

pathophysiology of systemic inflammatory response in a disseminated neonatal herpes simplex virus (HSV) infection. *J Clin Virol.* 53: 265-267, 2012

- 4) 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について. 日本マスキリーニング学会誌 21(1):9-14, 2011
- 5) 佐藤雅之, 岡 秀治, 坪田朋佳, 新宅茂樹, 堀井百祐, 中村英記, 真鍋博美, 平野至規, 室野晃一, 古谷野伸, 高橋弘典. 高度な無気肺を合併した気管支粘液栓症の1例. 小児科 53(1): 1-2, 2012

2. 学会発表

- 1) 古谷野伸. 日本における先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染の実態とその治療. ヘルペス感染症研究会, 2011年8月19日, 札幌
- 2) 古谷野伸. 先天性サイトメガロウイルス感染マスキリーニングの試み. 第38回日本マスキリーニング学会, 2011年10月28-29日, 福井

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

先天性サイトメガロウイルス感染を防ぐために

このたび妊娠判明後に行った検査で、あなたがサイトメガロウイルスに今まで感染していないことがわかりました。

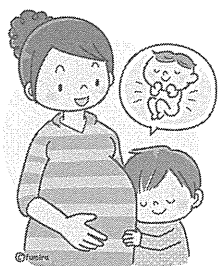
サイトメガロウイルスは基本的にヒトに病気を起こすウイルスではありませんが、妊娠中に妊婦が初めて感染すると子宮内の赤ちゃんにも感染することがあります。子宮内の赤ちゃんに感染してもすべての赤ちゃんに健康上の問題が起こるわけではありませんが、10-20%の赤ちゃんに軽微なものから重篤なものまでの様々な症状が起こってきます。重篤な症状には難聴や発達障害などが含まれます。

そこで是非、**妊娠中のみ**下記の事柄に注意してサイトメガロウイルス感染を防ぐための感染対策を実行していただくようお願いいたします。

- ①5-6歳未満のお子さんは友達同士でサイトメガロウイルスをうつしあい、尿や唾液にウイルスを排出している可能性があります。そこでお子様の尿や唾液にさわった場合はきちんと手洗いをしましょう。お子様のおむつを替えた後は特にご注意ください。
- ②お子様が口に運んだスプーンやお箸などを自分の食事に共有しないようにしましょう。
- ③お子様の唾液が口に入るようなキスは避けるようにしましょう。
- ④妊娠中の性交渉はコンドームを使用しましょう。

当院では先天性サイトメガロウイルス感染の新生児スクリーニングを行っております。赤ちゃんへの感染が判明した場合は旭川医科大学小児科できちんと経過をみていきますが、感染しないことが最も大切です。

上記注意事項にご注意いただきながら元気にお過ごしください。



森産科婦人科病院
旭川医科大学小児科

先天性サイトメガロウイルス感染児の発達フォローアップに関する研究

研究分担者 岡 明 杏林大学医学部小児科 教授

【研究要旨】

濾紙尿により先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染が確認された 13 名について頭部画像所見・聴力・発達状況についてまとめた。頭部画像検査では、頭部超音波検査にて 7 例で上衣下嚢胞の所見が認められ、頭部 MRI 検査では実施された 12 例中 6 例で大脳白質の信号変化の所見を認め、併せて 13 名 9 名でいずれかでの所見を認めた。中枢神経系の画像所見陽性例では、高率に新生児期での血漿中の CMV ウイルスが同定され、ウイルス負荷が高いことを示していた。聴力障害は 2 例で認められ、両側性に認めた 1 例については家族の希望により治療を行った。発達については、現在 3 才未満で今後さらにフォローが必要だが、乳児期に顕著な障害を認める例はなかった。今後、3 才以降に、言語や行動などを含めた発達の評価を詳細に行う必要があると考えられ、その方法については、標準化された質問紙形式による発達スケールと行動や情緒面での評価法を用いることが適当であると考えられる。

A. 研究目的

平成 23 年 2 月までの新生児濾紙尿を用いた先天性 CMV 感染のスクリーニング調査研究を東京大学医学部附属病院および山口病院（千葉県船橋市）にて行った。本研究に協力に同意され検体を採取されたのは東京大学医学部附属病院 1735 名、山口病院 4065 名の計 5800 名で、各々にて陽性と診断されたのは 5 名 (0.29%) と 8 名 (0.20%) であった。

うち 8 名が第一子で 5 名が第二子であった。3 名が低出生体重児で、2 名で小頭を認めたが、肝脾腫や血小板減少症などを認めた例はなく、全例が濾紙尿を用いたスクリーニング検査にて初めて先天感染を疑われた例であった。従って、全例、従来分類での非症候性の先天性 CMV 感染児であった。

先天性 CMV 感染による後遺症としては、難聴と神経後遺症が特に重要である。後者についてはこれまで皮質形成異常を伴う様な重症例についてのみ検討されてきており、脳性麻痺やてんかんや知的障害などの原因として知られている。しかし、発達遅滞や発達障害などをきたすことも知られているが、その頻度などについての前方視的な研究はなく、実態については不明である。

本研究では、新生児期に先天性 CMV 感染症と診断され、新生児期に画像検査などの評価を受けた児について、前方視的に検討し、特に軽度知的障害や発達障害や行動異常などに注目して、その実態を調査研究することを目的としている。

B. 研究方法

(1) 対象：平成 23 年 2 月までの新生児濾紙尿にて先天性 CMV 感染と診断をされた 13 名。このうち 2 名は新生児期のみ検査を施行しその後フォローアップは転居などの事情により中断されている。

(2) 新生児期の評価：診察、聴力検査 (ABR)、頭部超音波検査、血液検査 (CMV IgM)、頭部 MRI 検査 (12 名)、眼底検査を施行した。

(倫理面への配慮) 東京大学医学部付属病院の倫理委員会にて承認を受けている。文書により説明を行い保護者の同意書を得て調査を行っている。

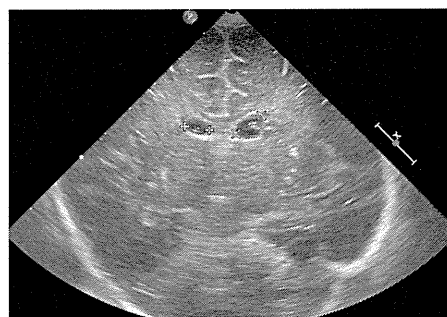
C. 研究結果

(1) 新生児期の評価—身体所見、難聴
13 名中 3 名が低出生体重児であり、その 1 名は早産児であった。また、2 名は小頭症を認めた。肝脾腫、出血斑、血小板減少などのいわゆる症候性の先天性 CMV 感染の所見を呈した児はいなかった。1 名で新生児期に心室中隔欠損を認めた (その後の経過で自然閉鎖)。1 名で眼底検査にて癍痕性病変が指摘された。

そのうちの 2 名で、ABR にて両側および片側の難聴が発見され、新生児期からの介入が可能であった。

(2) 新生児期の評価—頭部超音波検査
診断後、初診時に全例で頭部超音波検査を施行した。7 例で両側の尾状核背側の胚細胞層部に上衣下嚢胞 (Subependymal (Pseudo-)Cyst) の所見を認めた (図 1)。

図 1 先天性 CMV 感染新生児に見られる上衣下嚢胞 (頭部超音波前頭部冠状断面)



この所見は先天感染などの際に認められる特徴的な所見であり、CMV ウイルスが胎生期の脳に何らかの影響を及ぼしていることを示していた。

新生児期の血漿中の CMV のコピー数については、血漿中のコピー数を測定した 12 名中、上衣下嚢胞陽性例全例 6 名で血漿中に $3.6 \times 10^4 \sim 1.3 \times 10^3$ (Copy/ml) のウイルスが同定されたのに対して、陰性例 6 例中 3 例は検出感度以下であった。ただし、最もコピー数が高値 (7.7×10^4 Copy/ml) の例では嚢胞の所見は認められなかった。

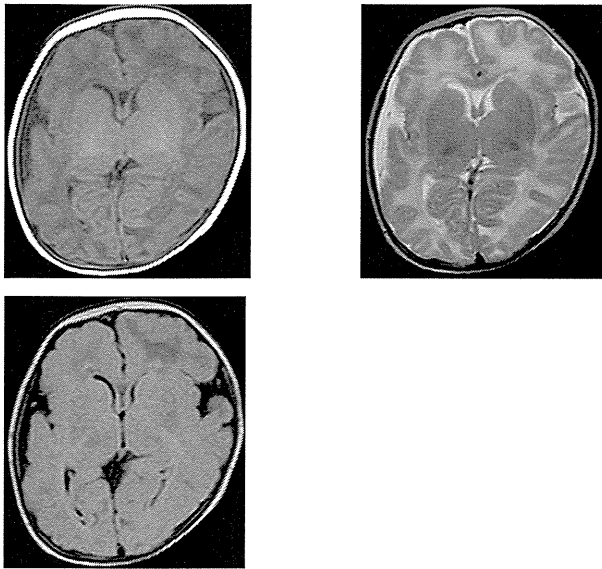
(3) CMV IgM 児の血液中 CMV IgM は、先天性感染の指標となる可能性が考えられているが、6 例で陽性、2 名で土、5 名で陰性であった。

(4) 新生児期の評価—頭部 MRI 検査

12 例で頭部 MRI 検査を施行した。先天性 CMV 感染による最重度の所見である脳萎縮や皮質形成異常を示す児はいなかった。

大脳白質に T1 低信号、T2 異常高信号、FLAIR 低信号を呈する斑状の信号変化が 6 例に散見された (図 2)。

図 2 頭部 MRI に見られる大脳白質の信号変化 (水平断、左上 T1 強調、右上 T2 強調、下段 FLAIR)



頭部 MRI の白質の信号変化を認めた 6 例全例で、血漿中に $7.7 \times 10^4 \sim 7.0 \times 10^2$ (Copy/ml) のウイルスが同定されたのに対して、陰性例 6 例中 3 例は検出感度以下であった。

(5) フォローアップ状況

2 名は転居などにてフォローアップが不能となっているが、11 名については現在最長で 36 カ月のフォローを行っている。

医師による診察と一般的な発達の指標による評価では、脳性麻痺や明かな知的障害を認めている児はいなかった。

D. 考察

東京大学医学部付属病院での濾紙尿によって診断された先天性 CMV 感染症児のコホート集団の、これまでの経過をまとめた。

新生児期の評価を行った 13 名の内、11 名は現在でのフォローを継続している。

本コホートの特徴として、13 名中 5 名が第二子と高率であり、本研究班より示唆される第一子よりの妊婦感染の可能性

に合致する所見であった。

3 名は低出生体重児であったが、感染児は新生児期には、表面的には無症状であり、先天性 CMV 感染としては無症候性であった。CMV 感染が確認後に施行された ABR 検査にて、1 例で両側性、1 例で片側性の難聴が発見された。

新生児期の先天感染の検査として、しばしば児の特異的な IgM が使用されるが、陽性例は 13 名中 6 名と半数以下であり、本検査の感受性は低いと考えられた。

新生児期の頭部画像検査としては、頭部超音波検査にて 7 例が先天感染を示唆する所見である上衣下嚢胞を認め、中枢神経系への関与を見る上で有用であった。また、これに頭部 MRI 検査の所見を含めると、12 名中 9 名で何らかの中枢神経系の所見を認めていた。こうした頭部画像検査所見で何らかの所見を認める児では、高率に新生児期の児の血漿中に CMV を同定されており、ウイルス負荷がこの時点で高いことを示唆していた。

このことから、本コホートの児について、長期フォローアップによる神経系合併症の有無を検討することは非常に重要であると考えられる。

本コホートの現時点でのフォローアップでは、脳性麻痺や重度の知的障害を認められる例はなく、今後、高次脳機能や情緒面での発達について検討が必要であると考えられる。その点からは、新生児期に認められた頭部 MRI での白質の信号変化が、器質的な変化として強い脱髄などの所見ではなく、感染に伴った何らかの可逆性の変化である可能性が高いと考えられる。しかし、こうした乳児期早期の頭部 MRI の白質の信号変化の病的意義については、早産児などにおいても現在議論されているところであり、先天性 CMV

感染については、どのような病態を反映しているのか今後検討する必要がある。

今後の先天性 CMV 児の発達予後に関する調査としては、知的および運動発達の評価と自閉症や ADHD などの発達障害に関連した情緒面での評価が重要である。理想的には、知的および運動発達の評価としては対面式による新版 K 式検査による評価が望ましく、同時に医師による診察により行動面を評価できることが望ましい。しかし、必ずしも研究者の医療機関に受診していない場合も多く、ある程度質問形式でのアンケートでのデータの集積を行うことが実際的と考えられる。

日本語での発達評価質問紙として、我が国で標準化されている「乳幼児発達スケール KIDS」(財団法人発達科学研究教育センター)の使用が適当であると考えられる。なお、KIDS では、運動、操作、理解言語、表出言語、概念、対こども社会性、対成人社会性、しつけの下位項目に分かれており、最終的に総合発達年齢を算出するようになっている。

行動面や情緒面の質問紙による評価としては、残念ながら我が国で開発されたもので英文の論文での記載があるものはほとんどなく、海外で広く使用されている Child Behavior Checklist(CBCL)の日本語版の2-3歳用の調査表を使用することが適当であると考えられた。日本語版は、ある程度我が国で標準化した正常値が報告されており、十分に使用が可能であると考えられた。

全体を数値化することを考えた場合には、すでに臨床心理士などにより新版 K 式などで評価を終えた患者についても、KIDS と CBCL を再度依頼し、データ化することで先天性 CMV 児の全体像を把握することが可能となると思われる。

E. 結論

新生児期に濾紙尿にて診断された先天性 CMV 感染児で東京大学医学部附属病院でフォローされているコホート集団では、軽度の所見も含めて頭部画像検査で何らかの先天感染に関係すると思われる所見が得られた児が多く、またそうした児では血漿中の CMV が同定されるなどウイルス負荷が高い傾向が認められた。現在、神経発達などについてフォロー中であるが、今後、高次機能や発達障害などの情緒や行動面での評価が重要であると考えられた。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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及び発症のリスク因子の解析： 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 室長

【研究要旨】

1. 研究班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。本年度分とし、2月17日現在までの約11ヶ月間で2042検体を検査し7検体（0.34%）がCMV陽性であった。また、症候性児の抗ウイルス薬治療に伴うウイルス学的動態を検討した。
2. 先天性CMV感染の87人の小児について、TaqMan allelic discrimination assayを用いて、TLR2、TLR4、TLR9遺伝子上にあるSNPを解析した。先天性CMV感染児では、日本人一般人口に比べ、TLR2遺伝子のSNP rs3804100におけるCC遺伝子型が有意に多かった。また、同遺伝子SNP rs1898830のAG遺伝子型が先天性CMV感染児では少ない傾向にあった。TLR4やTLR9遺伝子の多型は、先天性CMV感染や感染症の発症に関連していなかった。従って、TLR2遺伝子多型は、感染リスク因子である可能性がある。

A. 研究目的

健常人では何ら問題のないサイトメガロウイルス（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。胎内感染児の約2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。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。

本研究では以下のことを行う。

1) 研究分担者の関連施設において採取された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。

2)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。

3)症候性児に対する抗ウイルス薬治療に伴うウイルス学的動態を検討する。

4)感染児の感染や発症のリスク因子として、自然免疫に関与する TLR 遺伝子群における多型との関連を検討する。

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、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 $^{\circ}$ 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 ミリ径の尿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。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) Taqman allelic discrimination assay による TLR 遺伝子型の解析

TLR2, 4, 9 の各遺伝子の多型 (SNP) について、①日本人に 5% 以上の割合で minor genotype が存在する、②ウイルス感染症の重篤度やウイルス感染の罹患に関わることが報告されていることを条件に解析を行うことにした。対象としては、①スクリーニングで同定された児 (n=49)、②発達遅滞または難聴を主訴とし、乾燥臍帯検体によって後方視的に診断された児 (n=20)、③出生前または出生時に先天性 CMV 感染が疑われ、出生後に確定診断された児 (n=18) の合計 87 人の血液もしくは乾燥臍帯から抽出した DNA を用いた。

各多型のコントロールを以下のように

して作製した。

TLR 遺伝子の目的とする多型を含む 0.5～1kb の DNA 断片をクローニングし、塩基配列を確認した。次に、minor genotype 配列を含むプライマーを用いて PCR 増幅する in vitro mutagenesis 方法により、このプラスミドに minor genotype 配列を導入した。

Major genotype 配列及び minor genotype 配列にそれぞれ annealing する FAM 及び VIC 標識 Taq Man プローブを用いて、多型配列を含む領域のリアルタイム PCR 増幅し、genotype を決定した。

(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

旭川医大及び神戸大とその関連施設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17日までの11か月弱に総計2042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、7例であった。

2. 抗ウイルス治療に伴う CMV の動態

本年度は、成育医療センター、府中病院、小田原市民病院、焼津市民病院、岩手中央病院などでの抗ウイルス薬治療に伴う検体からのウイルス分離・尿中及び血中のウイルス DNA 量の経時的変化の解析を行った。大半の症例で GCV 治療 6 週間で血中 CMV 量が検出限度程度まで減少するが、投薬終了後にリバウンドが見られることから、6 週間の治療で十分であ

るのか、さらに検討が必要と思われた。しかしながら、臨床症状そのものは改善もしくは現状維持が図られていることから、今後何を投与期間の指標とするのかの検討も必要と考えられた。GCV 投与が終了している 4 例のうち、長期にフォローした 2 例の経時的ウイルス量の変化を図 1 に示した。

〈症例 1〉 母親 26 歳、初産、妊娠 37 週 2 日、出生体重 1870g。低出生体重に対し NICU 入院。SFD 以外の身体所見なし。血小板減少。脳エコーにて両側側脳室に上衣下嚢胞、脳室内出血を疑う所見及び軽い側脳室拡大。聴覚(日齢 8)・視覚(日齢 9)正常。日齢 0 時点で CMV-IgM 陽性、尿中 CMV DNA 検出及びウイルス分離により先天性 CMV 確定診断。6 週間の VGCV 治療を日齢 22 より開始。一時的に好中球が軽度減少した以外に副反応なし。投与終了以降に、CMV 量が有意に増加したため、追加の 6 週間投与を実施。治療開始後 6 か月時点での頭部 MRI・脳波では新たな異常はみられなかった。眼科的障害や難聴は発生せず。

〈症例 2〉 経産。在胎 40 週 0 日、出生体重 2530g。胎児期に、側脳室拡大と IUGR、母親 CMV-IgM 陽性から先天性 CMV 感染を推定。出生後肝機能障害、血小板減少を同定。頭部 CT にて脳室拡大と脳内石灰化。眼科的異常所見なし。ABR にて片側難聴を検出。6 週間の GCV 治療により、肝機能正常化、聴力改善。リバウンドが見られたが臨床症状が安定しているため、経過観察とし、追加の薬剤投与を実施しなかった。なお、本症例及びその同胞の尿から得られたウイルス株を比較したところ、多様性のあるいくつかの遺伝子が完全に一致したことから、同胞が感染源と推定された。

3. TLR 遺伝子群の多型解析

図 2 に代表例を示すように、各多型について 2 種類のプラスミドを用いて、

major, minor 及び両者のヘテロタイプを簡便に分類できるようにした。TLR2、TLR4、TLR9 の多型それぞれ 2, 1, 2 か所を検討したところ、表 1 に示すように、先天性 CMV 感染児では、日本人一般人口に比べ、TLR2 の SNP rs3804100 における CC 遺伝子型が有意に多く、同遺伝子 SNP rs1898830 の AG 遺伝子型が先天性 CMV 感染児では少ない傾向にあった。一方、TLR4 や TLR9 では、こうした差は認められなかった。また、出生時症候性か否か、遅発性障害の有無、出生時及び遅発性いずれかの臨床症状の有無などの他のカテゴリー間での比較も行ったが、有意な差は認められなかった。従って、TLR2 遺伝子多型は、発症のリスク因子ではないが感染のリスク因子である可能性があると思われる。

D. 考察

今回、感染リスク因子として同定された TLR2 の rs3804100 の多型部位は、B 型肝炎ワクチンや麻疹ワクチンの抗体のつき方に関係していることが報告されている。また、同遺伝子の rs1898830 部位は、HSV2 のウイルス排泄や病変率に関係していると報告されている。いずれの多型もアミノ酸配列に変化を生じさせない。しかしながら、一般論として、synonymous 変異であっても、スプライシングや翻訳効率、mRNA の安定性などに影響を与えるという報告もあることから、TLR2 の発現効率に差がある可能性がある。自然免疫には TLR 遺伝子群以外にも多くの宿主蛋白が関与していることから、今後他の宿主遺伝子の多型についても検討を行っていきたい。

先天性 CMV 感染の場合、血液学や肝機能などの指標のみならず、神経学的障害をどう評価するかという要素があるため、抗ウイルス治療の臨床的効果を評価することには、エビデンスの蓄積が欠かせない。今年度検討された症例では、GCV の臨床的効果は明確であったが、ウイルス学的には 6 週を越えた治療が求められるも

のもあり、GCV 治療後の長期的フォローが必要であると思われる。

E. 結論

1. 尿濾紙法を用いて、新生児 2042 人の先天性 CMV 感染を一元的に検査し、7 人の陽性児を同定した。
2. 抗ウイルス薬治療効果の指標としてウイルス量の測定だけでは限界があると思われる。
3. TLR2 遺伝子多型が感染リスク因子である可能性を見出だした。

F. 健康危惧情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, Yamada H, Yoshikawa T, Suzutani T, for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multi-centre study. *BMJ Open*. 1:e00118, 2011
 - 2) 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* . 17:538-540, 2011
 - 3) Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inoue N, and Suzutani T. A novel real-time PCR method for the determination and quantification of each

cytomegalovirus (CMV) gH-subtype in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 50:499-501, 2012

- 4) Yamada S, Taniguchi R, Kosugi I, Inoue N. Cytomegalovirus, In: (Eds) Singh SK & Ruzek D. "Neuroviral Infection" Taylor & Francis CRC Press, *In press*
- 5) Taniguchi R, Koyano S, Suzutani T, Goishi K, Ito Y, Morioka I, Oka A, Nakamura H, Yamada H, Igarashi T, Inoue N. Polymorphisms in Toll-like receptor 2 are associated with congenital cytomegalovirus infection. *Submitted*
- 6) 山田秀人, 谷村憲司, 森岡一朗, 森實真由美, 園山綾子, 平久進也, 蝦名康彦, 井上直樹, 古谷野伸, 峰松俊夫. 周産期感染におけるカウンセリグートキソプラズマとサイトメガロウイルス. 産婦人科の実際 60:1309-21, 2011
- 7) 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
- 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, 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 41:181-188, 2011

2. 学会発表

- 1) Kiao H, Lee J-H, Inoue N, Miyado K, Fujiwara S, Nakamura H. Characterization of human

cytomegalovirus UL136 gene product. XV International Congress of Virology. September 11th-16th, 2011. Sapporo

- 2) Ikuta K, Ishioka K, Imamura T, Asano K, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Kubo T, Koyano S, Inoue N, Suzutani T. A genotypic and serologic study of cytomegalovirus (CMV) reinfection in mothers and neonates with congenital CMV infection in Japan. XV International Congress of Virology. September 11th-16th, 2011. Sapporo
- 3) Moriuchi M, Koyano S, Inoue N, Moriuchi H. Neonatal mass-screening on congenital cytomegalovirus infection in Nagasaki, Japan: a pilot study. XV International Congress of Virology. September 11th-16th, 2011. Sapporo
- 4) 生田和史, 石岡 賢, 佐藤友香, 石橋啓, 浅野仁覚, 今村 孝, 藤原成悦, 久保隆彦, 中井英剛, 吉川哲史, 森内浩幸, 古谷野伸, 井上直樹, 錫谷達夫. リアルタイム PCR 法によるサイトメガロウイルスの型別定量判別. 第 26 回ヘルペスウイルス研究会, 2011 年 6 月 24 日, 大阪
- 5) 井上直樹. 「わが国における先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染の現状と今後の対策の方向性」, シンポジウム「わが国におけるウイルス母子感染の現状と今後の展望」, 第 81 回日本感染症学会西日本地方会学術集会 2011 年 10 月 6-8 日, 北九州

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

図1 GCV治療に伴う先天性CMV感染児の血液・尿中CMV量の変化

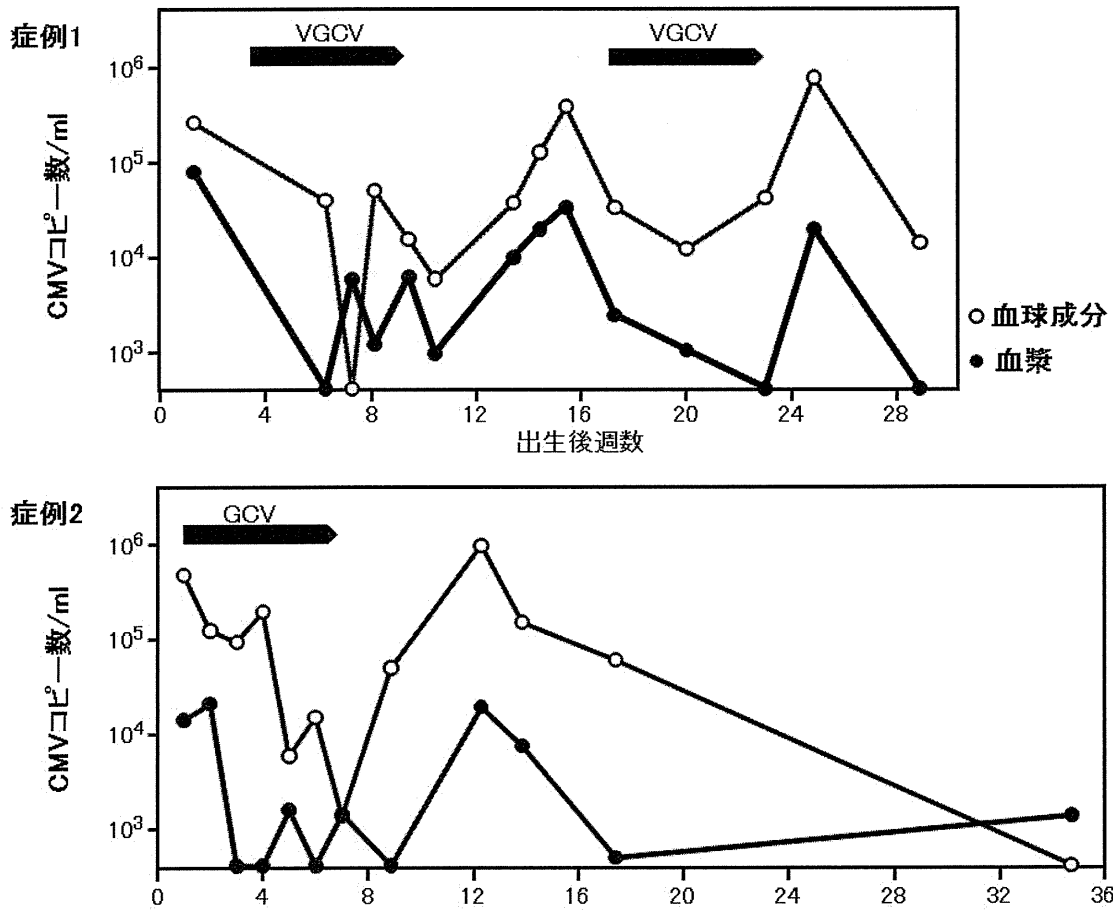


図2 Taqman allelic discriminationの結果例

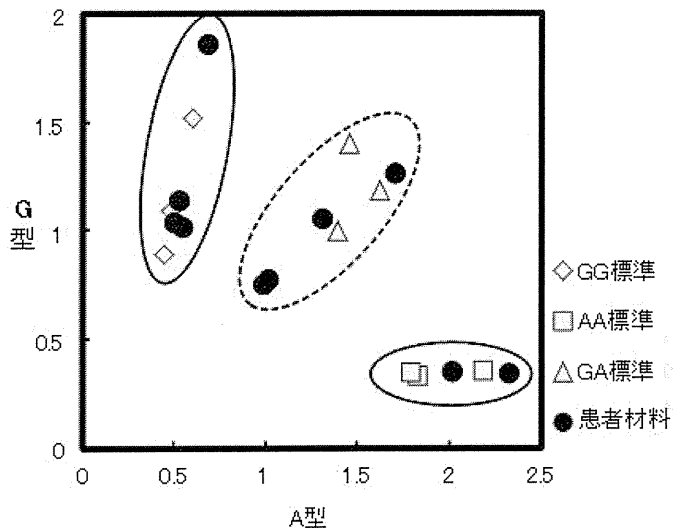


表 1 TLR 遺伝子の多型と先天性 CMV 感染のリスク

Gene	rs no. ¹ (Region)	Genetic Model	Genotype	General population(A ²) or Congenital CMV infection(B ²)				
				A (%)	B (%)	OR (95%CI)	P ³	
TLR2	rs1898830 (Intron 1)	Codominant	AA	17 (19.7)	30 (34.5)	reference	NS ⁴	
			AG	54 (62.8)	41 (47.1)	0.43 (0.21-0.88)		
			GG	15 (17.4)	16 (18.4)	0.60 (0.24-1.52)		
		Dominant	AA	17 (19.7)	30 (34.5)	reference		0.030
			AG+GG	69 (80.2)	57 (65.5)	0.47 (0.23-0.93)		
			Recessive	AA+AG	71 (82.6)	71 (81.6)		
	GG	15 (17.4)		16 (18.4)	1.07 (0.49-2.32)			
	rs3804100 (Exon 3) no amino acid change	Codominant		TT	48 (57.8)	37 (42.5)	reference	0.015*
			TC	34 (41.0)	41 (47.1)	1.56 (0.84-2.92)		
			CC	1 (1.2)	9 (10.3)	11.7 (1.42-96.3)		
		Dominant	TT	48 (57.8)	37 (42.5)	reference	0.046	
			TC+CC	35 (42.2)	50 (57.5)	1.85 (1.01-3.41)		
Recessive			TT+TC	82 (98.8)	78 (89.7)	reference		
	CC	1 (1.2)	9 (10.3)	9.46 (1.17-76.4)				
	TLR4	rs11536889 (3' UTR)	Codominant	GG	24 (57.1)	45 (51.7)	reference	NS
GC				15 (35.7)	35 (40.2)	1.24 (0.57-2.72)		
CC				3 (7.1)	7 (8.0)	1.24 (0.29-5.25)		
Dominant			GG	24 (57.1)	45 (51.7)	reference	NS	
			GC+CC	18 (42.9)	42 (48.3)	1.24 (0.59-2.61)		
			Recessive	GG+GC	39 (92.9)	80 (92.0)		
CC	3 (7.1)	7 (8.0)		1.14 (0.28-4.64)				
TLR9	rs352139 (Intron 1)	Codominant		AA	25 (29.1)	22 (25.3)	reference	NS
			AG	37 (43.0)	47 (54.0)	1.44 (0.70-2.96)		
			GG	24 (27.9)	18 (20.7)	0.85 (0.37-1.97)		
		Dominant	AA	25 (29.1)	22 (25.3)	reference	NS	
			AG+GG	61 (70.9)	65 (74.7)	1.21 (0.62-2.37)		
			Recessive	AA+AG	62 (72.1)	69 (79.3)		
	GG	24 (27.9)		18 (20.7)	0.67 (0.33-1.36)			
	rs352140 (Exon 2) no amino acid change	Codominant		GG	25 (29.1)	22 (25.3)	reference	NS
			GA	37 (43.0)	47 (54.0)	1.44 (0.70-2.96)		
			AA	24 (27.9)	18 (20.7)	0.85 (0.37-1.97)		
		Dominant	GG	25 (29.1)	22 (25.3)	reference	NS	
			GA+AA	61 (70.9)	65 (74.7)	1.21 (0.62-2.37)		
Recessive			GG+GA	62 (72.1)	69 (79.3)	reference		
	AA	24 (27.9)	18 (20.7)	0.67 (0.33-1.36)				

先天性感染児の発症に関与する免疫学的要因の解析

研究分担者 中村浩幸 独立行政法人国立成育医療研究センター研究所
母児感染研究部 室長

【研究要旨】

本研究は、先天性サイトメガロウイルス（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 感染児における病態と CMV 特異的免疫応答との関連性を明らかに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 CD8+ T 細胞の性状を明らかにすることを目的として、症候性先天感染児 3 症例および無症候性先天感染児 2 症例について、HLA タイプを決定した後、MHC tetramer を用いて CMV pp65 特異的 CD8+ T 細胞の検出・定量を行った。その結果、症候性感染児 3 例中 2 例、無症候性感染児 2 例中 1 例において、CMV pp65 ペプチド抗原刺激により pp65 特異的 CD8+ T 細胞が増殖反応を示すことが示唆された。また、先天感染児における CMV 特異的 CD8+ T 細胞応答の経時変化について解析した結果、症候性感染児 2 例において、pp65 抗原刺激に対する CMV 特異的 CD8+ T 細胞の増殖応答が経時変化している可能性が示唆された。

A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症の病態形成には、ウイルス側要因と宿主側要因と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。当該疾患の病態に関連する要因について理解を深めることは、先天性 CMV 感染児の臨床経過の予測や早期の積極的介入を実現するためにも重要と考えられる。

本研究は、先天性 CMV 感染児の発症や予後に重要な役割を果たすと考えられる CMV 特異的細胞性免疫応答の特徴を明らかにするとともに、個々の先

天性 CMV 感染児にみられる病態の差異（症候性、無症候性、遅発性障害発症など）と CMV 特異的細胞性免疫応答との関連を解析し、当該疾患の病態形成メカニズムにおける CMV 特異的免疫応答の役割を明らかにすることを目的とする（図 1）。

B. 研究方法

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

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
基配列を決定した。PCR に使用したプ
ライマーは、HLA-A 遺伝子領域の増幅
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。シーケンス用プライマーと
して、5' -GGATCTCGGACCCGGAG-3' を
用いて、ダイレクトシーケンス法に
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た。
決定した塩基配列はデータベース
(dbMHC) を用いて解析し、HLA タイピ
ングを行った。

2) MHC tetramer を用いた CMV 特異的 CD8+ T 細胞の検出・定量

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 (医学生物学研究所) 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+ T 細胞を検出した (図 2)。さら
に、CMV 抗原刺激に対する CMV 特異
的 CD8+ 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、再度 MHC tetramer を用
いて CMV 特異的 CD8+ T 細胞の検出を
行った。対照として、HIV gag 蛋白質

トシーケンス法により PCR 産物の塩
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 3)。

(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。検体採取は、研究目
的を十分説明した上で、書面での同意
に基づいて行い、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

先天性 CMV 感染児の末梢血より抽出
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行っ
た。その結果、MHC Tetramer 解析が可
能な 5 症例を見出した (A*0201 の 2
症例、B*0702 の 2 症例、B*1501 の 1
症例)。

症例 1 は、症候性先天感染児であり、
生後 4 ヶ月および生後 7 ヶ月時の PBMC
を用いて、A*0201 CMV pp65
Tetramer-PE による MHC tetramer 解析
を行った。生後 4 ヶ月時には、pp65
ペプチド抗原刺激前において pp65 特
異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった。
pp65 ペプチド抗原刺激後においても、
pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されな
かった。一方、生後 7 ヶ月時の PBMC
を用いて A*0201 CMV pp65
Tetramer-PE による MHC tetramer 解析
を行った結果、pp65 ペプチド抗原刺激

前では pp65 特異的 CD8+ T 細胞を検出されなかったものの、pp65 ペプチド抗原刺激後の pp65 特異的 CD8+ T 細胞は 0.2% 検出された。

症例 2 は、症候性先天感染児であり、生後 3 ヶ月および生後 9 ヶ月時の PBMC を用いて、B*0702 CMV pp65 Tetramer-PE による MHC tetramer 解析を行った。生後 3 ヶ月時には、pp65 ペプチド抗原刺激前ならびに刺激後において pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった(図 4)。一方、生後 9 ヶ月時の PBMC を用いて同様の MHC tetramer 解析を行った結果、pp65 ペプチド抗原刺激前では pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかったものの、pp65 ペプチド抗原刺激後の pp65 特異的 CD8+ T 細胞は 0.1% 検出された(図 5)。

症例 3 は、症候性感染児であり、生後 1 ヶ月時の PBMC を用いて、B*1501 CMV pp65 Tetramer-PE による MHC tetramer 解析を行った。pp65 ペプチド抗原刺激前ならびに刺激後において pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった。

症例 4 は、無症候性先天感染児であり、生後 3 ヶ月および生後 5 ヶ月時の PBMC を用いて、B*0702 CMV pp65 Tetramer-PE による MHC tetramer 解析を行った。生後 3 ヶ月時では、pp65 ペプチド抗原刺激前後において pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった。生後 5 ヶ月時の PBMC を用いて同様の MHC tetramer 解析においても、pp65 ペプチド抗原刺激前後で pp65 特

異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった。

症例 5 は、無症候性先天感染児であり、1 歳時の PBMC を用いて A*0201 CMV pp65 Tetramer-PE を用いた MHC tetramer 解析を行った。pp65 ペプチド抗原刺激前では pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかったが、pp65 ペプチド抗原刺激後の pp65 特異的 CD8+ T 細胞は 0.4% 検出された(図 6)。

D. 考察

本研究では、症候性先天感染児 3 例および無症候性先天感染児 2 例について、MHC Tetramer を用いて CMV 特異的 CD8+ T 細胞の検出、定量を行った。3 例の症候性先天感染児とも、pp65 ペプチド抗原刺激前に pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった。一方、3 症例中 2 症例において、pp65 ペプチド抗原刺激後に pp65 特異的 CD8+ T 細胞を検出した。このことから、症候性感染児において、pp65 ペプチド抗原刺激に対して増殖応答を示す pp65 特異的 CD8+ T 細胞が存在する可能性が示唆された。また、2 例の無症候性先天感染児について、2 例とも pp65 ペプチド抗原刺激前に pp65 特異的 CD8+ T 細胞は検出されなかった。一方、1 例の無症候性感染児において、pp65 ペプチド抗原刺激後に pp65 特異的 CD8+ T 細胞を検出した。これらの結果から、症候性感染児および無症候性感染児において、pp65 ペプチド抗原刺激に対して増殖応答を示す pp65 特異的 CD8+ T 細胞が存在する可能性が示唆された。

次に、先天性 CMV 感染児における CMV 特異的免疫応答の経時変化の有無と病態との関連性を明らかにする目的で、症候性感染児 2 例および無症候性感染児 1 例において、pp65 特異的 CD8+ T 細胞の経時変化を解析した。その結果、症候性感染児 2 例において、pp65 抗原刺激に対する CMV 特異的 CD8+ T 細胞の増殖応答が経時変化し増強している可能性が示唆された。無症候性感染児 1 例については、同様の経時変化は同定されなかった。症候性感染児にみられた pp65 特異的 CD8+ T 細胞の経時変化が、先天感染児の発育に伴う変化であるのか、さらに先天感染児の病態や予後と関連があるのかについては現時点では不明である。今後、先天感染児の CMV 特異的 T 細胞応答が発育や病態変化に伴ってどのように変化するのか、解析を継続する必要があると考えられる。また、症候性感染児と無症候性感染児において、CMV pp65 特異的 CD8+T 細胞の数的質的な違いが存在するのかについても現時点では明らかでないため、さらに多くの先天性 CMV 感染児において、CMV 特異的免疫応答の特徴を解析し、臨床経過の差異と CMV 特異的免疫応答との関連について、データを蓄積することが重要と考えられる。

本研究で使用した各種 MHC Tetramer は、いずれも CMV pp65 蛋白質由来の抗原ペプチド (A*0201 Tetramer が NLVPMVATV、B*0702 Tetramer が TPRVTGGGAM、B*1501 Tetramer が KMQVIGDQY) を認識する

CD8+ T 細胞を検出することが可能である。CMV 特異的 T 細胞が標的とする CMV 蛋白質の中で、pp65 および IE1 が immunodominant antigen として知られているが、1 歳未満の乳児においては、pp65 よりも IE1 に対する T 細胞応答が優勢であるとの報告がある (Gibson L et al., 2004)。そのため、先天感染児における IE1 特異的 CD8+ T 細胞の性状にも興味を持たれる。しかし、IE1 抗原を認識する CD8+ T 細胞を検出するための MHC Tetramer の利用が HLA タイプ B*0801 に限られるため、今回の症例については、IE1 特異的な CD8+ T 細胞の解析を行うことができなかった。今後は、IE1 ペプチド抗原刺激に対する T 細胞の IFN- γ 産生能などの解析によって、IE1 に対する CMV 特異的 T 細胞の機能解析を進めることが重要と考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Imadome K, Yajima M, Arai A, Nakazawa A, Kawano F, Ichikawa S, Shimizu N, Yamamoto N, Morio T, Ohga S, Nakamura H, Ito M, Miura O, Komano J, Fujiwara S. Novel mouse xenograft models reveal a critical role of CD4+ T cells in the proliferation of EBV-infected T and NK cells. *PLoS Pathog.* 7: e1002326, 2011

2. 学会発表

- 1) Liao H, Lee JH, Inoue N, Miyado

K, Fujiwara S, Nakamura H.
Characterization of human
cytomegalovirus UL136 gene
product. International Union of
Microbiological Societies 2011
Congress, September 21th, 2011.
Sapporo

F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 1

研究目的

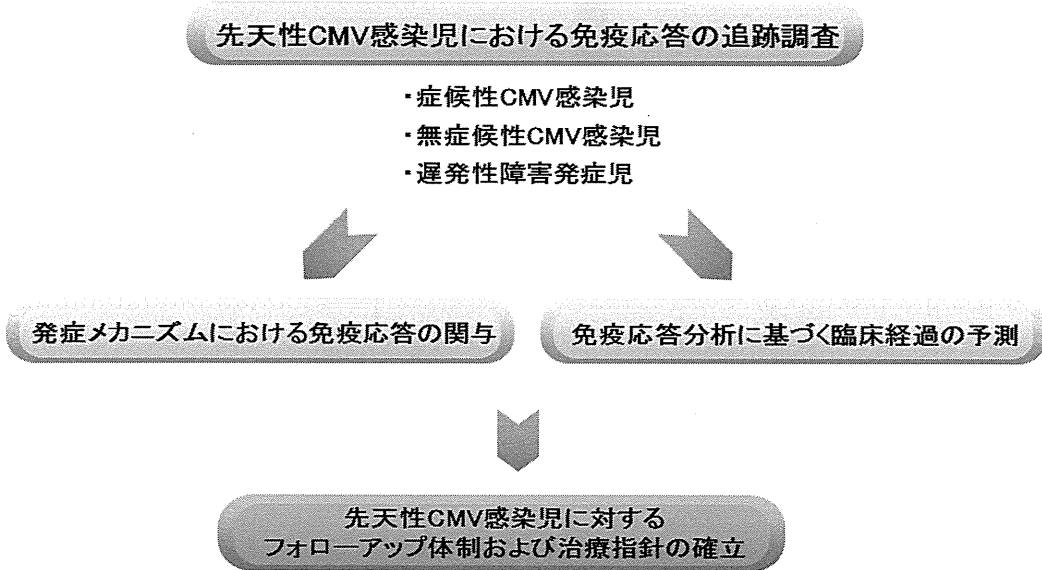


図 2

MHC Tetramerを用いたCMV特異的CD8⁺T細胞の検出

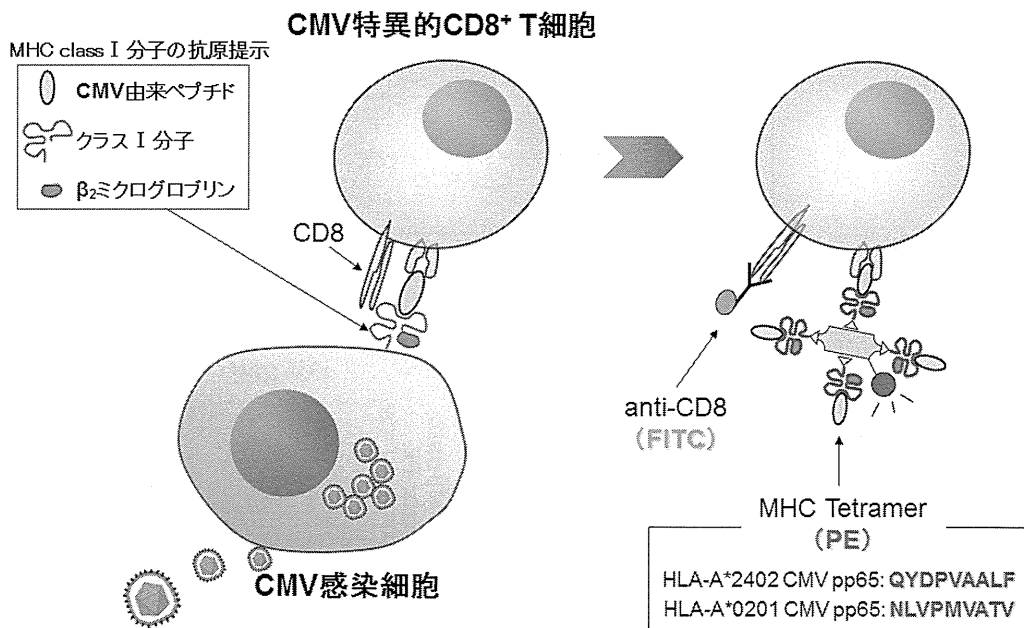


図 3

MHC Tetramerを用いたCMV特異的CD8⁺T細胞の検出

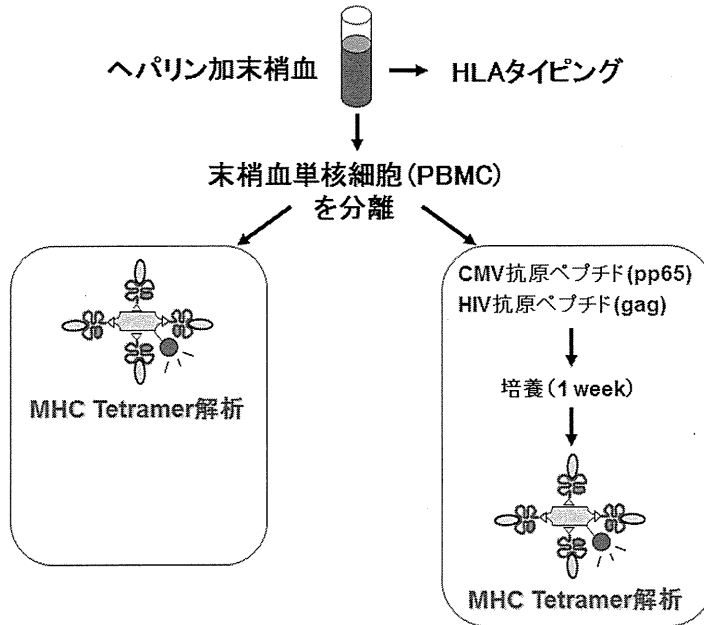


図 4

生後3ヶ月

