、一過性の黄疸など軽度の肝機能については軽症群とした。【図2】に示すように、血中ウイルス量については症候性児で有意に高値を示した。尿中のウイルス量には有意な差はなかった。新生児期に無症候性であっても今後難聴などの後遺症が発症してくる可能性もあり、一定のフォロー期間後に、このデータを再評価する必要がある。

7. 抗ウイルス治療などに伴うCMV量のモニター

本年度は、神戸大、横浜市大、岩手中央

病院、成育医療センターなどでの抗ウイルス薬治療に伴うウイルス分離・ウイルスDNA量の経時的変化の解析を行った。これまでの症例同様、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133、血液検体99（血漿・血球に検査するため、検査検体としては198）、乾燥臍帯・乾燥血検体32、母乳・髄液・羊水などその他の検体12、総計375検体を解析した。

D. 考察

新生児のCMVスクリーニング検査の方法は、その簡便さ、費用、感度のどの観点から見ても、尿濾紙を用いる我々の方法がガスリー血を用いる方法より優れている。特に、ガスリー濾紙で感度が75%程度になってしまうことは問題である。また、感度の低さを補うためにガスリー濾紙の場合、DNA精製が必要となり、このためのコストが明らかに高くなる。但し、尿濾紙の問題は、代謝異常のスクリーニングで採取されているガスリー濾紙に加えて、採尿しなくてはならなくなることにある。濾紙に尿を吸収させることで、労力を抑制できるものの、全新生児を検査する体制を構築していく上では、濾紙の形状、バーコード読み取りの導入をはじめ改良できる点が多々あると思われる。

感染児と同胞兄弟間の大半で、感染しているウイルス株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。また、既感染の妊婦であっても、型の異なるCMV株が感染可能であることがわかってきているので、年長児の唾液や尿などの体液についての取り扱い方を教育していく必要がある。根本的には、初感染であれ、型の異なる株であれ、先天性CMV感染を防ぐことができるCMVワクチンを開発し、実用化できるようにしていくことが急務と考えられる。

E. 結論

1. ガスリー濾紙(乾燥血)を用いたスクリーニングよりも、尿濾紙法の感度が優れていた。
2. 尿濾紙法を用いて、新生児の先天性CMV感染を一元的に検査し、感染頻度が約300人にひとり(0.31%)であることが明らかにした。
3. スクリーニングの対象となった新生児の情報を解析し、1)感染児群で低出生体重児の割合が有意に多いこと、2)感染児には有意に同胞が存在したこと、が明らかになった。
4. 同胞が感染児と同一のCMV株を排泄していることから、妊婦に対する感染源である可能性が高く、妊婦に対する教育やワクチン開発の必要性が強く認識された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shoji K, Ito N, Ito Y, Inoue N, Adachi S, Fujimaru T, Nakamura T, Nishina S, Azuma N, Saitoh A. Is a six-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J. Pediatr.* 157: 331-333, 2010.
- 2) Nagamori T, Koyano S, Inoue N, Yamada

H, Oshima M, Minematsu T, Fujieda K. A symptomatic congenital cytomegalovirus infection occurred by viral reactivation more than 2 years after an abortion due to the same strain. *J. Clin. Virol.* 49:134-136, 2010.

- 3) 古谷野伸、井上直樹、長森恒久他「先天性サイトメガロウイルス感染マスキリーニングの意義」平成22年度北海道小児保健研究会会誌、36-40, 2010.
- 4) Inoue N. Chapter 84 Human herpesvirus 5 (Cytomegalovirus), *In Molecular Detection of human viral pathogens.* pp.949-962 In: (Ed) D. Liu, Taylor & Francis CRC Press, 2011.
- 5) Imamura T, Suzutani T, Ogawa H, Asano K, Momoi N, Ikuta K, Inoue N, Hosoya M. Oral valganciclovir treatment for congenital cytomegalovirus infection in a five month old girl with progressive hearing loss. *Pediatr. International In press*
- 6) Kashiwagi Y, Nakajima J, Ishida Y, Nishimata S, Kawashima H, Miyajima T, Takekuma K, Hoshika A, Inoue N. Prolonged valganciclovir therapy for congenital cytomegalovirus infection. *J. Infect. Chemo. In press.*
- 7) Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Ikuta K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Toma H, Inoue N, Yamaguchi O, Tanabe K, Suzutani T. The lack of antibodies against the AD2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having gH serotypes same as their donors. *Transplant Infect. Dis. In press*
- 8) 山田秀人、森岡一朗、森實真由美、園山綾子、谷村憲司、松尾希世美、松尾雅文、峰松俊夫、古谷野伸、井上直樹 「先天

- 性サイトメガロウイルス感染症の胎児・新生児治療」、産婦人科治療、102:131-138、2011
- 9) 山田秀人、森岡一朗、森實真由美、園山綾子、谷村憲司、松尾希世美、松尾雅文、峰松俊夫、井上直樹、古谷野伸「サイトメガロウイルス」特集:母児感染が問題となる感染症、周産期医学 印刷中
- 10) 井上直樹 各論 4-3章 先天性サイトメガロウイルス感染児の診断と疫学、川名尚・小島俊行編「母子感染」金原出版、印刷中
- 11) 古谷野伸、井上直樹、長森恒久、藤枝憲二「先天性サイトメガロウイルス感染マスキリーニング体制の構築」マスキリーニング学会誌 印刷中
2. 学会発表
- 1) Inoue N, Koyano S, Yoshikawa T, Itoh Y, Moriuchi H, Asano K, Yamada H, Suzutani T, Fujieda K, for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. CMV strains identified in urine specimens of almost all congenitally-infected newborns were identical to those of their siblings, suggesting siblings as the major risk factor for congenital infection in Japan. 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, Paris, 2010.
- 2) Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Yamada H, Itoh Y, Yoshikawa T, Fujieda K, for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. Multi-center study on congenital CMV in Japan. 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, Paris, 2010.
- 3) Nakamura H, Liao H, Henmi C, Imadome K, Yajima M, Fujiwara S, Koyano S, Yoshikawa T, Moriuchi H, Suzutani T, Asano K, Ohishi T, Itoh Y, Taiji H, Inoue N, Fujieda K, for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. Cellular immunological responses to CMV in congenitally CMV-infected infants identified by a pilot newborn CMV screening study in Japan. 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, Paris, 2010.
- 4) Moriuchi H, Morioka I, Yamada H, Imamura T, Asano K, Oka A, Itoh Y, Yoshikawa T, Koyano S, Inoue N, Fujieda K, for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. A Multi-center study on the treatment of congenital CMV in Japan. 2010 Congenital Cytomegalovirus Conference, Paris, 2010.
- 5) 廖華南、Jung-Hyun Lee, 井上直樹、宮戸健二、藤原成悦、中村浩幸. ヒトサイトメガロウイルス UL136 領域に見出された新規遺伝子産物、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 年 11 月
- 6) 生田和史、石岡賢、佐藤友香、金子久俊、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫. リアルタイム PCR 法を用いたサイトメガロウイルスの型別定量判別法、第 58 回日本ウイルス学会学術集会、2010 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	TCTCGTATTACAAACCGCGGAGAGGATG	738	96C/5m, [94C/45s, 55C/45s, 72C/2m] x 40, 72C/10m
UL144-R		ACTCAGACACGGTTCCGTAAAGTGCTTC		
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	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 新生児の基本情報にみた先天性感染児の特徴

	スクリーニングされた 非感染児 n=20,646 \$	先天性感染児 n=71	有意差 p
母親年齢 平均±標準偏差(才)	31.3 ± 4.8	29.7 ± 5.9	なし
在胎週数 平均±標準偏差	39w1.9d ± 1w2.1d	38w3.2d ± 2w6.4d	なし
出生体重 平均±標準偏差(g)	3002.8 ± 386.3	2743.0 ± 466.5	なし
低体重出生2500以下	7.4%	23.9%	<0.001
在胎週数から見て低体重(SGA)*	5.3%	18.3%	<0.001
同胞(年長)の存在	48.3%	62.0%	0.021

* -1.5SD以下

\$ 情報のあった17施設分

図1 スクリーニング材料の比較(乾燥血 vs. 乾燥尿)

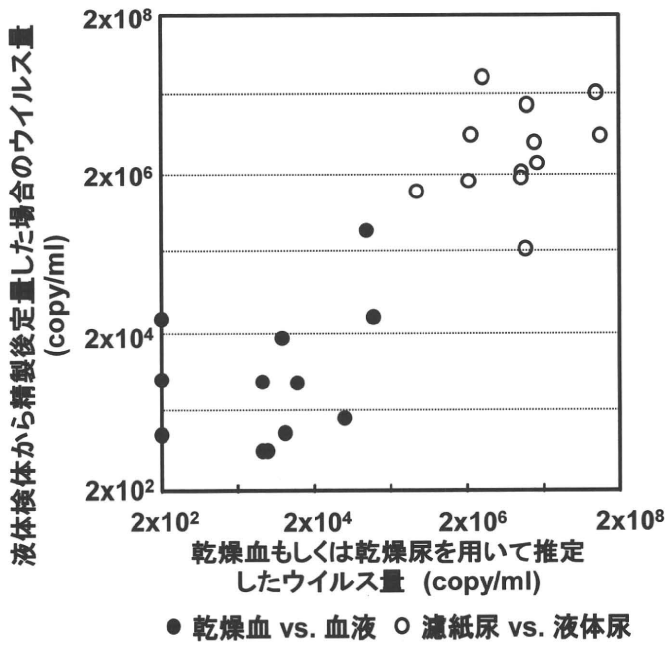
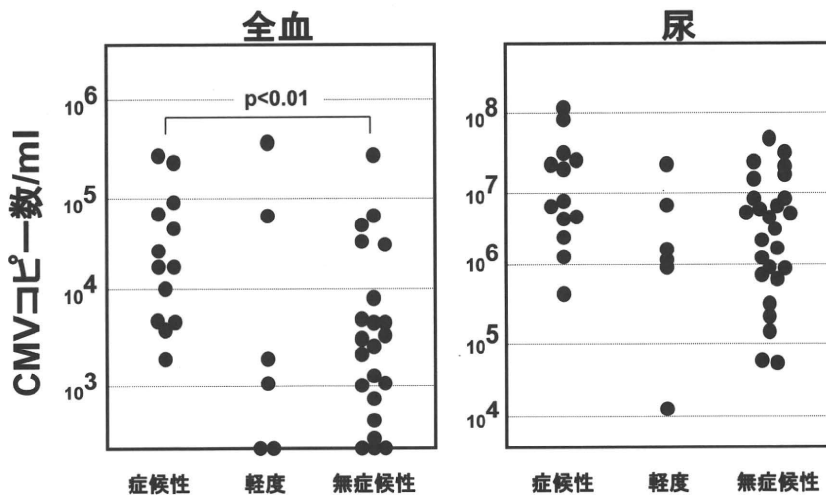


図2



V. 診療ガイドライン

(小児感染免疫 Vol. 22, No. 4, 385-389, 2010)

■ ■ ■ 特別寄稿

先天性 CMV 感染治療プロトコール

森内 浩幸¹⁾

はじめに

わが国における先天性 CMV 感染の実態と重要性が、本学会研究教育委員会による TORCH09 先天性・周産期感染症の実態調査（委員会メンバーについては脚注 1 を参照）、そして厚生労働省研究班による先天性 CMV 感染研究事業（班員については脚注 2 を参照）によって解明されつつある。研究班の解析によると、わが国では約 300 人の出生当たり 1 人が先天性 CMV 感染児であり、その約 2 割は厳格な臨床所見の基準からみて症候性であり、さらに 1 割が頭部画像に明確な異常を認める。したがって、出生 1,000 人に 1 人が先天性 CMV 感染により何らかの異常を示している。無症候性感染の場合でも遅発性の障害が出現する頻度は約 1 割程度とみられており、Down 症候群に匹敵する健康被害と社会経済的負担をもたらしていると推測されている (Koyano, et al : submitted for publication)。

早期診断に続く早期治療が感染児の予後を改善させることが、海外の研究により聴力¹⁾および精神運動発達²⁾の面で示されている。しかし、ガンシクロビル (GCV) やそのプロドラッグであるバルカンシクロビル (VGCV) はまだ先天性 CMV 感染症への保険適用が下りていないため、その使用にあたっては症例ごとに十分に検討し臨床デー

タを集積していくことが肝要である。

本稿では国内における先天性 CMV 感染児の治療管理を適正に導き、かつ効果や安全性をきちんと評価し将来の保険収載に向けて有用なデータが得られることを目指して、研究班で検討した治療プロトコールを紹介する。

I. 初回治療プロトコール

本プロトコールは、文献 1, 3) の研究プロトコールを元に作成したものであるが、研究としての側面以上に診療面での活用を意図したため、随所に改訂を加えている。例えば、文献 1, 3) 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や HIV キャリア妊婦からの出生を除外規定に含めていたが、本プロトコールではそれは問わないことにしている。

1. 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 治療開始時点での修正在胎週数 32 週以上。

除外項目 ① 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、③ VGCV または GCV による治療の実施が困難とな

1) 厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業研究事業）「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・先天性 CMV 感染児に対する抗ウイルス療法検討ワーキンググループ（担当：森内浩幸）

*本稿は上記研究班の成果の一つを発表するものであり、日本小児感染症学会が本稿に述べられたプロトコールを推奨しているということではない。

表 1 経口薬 VGCV と経静脈薬 GCV との比較

	経口薬 (VGCV)	経静脈薬 (GCV)
Merit Demerit	簡便 (外来で可) 消化管障害では使用困難	消化管障害にかかわらず投与可能 ルート確保と入院が必要
投与量/期間	16 mg/kg/回×2 6 weeks*	6 mg/kg/回×2 6 weeks
価格 6 週間分の費用 (体重 6 kg 換算)	2,942.9 円/錠 (450 mg) 54,934 円	13,718 円/V (500 mg) 576,156 円
副作用	骨髄抑制	骨髄抑制
エビデンス	少ない	より確実

*海外で 6 週間と 24 週間の治療期間を比較する臨床研究が進行中である。

るような他の重症疾患を有する場合。

注 1)「症候性」には

- ・中枢神経系障害：① 小頭症，② 脳の画像異常，③ 脳脊髄液 (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
- ・中枢神経系外障害：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。ただし，各項目の重症度からみた「症候性」の定義はまだ明確ではなく，例えば「脳の画像異常」についてもどこまで含むのかについてはコンセンサスが得られていない。

注 2)文献 1, 3) 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。

2. 治療方法

VGCV 経口投与 (授乳後) 16 mg/kg/回×2 回/日×6 週間³⁾

または GCV 点滴静注 6 mg/kg/回×2 回/日×6 週間¹⁾

注 3)いずれの薬剤も先天性 CMV 感染に対しては保険適用がない。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いくが，重症例や消化管障害がある場合は GCV の

使用を優先して考える (表 1)。

注 4)VALIXA (バリキサ) 錠 (バ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 (懸濁液として供与することを推奨する)。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⁴⁾でも 450 mg 錠を用いているが，Kimberlin らの研究³⁾では VGCV oral solution (詳細不明) 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 5)バリキサ錠の価格は 1 錠 2,942.90 円である。体重 6 kg の児の場合には上記用量で 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ため，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)。

3. 効果判定および副作用評価

1) ウイルス量

測定法：real-time PCR⁵⁾

検体：① 全血と尿，② 髄液

脚注 1) 五十音順に，小田 滋，金兼弘和，木村 宏 (解析担当者)，坂田 宏，田尻 仁，田中敏博，多屋馨子，堤 裕幸，成相昭吉，早川昌弘，森内浩幸 (研究代表者)，要藤裕孝，横田俊平

脚注 2) 五十音順に，浅野仁寛，伊藤裕司，井上直樹，大石 勉，岡 明，久保隆彦，古谷野伸 (研究代表者)，錫谷達夫，泰地秀信，藤枝憲二 (故人・初代研究代表者)，藤原成悦，森内浩幸，山田秀人，吉川哲史

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）の有無にかかわらず、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の検出の有無にかかわらず、そして治療の継続の有無にかか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⁶⁾血液採取にあたって、ヘパリンが混入するとPCRが阻害されるので加えてはならない。

注⁷⁾髄液の採取は困難な場合も多いが、その機会があれば、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。初回の髄液でCMV DNAが検出されなかった場合には、臨床的に中枢神経系病変の増悪が疑われない限りその後の検査は不要である。

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みられたらその都度。

検体：尿、血液

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0.2mLずつ³⁾。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⁴⁾。

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。

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³⁾。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。ただし治療前に異常が認められた場合には、適宜フォローする。

6) 発達評価

評価時期・方法：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、3歳半など）に遠城寺式（18カ月頃まで）または新版K式発達検査（2歳以降）を行い、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。18カ月～2歳頃にも追跡調査を行うことを推奨する。

評価法：MRI（FLAIRや拡散強調画像も含む）を原則とする。ただし鎮静など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⁸⁾Grade 2⁶⁾以上の副反応が出現したら、原則投与中止とする。

注⁹⁾好中球減少に関しては、500/ μ L未満になったらいったん中止して>750/ μ Lになるまで待つ。再び好中球数が500/ μ L未満となったら、50% doseにして>500/ μ Lとなるのを待つ。この用量で好中球数の上昇が認められなければ投与中止とする¹⁾。

以上の検査項目とその実施時期について、表2にまとめた。

II. 追加治療プロトコール

CMVは基本的に感染成立後終生にわたって体内に持続し、GCVやVGCVはウイルスの増殖を抑制することはできても、ウイルスを根絶することはできない。最近、網膜脈絡膜炎を合併した先天性CMV感染児において、6週間のGCVの終了後に再燃し、最終的に6カ月に及ぶ治療によってコントロールできた事例も報告されており⁷⁾、最適の治療期間は定まっていないし、おそらく症例

表 2 先天性 CMV 感染症初回治療プロトコールにおける検査項目とその実施時期のまとめ

暦年齢	治療週 (注1)	ウイルス量			ウイルス分離		GCV 血中濃度	副作用 モニター	聴力 検査	眼底 検査	脳画像 検査	発達 評価	治療	
		全血	尿	髄液	血液	尿								
生後 0 カ月	治療前			注2							注4			
	治療 1 週後						注3						↑	
	治療 2 週後												VGCV 16 mg/kg po q12h または GCV 6 mg/kg div q12h	
	治療 3 週後													
	治療 4 週後													
	治療 5 週後													↓
	治療 6 週後													
	治療終了後 1 週													
	治療終了後 2 週													
修正 4 カ月														
	治療開始 6 カ月後													
修正 7 カ月														
修正 10 カ月														
修正 12 カ月														
修正 18 カ月														
2 歳														
3 歳半														

研究班を通じて実施 ← → 各医療施設で実施

注1) ここでは生後 30 日以内に治療開始した場合を想定して暦年齢と合わせている。それ以降に開始した場合は適宜スライドさせること。

注2) 治療開始前で検出されない場合はそれ以降の検査は不要。

注3) 治療開始後 5+/-1 日に実施する。この際の採血のどれかで治療 1 週後の採血 (ウイルス量, 副作用モニター) を兼ねてよい。

注4) 異常が認められた場合には、その後適宜実施する。

ごとに異なる可能性がある。したがって、追加治療プロトコールは症例ごとに適応の是非を検討すべきものである。

1. 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。

2. 治療方法

VGCV 経口投与 (授乳後) 16 mg/kg/回×2 回/日×6 週間

注1) 1 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) まで延長することを検討する。

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。例えば単にウイルス学的なりバウンドだけの場合よりも、臨床的なりバウンドがみられた

場合には積極的に適応を考える。

注³⁾追加療法を実施する症例で薬剤耐性が疑われる場合には、ホスカルネットなど他薬剤への切り替えを考慮する。一般的には GCV/VGCV に比して切り替えた薬剤の副反応が懸念されるため、並行して薬剤感受性関連遺伝子配列の解析（もしくはウイルス分離と薬剤感受性試験）を行い、投与薬選択の指標とするように心がける。

3. 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。

おわりに

症候性先天性 CMV 感染児への抗ウイルス療法が神経学的かつ聴力的予後を改善させることが判明している一方で、その最適な治療方法（GCV か VGCV か、6 週間でいいのかもっと長期がいいのか、など）はまだ定まっていない。また短期的な副作用（骨髄抑制など）だけではなく、長期的な副作用（妊孕性の障害や発癌性など）がどれくらい起こり得ることなのかすぐには答えが出ない問題もある。保険適用が通っていない現在、すべての患者に関するデータの蓄積が有効性や安全性を評価するうえで極めて重要であり、診療にあたる方々のご協力によりさらにエビデンスが蓄積されることを切望する。

先天性 CMV 感染児の治療管理について研究班までご相談される場合は、森内浩幸 (hiromori@nagasaki-u.ac.jp) または古谷野伸 (koyano5p@asahikawa-med.ac.jp) までご連絡ください。

文 献

- 1) 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* 143 : 16-25, 2003
- 2) Oliver SE, et al : Neurodevelopmental outcomes following ganciclovir therapy in symptomatic congenital cytomegalovirus infections involving the central nervous system. *J Clin Virol* 46 (Suppl 4) : S22-26, 2009
- 3) Kimberlin DW, et al : Pharmacokinetic and pharmacodynamic assessment of oral valganciclovir in the treatment of symptomatic congenital cytomegalovirus disease. *J Infect Dis* 197 : 836-845, 2008
- 4) Galli L, et al : Valganciclovir for congenital CMV infection : a pilot study on plasma concentration in newborns and infants. *Pediatr Infect Dis J* 26 : 451-453, 2007
- 5) Tanaka N, et al : Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay. *J Med Virol* 60 : 455-462, 2000
- 6) 有害事象共通用語規準 v3.0 日本語訳 JCOG/JSCO 版, 2007 ([http://www.jcog.jp/doctor/tool/CTCAEv3J_070308.pdf#search='CTCAE % 20 薬剤'](http://www.jcog.jp/doctor/tool/CTCAEv3J_070308.pdf#search='CTCAE%20薬剤'))
- 7) Shoji K, et al : Is a 6-week course of ganciclovir therapy effective for chorioretinitis in infants with congenital cytomegalovirus infection? *J Pediatr* 157 : 331-333, 2010

* * *

VI. 会 議 記 録

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）

「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22年度第1回班会議プログラム

研究代表者 古谷野 伸

日 時：平成22年7月2日（金）13:00～17:00
場 所：国立感染症研究所 共用第1会議室
東京都新宿区戸山1-23-1, TEL03-5285-1111

発表者の方へ

- 1 演題につき、発表時間、討論時間を含め 10 分です。
- 時間厳守での進行にご協力下さい。
- 当日の発表形式はすべてコンピューターによる presentation のみとさせていただきます。
- Windows の方は PowerPoint 2003 でスライドを作成し、当日 USB ハードでご持参ください。
- Mac をご使用の方は、ご自分のコンピューターをご使用ください。
- アダプターが必要な場合には必ずご自分でご用意下さい。

厚生労働科学研究費補助金
成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業
「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」班

事務局連絡先

〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1

旭川医科大学小児科

古谷野 伸

TEL : 0166-68-2481

FAX : 0166-68-2489

E-mail : koyano5p@asahikawa-med. ac. jp