

グとその対応について 1、第 118 回
播州産婦人科セミナー（特別講演）、
平成 24 年 10 月 13 日、姫路

床フォーラム、平成 25 年 1 月 12 日、
神戸

23) 三輪明弘、森岡一朗、長坂美和子、
香田 翼、松尾希世美、横田知之、
森川 悟、柴田暁男、山田秀人、飯
島一誠：先天性サイトメガロウィル
ス（CMV）感染症に対する病型に応じ
たバルガンシクロビル（VGCV）療法
の副作用および臨床効果に関する検
討、第 57 回日本未熟児新生児学会、
平成 24 年 11 月 25-27 日、熊本

28) 山田秀人：妊婦感染症スクリーニン
グとその対応について 2、第 119 回
播州産婦人科セミナー（特別講演）、
平成 25 年 2 月 16 日、姫路

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

24) 松尾希世美、森岡一朗、長坂美和子、
香田 翼、横田知之、森川 悟、三
輪明弘、柴田暁男、山田秀人、飯島
一誠：先天性サイトメガロウィルス
感染症における脳室拡大の定量的評
価、平成 24 年 11 月 25-27 日、熊本

25) 山田秀人：サイトメガロウイルス母
子感染の抑制 胎児・新生児治療、第
10 回日本胎児治療学会（招請講演）、
平成 24 年 11 月 30 日-12 月 1 日、仙
台

26) 足立陽子、園山綾子、平久進也、谷
村憲司、蝦名康彦、森岡一朗、山田
秀人：母子感染に関する妊婦の知識
調査、第 3 回神戸産婦人科臨床フォ
ーラム、平成 25 年 1 月 12 日、神戸

27) 長又哲史、蝦名康彦、園山綾子、谷
村憲司、森岡一朗、平久進也、峰松
俊夫、井上直樹、山田秀人：効果的
な妊婦 CMV スクリーニング法の確立
を目指して、第 3 回神戸産婦人科臨

表1 妊婦健診における感染症スクリーニング実施率

感染症	実施している	希望者にのみ実施	未実施	未回答	実施率 (%)
CMV 抗体	90	15	1,879	6	4.5
トキソプラズマ抗体	962	59	961	8	48.5
風疹抗体	1,951	4	12	23	99.2
梅毒血清反応	1,966	2	0	22	99.9
HIV 抗体	1,962	2	4	22	99.7
HTLV-1 抗体	1,964	1	3	22	99.8
HBs 抗原	1,967	1	0	22	99.9
HCV 抗体	1,964	0	4	22	99.8

図1 トキソプラズマの都道府県別スクリーニング実施率 (%)

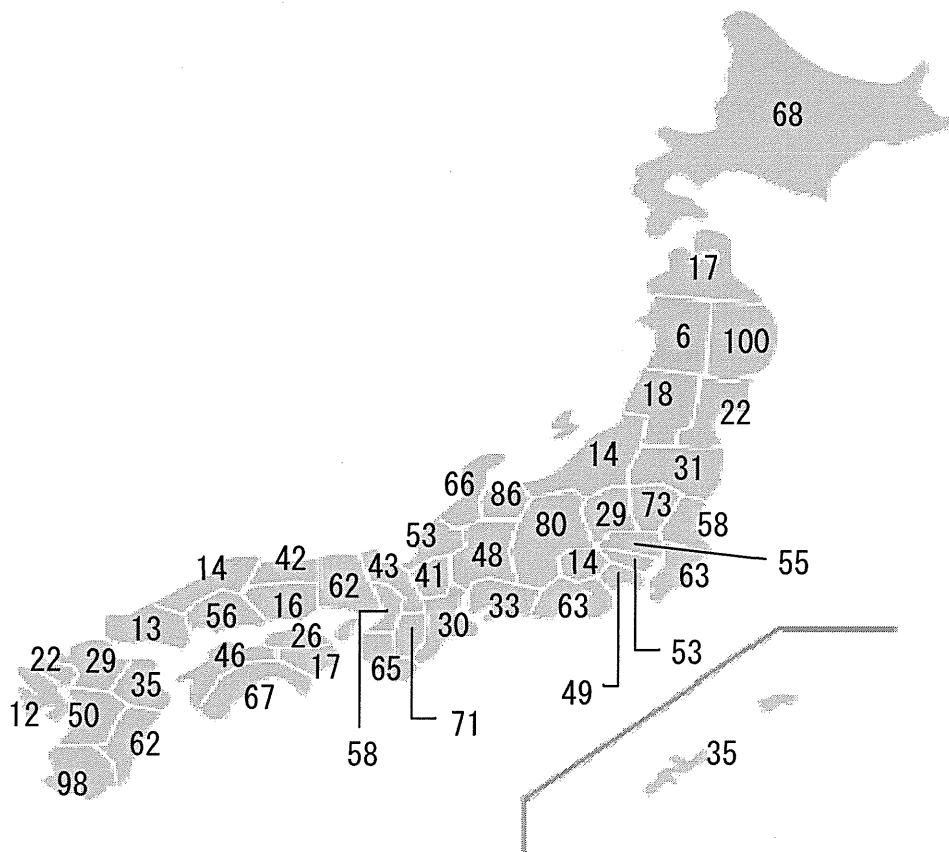


表 2 先天性感染の一次アンケート調査による報告症例数 (2011 年)

先天性感染	中絶	流産	死産	分娩
先天性 CMV 感染	5	3	3	58
先天性トキソプラズマ感染	2	1	1	72
先天性風疹感染	4	0	2	18
先天性梅毒感染	1	0	0	21
先天性ヘルペス感染/ 新生児ヘルペス	0	0	1	21
先天性パルボウイルス B19 感染	4	48	28	146

表 3 先天性感染の二次アンケート調査による先天性感染数 (2011 年)

先天性感染	中絶	流産	死産	分娩
先天性 CMV 感染	3 (1)	0 (3)	2 (1)	29 (3)
先天性トキソプラズマ感染	0 (2)	0 (0)	0 (1)	1 (13)
先天性風疹感染	1 (1)	0 (0)	1 (0)	2 (3)
先天性梅毒感染	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (5)
先天性ヘルペス感染/ 新生児ヘルペス	0 (0)	0 (0)	1 (0)	7 (1)
先天性パルボウイルス B19 感染	3 (1)	35 (13)	14 (0)	17 (63)

括弧内は不確定数：母体感染は確定的だが児や胎児付属物の検査等が不適切、不十分のため先天性感染の有無を確定できない症例数

先天性サイトメガロウイルス感染症における血清診断および免疫グロブリン製剤の評価

研究分担者 峰松 俊夫 愛泉会日南病院疾病制御研究所 所長

【研究要旨】

本邦で販売されている免疫グロブリンのインタクト型製剤および体内でインタクト型に変化するスルホ化製剤について、中和抗体価、受け身赤血球凝集抗体価、Enzyme-linked immunosorbent assay 抗体価、Avidity Index を測定・評価した。また、10年前に製造・販売されたそれぞれの製剤（-80℃保存）についても同様に評価した。

国内献血血漿プール由来製品については、その製法や剤状は抗体価や Avidity Index に有意な差は認めなかった。海外血漿プール由来製品については、抗体価に大きな差を認めた。海外血漿プール由来製品は血漿採取国（ドイツおよび米国）、献血・非献血の違いがあるが、製法の違いが抗体価の差異に大きな影響を与えている可能性があり、サイトメガロウイルス（CMV）以外の病原体に対する抗体価についても比較検討の余地が残された。

A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は、乳幼児に神経学的後遺症を残しうる先天性感染症のうち最も感染頻度が高い。出生時に CMV 感染の診断を実施し、ガンシクロビル等の抗 CMV 薬の投与する治療法が試みられているが、中枢神経障害の改善がみられない症例がある。また、先天性 CMV 感染症に対して世界初の抗 CMV 薬ガンシクロビル胎児投与を行った症例では胎児が死亡している。先天性 CMV 感染症の胎内治療では、抗 CMV 薬は胎児に対しての副作用が懸念されている。

1995年に世界に先駆けて本邦で胎児腹腔内免疫グロブリン製剤の投与による先天性 CMV 感染症の胎内治療が実施された。それ以降も、同様の胎内治療が国内の複数の産科施設で実施されてきた。

本邦においては、血漿プールが異なる製剤（日本献血、ドイツ献血、アメリカ

非献血）、製法や製剤の剤形が異なる製剤が混在している。これら製品の抗 CMV 抗体価は製造・発売会社毎に測定されているが、その公表値は各社ごとに大きな違いがある。

そこで本研究においては、本邦で発売されている免疫グロブリン製剤について、抗体価および Avidity Index を比較・評価した。さらに10年前に製造・販売された製品と現在販売されている製品とで抗 CMV 抗体価等が変化しているかを研究した。

B. 研究方法

1) 免疫グロブリン製剤（表1）

日本国内において免疫グロブリン製剤を販売している6社分の製剤を試料とした。インタクト型製剤として、ポリエチレングリコール（PEG）処理液状製剤、PEG 処理乾燥製剤、イオン交換樹脂処理乾燥製剤、pH4 処理液状製剤、pH4 処理乾燥製剤を用いた。また、スルホ化処理乾燥製

剤とそれをシステイン処理してインタクト型に再構成したものをを用いた。それぞれの商品を -80°C に1日凍結し、融解したものをについて、2ロット数ずつ中和抗体価等を測定した。

なお、これらの製剤について、10年間 -80°C 保存していたものと、最近の製品で -80°C で凍結・融解したものとで中和抗体価等を比較した。

2) 受け身赤血球凝集反応 (passive hemagglutination test: PHA)

CMV(AD169)感染96時間後のヒト線維芽細胞から、CMV糖タンパクをLentil Lectin Sepharose 4Bカラムを用いて抽出した。羊赤血球をグルタニールアルデヒドで固定した。0.001%タンニン酸を用いて、抽出したCMV糖タンパクを固定済みの羊赤血球に感作させた。感作赤血球をリン酸緩衝液で洗浄し、赤血球浮遊液に0.8%となるように浮遊させた。

最初に免疫グロブリン製剤を100倍希釈し、96穴V型マイクロプレート上でさらに倍数希釈した。CMV糖タンパク感作赤血球を添加し、赤血球凝集パターンを3時間後に判定してPHA抗体価を決定した。

3) 中和抗体価測定

免疫グロブリン製剤を試験管内で段階希釈し、さらにモルモット補体あるいは細胞培養液を加えた。約120 plaques forming unit (PFU)のCMV AD169株をそれぞれの免疫グロブリン製剤の希釈液に加えて、CMVと抗体とを 37°C で1時間反応させた。直径35mmディッシュに単層培養したヒト線維芽細胞にCMV-抗体反応液とを0.1mL接種した。1時間の吸着後に2.25%メチルセルロース入り培養液を重層し、2週間培養した。メチレンブルー液で細胞を固定・染色し、ブラック数を数えた。

モルモット補体を加えたものは補体要求性中和抗体、補体を添加せず培養液の

みを加えたものは補体非要求性中和抗体として測定した。中和抗体価はコントロールの50%にブラック数を減少させる免疫グロブリン製剤の希釈倍数で表した。

4) Enzyme-linked immnosorbent assay (ELISA)

ELISAはシーメンス社のエンザイグノストBサイトメガロ/IgGキットを用い、添付マニュアル書に従って抗CMV抗体価を測定した。

5) Avidity Index

Avidityの測定はBlackburnら(J. Med. Virol. 33:6-9, 1991)の尿素変性ELISA法に準じてインデックス化して表す方法を採用した。ELISAキットはシーメンス社エンザイグノストBサイトメガロ/IgGキットを用いた。まず、キットそれぞれの使用説明書に記載のように被験者血清を希釈して、ELISAプレートのウェルに添加して抗原と1時間反応させた。この際、一検体につき2つの抗原ウェルに添加した。抗原との反応終了後、一つの抗原ウェルは抗体変性剤である8M尿素を含むPBS-Tween洗浄液で、もう一つの抗原ウェルは尿素を含まないPBS-Tween洗浄液でウェルを洗浄した。その後は添付マニュアル書の通りに、標識抗体の添加、基質液を添加させて吸光度を測定した。8M尿素を含む洗浄液で洗浄したウェルの吸光度を尿素を含まない洗浄液で洗浄したウェルの吸光度を除算し、その百分率をAvidity Index (AI)として表した。

C. 研究結果

各種免疫グロブリンについて、補体非要求性中和抗体価(-C)、補体要求性中和抗体価(+C)、PHA抗体価、ELISA抗体価、AIを測定した(表2)。

A-E社によるインタクト型免疫グロブリン製剤では、抗体価が高い製品ほどAIは高く算出された。

スルホ化製剤では補体による中和活性の上昇が認められなかったが、そのシステイン再構成製剤では補体による中和活性の上昇が認められた。また、受け身凝集反応による抗体価はスルホ化製剤で高値であったが、中和抗体価、ELISA 抗体価や Avidity Index は再構成製剤の方が高値であった。

国内献血血漿をプールとする製品は剤形や製法による抗体価の差はほとんど認めなかった。しかし、海外献血血漿をプールとする製品は抗体価および Avidity 指数ともに低値であった。一方、海外非献血血漿プール製品は抗体価、Avidity Index ともに高値であった。

また、現在の製品と 10 年前の製品との比較では、多くの製品で抗体価等に有意な差は認めなかった（表 3）。しかし、B 社の粉末ポリエチレングリコール処理製剤は現在の製品の方が抗体価、Avidity 指数ともに高値であった。なお、D 社の粉末 pH4 処理製剤は 10 年前の製品の凍結保存品がなく、比較できなかった。

D. 考察

先天性 CMV 感染症の胎児治療において、免疫グロブリン製剤の有用性の検討が行われている。しかし、治療にはさまざまな免疫グロブリン製剤が用いられており、その有用性の標準的評価は困難となっている。本邦では血漿プールや製法・剤形が異なる免疫グロブリン製品が販売されており、どれひとつとして同じものは無い状況である。

ELISA においては、被検抗体の反応後および二次抗体反応後に洗浄操作を行っている。そのため、抗原結合力が弱い抗体は ELISA では洗浄除去される。中和法や凝集法では抗原抗体反応後に洗浄操作を必要とせず、抗原結合力が弱い抗体の影響も結果に反映される。

今回、PHA において CMV 糖タンパク抗原を赤血球に感作させた。これは CMV の中和反応に関与するのは gB 抗原や gH 抗原などのエンベロープ糖タンパク抗原であるため、PHA 反応において中和反応を反映した結果を得られやすいと考えたためである。

各免疫グロブリン製剤は抗 CMV 抗体価が高いほど、Avidity は高値となった。製剤を希釈して測定すると、Avidity も低値となるため、測定系原理（Avidity 算出法）の影響があると考えられる。しかしながら、抗体価が高値かつ AI 高値の抗体ほど CMV が不活化されるので、採用した Avidity 測定系は、抗体価を一定にして測定比較する本来の Avidity 測定法よりも抗体の抗 CMV 効果を表現しやすいとも考えられた。

本研究の結果において、国内献血血漿プールを原料とした製品は製法や剤状（液状もしくは粉末）による抗体価や Avidity Index に特に大きな差異を認めなかった（スルホ化製剤は再構成してインタクト型に戻したもので比較）。よって、抗体価および Avidity は原料となる血漿プールの影響を反映すると考えられた。

海外献血血漿を原料とした D 社の粉末 pH4 製剤は他の製品よりも低値であった。D 社が自社製品として公表している抗 CMV 抗体価も低値であり、海外献血血漿プールの抗 CMV 抗体価が低い可能性に加えて、製法や保管方法の影響も低抗体価製品となっている可能性があった。D 社製品については他の病原体への抗体価の評価と比較も必要と考えられた。一方、E 社の海外非献血血漿プール由来製品は抗体価も AI も高値であった。

通常、ヒト免疫グロブリン製剤は数万人分の血漿プールから製造されている。したがって、その製剤中の抗体の評価を

行うことは、血漿プール集団の免疫状態を調査することになると考えられる。近年、日本人の抗 CMV 抗体保有率の低下が報告されている。そのため、最近の製剤は以前の製剤と比べて抗 CMV 抗体価が低下していることが予想された。しかし、今回の研究からは抗 CMV 抗体価の有意な低下は認められなかった。今後とも免疫グロブリン製剤の抗 CMV 抗体価の評価は続ける必要があると考えられた。

B 社の 10 年前の粉末 PEG 製剤の抗 CMV 抗体価は低値（10 年前の測定時も低値）であったが、現在の製品は他の国内献血血漿プール製剤とほぼ同じ抗体価であった。B 社製品については 10 年前と現在では購入ルート（納品会社）が異なっていた。製品の運送状況・保管方法が抗体価に影響する可能性も考えられた。

E. 結論

- 1) 免疫グロブリン製剤の抗体価と Avidity Index は、製法・剤形よりも原料血漿プールの影響が大きい。
- 2) 近年、日本人の CMV 感染率は低下していることが報告されているが、現在までに免疫グロブリン製剤の抗 CMV 抗体価の低下は認めていない。
- 3) 製品の運送・保管状況によっては抗体価の低下が起る可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sonoyama A, Ebina Y, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Low IgG avidity and ultrasound fetal abnormality were predictive of congenital cytomegalovirus infection. J Med Virol, 84, 1928-1933, 2012
- 2) Matsuo K, Morioka I, Oda M,

Kobayashi Y, Nakamachi Y, Kawano S, Nagasaka M, Koda T, Yokota T, Morikawa S, Miwa A, Shibata A, Minematsu T, Inoue N, Yamada H, Iijima K. Quantitative evaluation of ventricular dilatation using computed tomography in infants with congenital cytomegalovirus infection. Brain Dev. In press, 2013

2. 学会発表

- 1) Ebina Y, Sonoyama A, Morioka I, Tanimura K, Morizane M, Tairaku S, Minematsu T, Inoue N, Yamada H. Low IgG avidity and ultrasound fetal abnormality predict congenital cytomegalovirus infection. Combined meeting of the 4th Congenital Cytomegalovirus Conference/the 14th International CMV/Beta Herpes Workshop, October 29 to November 2, 2012, San Francisco, USA.
- 2) 園山綾子、蝦名康彦、谷村憲司、森岡一朗、森實真由美、平久進也、峰松俊夫、山田秀人：CMV IgM 陽性妊婦における先天性 CMV 感染の発生予測、第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 24 年 4 月 13-15 日、神戸
- 3) 金子政時、楠元和美、峰松俊夫、鮫島浩、池ノ上克：IgM 指数, IgG avidity index, および超音波断層法を組み合わせた症候性胎内サイトメガロウイルス感染症の出生前スクリーニング法、第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会、平成 24 年 4 月 13-15 日、神戸
- 4) 園山綾子、谷村憲司、森岡一朗、森實

真由美、平久進也、峰松俊夫、山田秀人：CMV IgM 陽性妊婦における先天性 CMV 感染の発生予測、第 48 回日本周産期新生児医学会、平成 24 年 7 月 8-10 日、大宮

- 5) 金子政時、楠元和美、峰松俊夫、大橋昌尚、鮫島浩、池ノ上克：母体血清学的検査と胎児超音波断層法による胎内サイトメガロウイルス感染症スクリーニング法の有効性の検討、第 48 回日本周産期新生児医学会、平成 24 年 7 月 8-10 日、大宮
- 6) 長又哲史、蝦名康彦、園山綾子、谷村憲司、森岡一朗、平久進也、峰松俊夫、井上直樹、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して、第 7 回周産期新生児感染症研究会、平成 24 年 9 月 22 日、神戸
- 7) 長又哲史、蝦名康彦、園山綾子、谷村憲司、森岡一朗、平久進也、峰松俊夫、井上直樹、山田秀人：効果的な妊婦 CMV スクリーニング法の確立を目指して、第 3 回神戸産婦人科臨床フォーラム、平成 25 年 1 月 12 日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 測定に用いた免疫グロブリン製剤

製造会社	製法	剤形	血漿プールの由来
A社	ポリエチレングリコール処理	液状	国内献血
B社	ポリエチレングリコール処理	粉末	国内献血
C社	pH4処理	液状	国内献血
D社	pH4処理	粉末	ドイツ献血
E社	イオン交換樹脂処理	液状	米国非献血
F社	スルホ化	粉末	国内献血
	システイン処理 再構成製剤	液状	国内献血

表2 各種免疫グロブリン製剤の抗体価および Avidity Index (AI)

製造会社	剤形/製法	血漿プール	NT(-C)	NT(+C)	PHA	ELISA	AI
A社	液状PEG処理	国内献血	160	300	12800	38700	81.2
			154	282	12800	36700	80.3
B社	粉末PEG処理	国内献血	150	280	12800	35600	80.1
			142	280	6400	31800	80.0
C社	液状pH4処理	国内献血	156	288	12800	33500	81.0
			152	280	12800	32900	80.6
D社	粉末pH4処理	ドイツ献血	60	110	1600	16800	69.2
			54	104	1600	15900	68.0
E社	液状イオン 交換樹脂処理	米国非献血	178	352	12800	41100	82.6
			174	348	12800	40800	82.0
F社	粉末スルホ化	国内献血	130	132	51200 \leq	24200	72.4
			124	130	51200 \leq	24000	72.3
	液状システイン処理 スルホ化製剤再構成	国内献血	154	290	12800	36600	81.0
			154	284	12800	36500	80.3

PEG : ポリエチレングリコール

表3 現在と10年前の免疫グロブリン製剤の抗体価の比較

製造会社	剤形/製法	血漿プール	現在の製品		10年前の発売製品	
			NT(-C)	NT(+C)	NT(-C)	NT(+C)
A社	液状PEG処理	国内献血	160	300	172	310
			154	282	150	274
B社	粉末PEG処理	国内献血	150	280	86	158
			142	280	80	156
C社	液状pH4処理	国内献血	156	288	158	300
			152	280	162	300
D社	粉末pH4処理	ドイツ献血	60	110	ND	ND
			54	104	ND	ND
E社	液状イオン 交換樹脂処理	米国非献血	178	352	168	300
			174	348	162	286
F社	粉末スルホ化	国内献血	130	132	132	130
			124	130	130	132
	液状システイン処理 スルホ化製剤再構成	国内献血	154	290	158	294
			150	284	156	290

PEG : ポリエチレングリコール, ND : 測定せず

唾液による新生児先天性サイトメガロウイルス感染マスキングへの 母乳栄養の影響

研究分担者 古谷野 伸 旭川医科大学小児科 講師
研究協力者 長森 恒久 旭川医科大学小児科
森内 浩幸 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科小児科

【研究要旨】

【目的】様々な国で試みられている先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染に対する新生児スクリーニングは、検体に尿や唾液・血液を用いる方法がとられている。血液中のウイルス量は尿や唾液に比べて少なく、感度に問題があることが指摘されており、米国では唾液を用いたスクリーニングが主流になりつつある。しかし、母乳にはCMVが排出されることが明らかとなっており、唾液を用いたスクリーニングに母乳が与える影響は無視できないと推定される。そこで唾液を用いたスクリーニングに対する母乳の影響を解析した。

【方法】研究協力産科病院で同意の得られた19組の母子から母乳、新生児の唾液・尿を採取した。唾液は哺乳後30分以内と哺乳直前の2回採取した。母乳、唾液からはDNAを抽出してPCRの検体とした。尿は濾紙をそのまま検体としてPCRを行った。

【結果】19組の内、母乳4検体からCMV DNAが検出された。また新生児4名の唾液から同様にCMV DNAが検出された。CMV陽性となった唾液はいずれも哺乳30分以内に採取したもので、哺乳直前に採取した唾液からは、CMV DNAは検出されなかった。母乳および唾液両方でCMVが検出された2組の母子のうち、調べる事の出来た1組でCMV DNAの塩基配列が同一であった。

【考察】唾液を用いて先天性CMV感染スクリーニングを行う場合は、母乳によるCMV DNAの混入が起こりうる事を認識しなければならない。哺乳直前の唾液からはCMVが検出されなかったため、唾液採取のタイミングを哺乳直前に限定する必要があると考えられる。

A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は最も多い先天感染のひとつであり、現在、日本での頻度は全出生児のうちの0.3%である。そのうちの20%以上の感染児が出生時に点状出血、黄疸、肝脾腫、小頭症などの症状を伴っている症候性感染児である。一方、残

り70%以上の先天性感染児は無症候性であるが、無症候性感染児の10%程度にCMV感染を原因とする聴覚障害や発達障害が遅発性に起こってくる。したがって新生児期に症状がない無症候性感染児も発達や聴力等を厳密に経過観察すべきであり、そのためには新生児スクリーニングが不可欠である。

現在、世界各地で新生児スクリーニングが試みられているが、その検体は血液・尿・唾液が用いられている。血液は、含まれている CMV コピー数が一般的に少なく、感度の点での問題が明らかになってきている。ウイルスコピー数という観点ならば、尿と唾液は同等のウイルス量が存在すると考えられる。日本では、尿を用いたスクリーニングが試みられているが、米国ではアラバマ大学中心に唾液によるスクリーニングが行われている。

しかし唾液によるスクリーニングには、母乳栄養による CMV 混入のリスクが懸念される。CMV 既感染の母親は、母乳中に一定の確立で CMV を排出することが知られており、哺乳後に唾液を採取すれば母乳中の CMV を検出する可能性が出てくる。

そこでその母乳栄養がスクリーニングに与える影響を検討するため、同意の得られた母子から、母乳、唾液、尿を採取し、CMV DNA の検出を試みた。

B. 研究方法

対象は研究協力病院で同意の得られた 19 組の母子（1 組は双胎）である。母親からは母乳を 1ml ほど採取し、そこから 1 回遠心して脂肪成分を除いた後に Qiagen Mini kit を用いて DNA を抽出した。母乳栄養の新生児からは、哺乳 30 分以内と哺乳直前の唾液をスワブで採取し、乾燥後に Qiagen Mini kit を用いて DNA を抽出した。新生児尿はおむつに濾紙をはさみ、尿がしみこんだ濾紙を直接 PCR の検体とした。

(倫理面への配慮)

すべての臨床データは患者家族に文書で同意を得て収集・解析を行った。本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得ている

C. 研究結果 (表 1)

1. 母乳中の CMV DNA

対象者 19 名の内、出産後 2 日目の母親 2 名 (No. 2, 3) および出産後 3 日目 (No. 9)、出産後 4 日目 (No. 12) の母親からの母乳中に CMV DNA が検出された。ウイルス量は 4 検体とも、 $1.0 \times 10^4/\text{ml}$ 程度であった。

2. 唾液中の CMV DNA

新生児 20 名のうち No. 3, 4, 9, 20 の新生児の唾液から CMV DNA が検出された。いずれも哺乳後 30 分以内の検体から検出されており、哺乳直前の唾液からは検出されなかった。

3. 尿中の CMV DNA

尿中からは、いずれの新生児からも CMV DNA は検出されなかった。したがって今回の対象者から先天性 CMV 感染者は出ていないことが確認できた。

4. CMV 塩基配列の比較

No. 3, 9 の母子ペアで母乳・唾液両方から CMV DNA が検出された。そのうち No. 9 の CMV DNA の塩基配列を比較したところ、同じウイルス株である事が判明した。

D. 考察

先天性 CMV 感染症は、出生時に無症候性であっても、遅発性に症状が顕在化する場合がある。したがって新生児

マスキングで感染児を発見し、その後嚴重な経過観察を行う事は、症候が顕在化した時点での早期介入を可能にする。現在、日本、米国、欧州で先天性 CMV 感染に対する新生児スクリーニングが試験的に試みられているが、米国では唾液を用いた新生児スクリーニングが主流となっている。一方日本では、尿を用いたスクリーニングを行っており、ウイルス量の観点からは、両検体とも同等の感度が見込まれる。しかし唾液を用いたスクリーニングの場合、CMV 既感染の母親が、一定の確立で母乳中に CMV を排泄する事実から、母乳による唾液検体への CMV 混入が懸念される。これは感染児ではないにもかかわらず、CMV DNA が検出されるため、偽陽性の原因となる。そこで唾液による新生児マスキングに対する母乳の影響を調べるため、今回の研究を行った。

今回調べた 20 名の新生児のうち、4 名の唾液から CMV DNA が検出された。いずれの新生児も尿中の CMV は陰性であった事から、この 4 名は偽陽性例ということになる。これはかなり高い陽性率であり、やはり母乳中に存在する CMV が、唾液による新生児スクリーニングに少なからず影響を与えることが実証できたと考えられる。また 19 名中 4 名の母乳中に CMV DNA が検出されたことも、唾液から CMV が検出された事実を裏付ける証拠となるであろう。

さらに母乳と唾液の両方から CMV DNA が検出された母子ペア (No. 9) の、ウイルスを比較したところ、両検体から検出されたウイルスの塩基配列は完全に一致しており、母乳中のウイルス

が、新生児の唾液に移行し検出されたという事実を示している。従って唾液によるスクリーニングを行う際は、母乳の影響を最小限に抑える努力をしなければ成らない。

今回我々は、哺乳直前という最も母乳の影響が少ないと思われるタイミングでの唾液も検討しているが、哺乳直前の唾液からは、全く CMV は検出されなかった。20 名を対象とした少数例の検討のため断定は難しいが、少なくとも唾液を採取する際は、哺乳直前という最も母乳の影響の少ないタイミングを厳密に守る必要があると考えられる。唾液によるスクリーニングが、家庭で検体採取が行われる形態になるのであれば、その検体採取のタイミングの担保が大きな問題となることが予想される。現在我々が行っている尿を検体とするスクリーニングでは、母乳の影響は全くない。また日本では出産後 5 日程度は産科病院で入院している事が一般的であり、その間にスクリーニングの検体を医療スタッフが採取することが可能である。その国や地域のシステムに合致したスクリーニングの形態を構築して行く努力が重要であると考えられる。

E. 結論

唾液を用いた先天性 CMV 感染マスキングで前は、母乳の影響を考慮し、哺乳直に検体を採取する必要があると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyano S, Inoue N, Nagamori T,

Moriuchi H, Azuma H. Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. Arch Dis Child-Fetal. 98: F182. 2013

- 2) Nagamori T, Koyano S, Asai Y, Nohara F, Okamoto T, Nagaya K, Hayashi T, Miura Y, Tsuda N, Iseki K, Azuma H. Sequential changes in pathophysiology of systemic inflammatory response in a disseminated neonatal herpes simplex virus (HSV) infection. J Clin. Virol. 53: 265-267. 2012

2. 学会発表

- 1) Koyano S, Inoue N, Moriuchi H, Nagamori T. Timing of specimen collection is critical for saliva-based screening programs for congenital cytomegalovirus infection. 4th Congenital Cytomegalovirus Conference, October 29 - November 2, 2012. San Francisco, U. S. A.
- 2) 古谷野 伸、森 泰宏：先天性サイトメガロウイルス感染予防のための未感染妊婦に対する感染防止介入の試み。第33回道北小児科懇話会、平成24年12月8日、旭川

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 1

Baby No.	Days after parturition	mother		newborns		notes
		breast milk*	urine	saliva		
				before feeding	after feeding*	
1	2	-	-	-	-	
2	2	9.8×10^3	-	-	-	
3	2	1.4×10^4	-	-	1.8×10^4	
4	3	-	-	-	8.0×10^3	
5	3	-	-	-	-	
6	3	-	-	-	-	
7	3	-	-	-	-	
8	3	-	-	-	-	
9	3	$^{\$}1.7 \times 10^4$	-	-	$^{\$}8.8 \times 10^3$	$^{\$}$ identical strain
10	4	-	-	-	-	
11	4	-	-	-	-	
12	4	1.9×10^4	-	-	-	
13	4	-	-	-	-	
14	4	-	-	-	-	
15	5	-	-	-	-	
16	5	-	-	-	-	
17	5	-	-	-	-	} twins
18	5	-	-	-	-	
19	6	-	-	-	-	
20	7	-	-	-	1.1×10^4	

* CMV copy number/ml, - CMV DNA-negative

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】

濾紙尿スクリーニング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 11 名について頭部画像所見・聴力・発達状況についてのフォローアップ内容をまとめた。2 例で難聴を認めたが、両者ともに新生児期にすでに指摘されていたもので、遅発性難聴を発症した例はなかった。神経発達状況については比較的良好な発達を示しており、明らかな発達の遅れや神経学的な異常所見を指摘される例はなかった。頭部画像検査では、新生児期に指摘された大脳白質の信号変化の所見は消退傾向を認めたが、難聴を認めた 2 例については 1 歳 6 か月時のフォローアップ MRI にて白質の信号変化が指摘されており、難聴を呈する場合には中枢神経系への影響が大きい可能性が示唆された。今後さらに幼児期後半から就学にかけて高次脳機能や認知機能に併せて、行動面などについても観察をしていく必要があると考えられた。

A. 研究目的

先天性 CMV 感染による中枢神経系の後遺症については、脳皮質形成異常や水頭症などの重度の障害が知られており、脳性麻痺などの重篤な後遺症の原因となる。さらに大脳白質の信号変化などの白質病変の存在が明らかになってきている。しかし、その病的な意義は不明であり、例えば言語発達遅滞や軽度知的障害、あるいは自閉症や注意欠陥多動症候群などの発達障害との関連については、十分に検討されていない。

平成 23 年 2 月までの厚生労働科学研究として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付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付属病院 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。新生児期の症候として 3 名が低出生体重児であり、2 名で小頭を認めたが、いわゆる古典的な肝脾腫や血小板減少症などの臨床症状を認めた例はなかった。こうした例は、CMV のスクリーニング検査によって先天感染が明かとなった例であり、全例、従来分類での非症候性の先天性 CMV 感染児であった。

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で、現在当施設（東京大学医学部附属病院）で経過観察を行っている患児について、前方視的に検討し、その病像を明かに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月までの新生児瀧紙尿にて先天性CMV感染と診断をされた13名で、そのうちの2名は新生児期に評価の後、転居などの事情によりフォローアップは継続されていない。

(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。

(3) フォローアップ内容：小児神経の専門医師による定期的な診察と聴力検査を行い、一部の児では1歳6か月時に頭部MRI検査を施行した。

（倫理面への配慮）

東京大学医学部附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）フォローアップ状況

現在フォローされている11名について最終診察は1歳6か月から3歳0か月であった。

（2）難聴

新生児期に両側性1名、片側性1名の難聴が指摘されており、両側性の児については家族の希望で抗ウイルス療法が施行されていた。その後のフォローアップでは、治療例も含めて変化は認められなかった。また、先天性CMV感染では、遅発性聴力障害を認めることが特徴的であるとされているが、9名の中で遅発性障害を認めた例はいなかった。

（3）発達および神経症候

問診および神経診察によって評価が行われていたが、特に問題を認める例はな

かった。ただし、最終の診察が3歳であり、今後さらに認知や行動面などの経過観察が必要であると考えられる。

（4）頭部画像検査

9例で1歳6か月時に頭部MRI検査が施行されており、2例で側脳室近傍の白質の限局した信号変化を認め、その他の7例は正常所見であった。

新生児期の頭部MRI所見では7例で大脳白質の信号変化を認めていたが、このうち2例では1歳6か月時の検査は行われていなかった。残る5例のうち4例では、白質の信号変化は消失していた。

1歳6か月時の信号異常を認めた1例は、新生児期に比較的広範囲の白質異常を認めた例で、1歳6か月時にも側脳室下角付近の信号変化が認められており、本症に特徴的な所見と考えられた(図)。

もう1例では、側脳室前角付近の限局した信号変化で、新生児期にはMRI異常を認められておらず、新規に出現した所見であった。

D. 考察

東京大学医学部附属病院での瀧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。

本コホート群では、2名に新生児期より難聴（両側1名、片側1名）が認められており、フォローアップでも持続していた。しかし、先天性CMV感染症で従来指摘されている遅発性難聴例は現在までのところ認められていない。

新生児期の頭部MRI検査では、最も重篤な神経後遺症をきたす皮質形成異常を

認められた例はなかったが、7例で大脳白質の信号変化が認められた。1歳6か月時に9名で頭部MRI検査が施行されていたが、1名で新生児期から引き続いて大脳白質病変を認められたほか、1名で新規に白質の信号変化が指摘された。興味深いことに、この2名とも聴力障害を有する例であり、難聴例で神経系への影響が大きい可能性が示唆され、これは本研究班全体の cohorts としても注目すべき点であると考えられた。

新生児期頭部MRIでの大脳白質信号変化が認められた7例中5名で1歳6か月時にフォローアップ検査が行われていた。5例中4例では白質の信号変化は消失おり、こうした変化は器質的な変化として強い脱髄などの所見ではなく、感染に伴った可逆性の変化である可能性が高いと考えられる。CMV感染では、大脳白質に浸潤しGlial Noduleなどの病理所見を呈することが知られており、基本的に白質へ浸潤しやすいことが指摘されている。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さらに検討する必要がある。

小児神経の医師による診察では、本cohortsの現時点でのフォローアップで、脳性麻痺や重度の知的障害を認められる例はなかった。しかし、高次脳機能や情緒面での発達については、幼児期後半になり顕著な発達が見られることから、引き続きこうした点に注目した検討が必要であると考えられる。

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、東京大学医学部付属病院でフォローされているcohorts集団では、11名中2名で難聴が認められた。その2例では1歳6か月時の頭部MRI検査にて異常所見が認められており、ウイルスによる中枢神経系への影響が大きかったことを示唆していた。その他での例では現時点では明らかな神経後遺症は認められていないが、今後さらに幼児期後半に顕著となる高次脳機能障害や発達障害などについて経過を観察することが重要であると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Iwasaki H, Oka A, Mizuno Y, et al. Detection of CNS involvement in congenital cytomegalovirus infection identified in neonatal screening: Clinical usefulness of ultrasonography as the initial assessment. 12th International Child Neurology Congress, May 27-June 1, 2012, Brisbane, Australia.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図 頭部MR I 画像 (1 歳 6 か月時、T 2 強調画像、水平断)

