

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

【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20日現在までの約11ヶ月間で1862検体を検査し3検体が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. CMV感染スクリーニング法の技術移転を2施設に対して実施した。
3. 先天性CMV感染の87人の小児について、TaqMan allelic discrimination assayを用いて、NKG2D遺伝子多型が発症リスク因子である可能性を示した。

A. 研究目的

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、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、先天性 CMV 感染が疑われた妊婦より採取した羊水などについて、CMV 核酸検査を実施した。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。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。

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°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、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°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 NKG2D 遺伝子型の解析

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。目的とする遺伝子多型を含む 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20日までの11か月弱に1862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、3例であった。

2. スクリーニング法の技術移転

第3者に無断で内容開示しない条件で、長崎大学及び神戸大学に検査法の無償技術移転を行った。

3. 抗ウイルス治療に伴う CMV の動態

本年度は、旭川医大・成育医療センター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。

4. NKG2D 遺伝子の多型解析

NKG2D 遺伝子多型について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。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カテゴリー間での比較を行った。その結果、出生時症候性と NKG2D 多型に有意な相関を認めた。

D. 考察

啓発効果をスクリーニングで実証する研究班全体としての方策や目標設定が、班会議などで明確にされなかったため、単なる2地域のスクリーニングサービスを負担することに終わった。1検体に600円を要する反面、支出に見合う研究費が

なかったため、経費的にも赤字が発生するなど、スクリーニングを研究班の計画として実施することに無理があったと言える。

今回、NKG2D は、CMV 感染によるシグナル制御に関連していることが知られていることから、多型が感染に伴うシグナル制御に与える影響をはじめ、今後、生物学的機能との関連を検討する。

E. 結論

1. 尿濾紙法を用いて、新生児 1862 人の先天性 CMV 感染を一元的に検査し、3 人の陽性児を同定した。
2. NKG2D 遺伝子多型が発症リスク因子である可能性を見出だした。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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*
- 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*
- 3) 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

4) 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

5) Matsui T, Ogawa H, Yamada N, Baba Y, Suzuki Y, Nomoto M, Suzutani T, Inoue N, Omori K. Outcome of cochlear implantation in children with congenital cytomegalovirus infection or GJB2 mutation. Acta Oto-Laryngologica. 132, 597-602, 2012

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) Koyano S, Inoue N, Moriuchi H, Nagamori T. Timing of specimen collection is critical for saliva-based screening programs for 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.

3) Tabata T, Petitt M, Fang-Hoover J, Rivera J, Nozawa N, Shiboski S, Inoue N, Pereira L. Congenital cytomegalovirus infection identified in pregnancies complicated by idiopathic intrauterine growth restriction. Combined meeting of the 4th Congenital Cytomegalovirus Conference/the 14th International CMV/Beta Herpes Workshop, October 29 to November 2, 2012, San Francisco, USA.

4) 谷口留美、古谷野伸、錫谷達夫、五石圭司、伊藤裕司、森岡一朗、岡明、中村浩幸、山田秀人、五十嵐隆、井上直樹：Toll様受容体(TLR)遺伝子の一塩基多型と先天性CMV感染・感染症発症の相関、第27回ヘルペスウイルス研究会、平成24年6月7-9日、愛知

5) 井上直樹：シンポジウム「抗ウイルス薬」抗ヘルペス薬：先天性CMV感染児の治療及び新規薬剤開発状況を中心として、第53回日本臨床ウイルス学会シンポジウム、平成24年6月16-17日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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】

サイトメガロウイルス（CMV）感染にともなう細胞の各種応答とその発現メカニズムを明らかにする目的で、CMV 感染感受性を示すヒト神経系細胞株において、CMV 遺伝子のテトラサイクリン誘導性発現を可能にする実験系を構築した。この実験系に CMV 遺伝子 IE2 を導入した結果、テトラサイクリンによって IE2 遺伝子産物の発現が誘導されることが確認された。本研究で構築した細胞実験系は、CMV 遺伝子産物発現によって引き起こされる細胞応答変化や病原性発現のメカニズムを解析する上で有用な実験系になり得ると考えられた。

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。そのため、当該疾患の病態解明には、病態形成に関連する各種要因を同定し、その病原性発現メカニズムを明らかにすることが重要と考えられる。今年度は、CMV 感染にともなう免疫応答を含む各種細胞応答に関与するウイルス側要因を同定し、その病原性発現メカニズムを解析するための新たな解析系として、CMV 感染感受性を示すヒト神経系細胞株を用いた CMV 遺伝子発現系を構築した。

B. 研究方法

1) Flp-In/TREx U373MG 細胞の樹立：

ヒト神経系細胞株として、U373MG 細胞（glioblastoma-astrocytoma）を用いた。培地は、10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium（D-MEM）を用いた。U373MG 細胞にテトラサイクリン誘導性発現システムを導入す

るためのプラスミドベクターとして、Invitrogen 社の pFRT/*lacZ*、pcDNA6/TR、pcDNA5/FRT/T0、pOG44 を使用し、エレクトロポレーション法により細胞内へ導入した。各種選択薬剤は、Zeocin(Invivogen)、Blasticidin HCl (Invivogen)、Hygromycin B (和光純薬)を用いた。ヒト細胞からの全 RNA 抽出には、TRIZOL (Invitrogen)を用いた。cDNA 合成には、SuperScript III First Strand Synthesis Kit (Invitrogen)を用いた。

2) 免疫染色法による細胞内蛋白質の検出：

35-mm ガラスディッシュ（IWAKI）上で U373MG 細胞を培養し、CMV 液を添加することでウイルス感染実験を行った。細胞固定には、4% paraformaldehyde 液（和光純薬）を用いて、室温で 15 分間行った。固定した細胞の透過処理には、1% Triton X-100 液を用いて室温で 15 分間行った。CMV 蛋白質に対する抗体は、抗 IE1/IE2 抗体（Merck Millipore）、核染色には

Cellstain DAPI 溶液（同仁化学）を用いた。

（倫理面への配慮）

本研究では、汎用されているヒト細胞株が用いられた。

C. 研究結果

(1) U373MG 細胞株を用いた実験的 CMV 感染：

ヒト神経系細胞株 U373MG 細胞が CMV 感染感受性を示すことを確認する目的で、CMV 感染前後の U373MG 細胞の細胞形態を比較した。その結果、CMV 感染 2 日後の U373MG 細胞において、類円形状に形態変化した U373MG 細胞が多く見られた（図 1）。CMV 感染前の U373MG 細胞は培養フラスコ底面に接着していたが、CMV 感染 2 日後には多くの U373MG 細胞が浮遊し、生細胞数も減少した（図 1）。次に、U373MG 細胞において CMV 遺伝子産物が発現していることを確認する目的で、免疫染色法による CMV 蛋白質 IE1/IE2 の同定を試みた。その結果、細胞核に局在する IE1/IE2 蛋白質を検出した（図 2）。また、CMV 由来の転写産物の発現を RT-PCR 法により解析した結果、CMV 感染後に IE1、UL37x1、UL38、pp65 遺伝子 mRNA が発現していることを確認した（図 3）。この結果より、U373MG 細胞において、CMV 感染が成立し、CMV 遺伝子産物が発現していることが確認された。

(2) U373MG 細胞におけるテトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系の構築：

CMV 感染にともなう細胞応答や CMV 病原性に関与する CMV 遺伝子産物の同定とそのメカニズム解析を行う目的で、U373MG 細胞において、テトラサイクリン誘導性に CMV 遺伝子の発現を可能にする実験系を構築した（図 4）。U373MG 細胞に対して pFRT/*lacZ* を導入後、Zeocin で選択する

ことで Flp-In U373MG 細胞を樹立した。次に、Flp-In U373MG 細胞に対して pcDNA6/TR を導入後、Blasticidin HCl で選択することで Flp-In/TREx U373MG 細胞を樹立した。Flp-In/TREx U373MG 細胞に対して pOG44 および pcDNA5/FRT/TO-IE2 を同時導入後、hygromycin B で選択することで Flp-In/TREx U373MG-IE2 細胞を樹立した（図 4）。Flp-In/TREx U373MG-IE2 細胞をテトラサイクリン処理した後、各タイムポイント（0、4、8、24、48、72、96 時間）に細胞を回収し、細胞由来全 RNA を用いて cDNA を合成した。この cDNA を用いた RT-PCR 解析によって、テトラサイクリンによって IE2 mRNA の発現が誘導されることを確認し（図 5）、免疫染色法によって IE2 蛋白質の発現が誘導されることを確認した（図 6）。この結果より、Flp-In/TREx U373MG-IE2 細胞において、テトラサイクリン誘導性に IE2 遺伝子産物が発現されることが確認された。

D. 考察

CMV 感染にともなう細胞応答や病原性発現に関与する CMV 遺伝子産物の同定とそのメカニズムを解析するために、U373MG 細胞に CMV を感染させた結果、細胞形態変化や細胞数減少が観察され、さらに CMV 複製関連遺伝子の発現が確認された。このことから、CMV 感染 U373MG 細胞は、CMV 感染にともなう神経系細胞の細胞応答を明らかにする上で一つの解析系になり得ると考えられる。

また、ヒト神経系細胞株 U373MG において任意の CMV 遺伝子をテトラサイクリン誘導性に発現できる Flp-In/TREx U373MG 細胞を樹立した。この実験系の利点として、(1)テトラサイクリン誘導時にのみ CMV 遺伝子を発現できるため、細胞毒性を示す CMV 遺伝子を発現する細胞樹立も可能である、(2)FLP 組換え酵素の作用によ

り CMV 遺伝子が挿入される細胞ゲノム領域は一定 (FRT 配列の下流) であるため、CMV 遺伝子挿入にともなう不測の細胞ゲノム変異を引き起こすリスクが少ない、(3) Flp-In/TREx U373MG 細胞に CMV 遺伝子を挿入するステップでは、煩雑な single cell cloning の操作が不要で、目的の細胞を比較的容易に選択し獲得できる、などが挙げられる。上記(1)の利点により、任意の CMV 遺伝子発現細胞の樹立が可能であり、上記(2)の利点により、複数の CMV 遺伝子間の比較解析においても正確なデータを得ることができると考えられる。

なし

本研究で示した CMV 感染系およびテトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系の併用による多面的な解析は、CMV 感染にともなう細胞応答、細胞応答に関与する CMV 遺伝子産物の同定および細胞応答発現メカニズム、さらに CMV 病原性発現機構を明らかにする上で効果的な手法と考えられる。

E. 結論

CMV 感染感受性を示すヒト神経系細胞株で CMV 遺伝子のテトラサイクリン誘導性発現を可能にする実験系を構築した。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 中村浩幸、廖華南、南佳ほり、阿久津英憲、梅澤明弘、井上直樹、藤原成悦：ヒト人工多能性幹細胞を用いた神経幹細胞への実験的 HCMV 感染系の確立、第 60 回日本ウイルス学会学術集会、平成 24 年 11 月 14 日、大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

図 1

HCMV感染にともなうU373MG細胞の形態変化

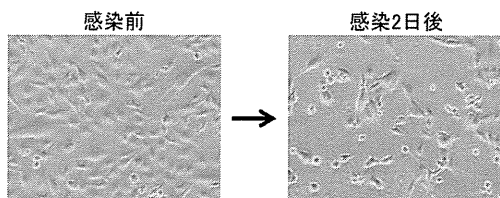


図 4

U373MG細胞を用いたテトラサイクリン誘導性CMV遺伝子発現系の構築

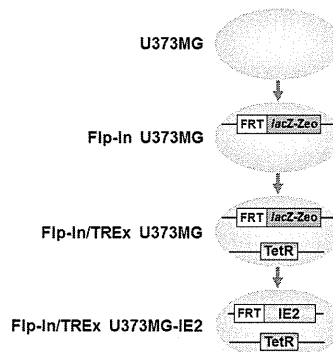


図 2

HCMV感染U373MG細胞におけるHCMV蛋白質IE1/IE2の発現

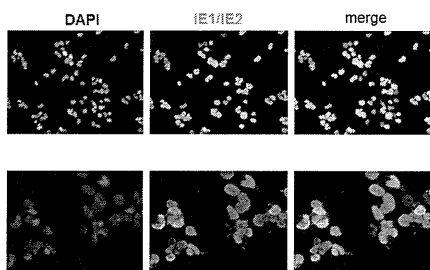


図 5

Flip-In/TREx U373MG-IE2細胞におけるIE2 mRNAの発現誘導

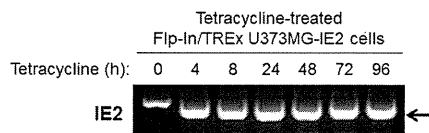


図 3

HCMV感染U373MG細胞におけるウイルス遺伝子発現

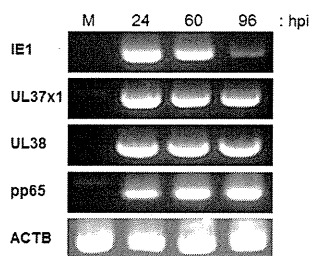
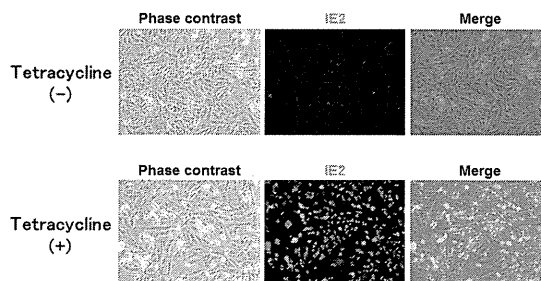


図 6

Flip-In/TREx U373MG-IE2細胞におけるIE2蛋白質の発現誘導



V. 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)

先天性サイトメガロウイルス感染症対策のための妊婦教育の効果の検討、妊婦・新生児スクリーニング体制の構築及び感染新生児の発症リスク同定に関する研究
(H23-次世代-一般-001)

平成24年度班会議プログラム

日 時：平成24年12月7日（金）、12時30分～16時20分
場 所：国立感染症研究所
「感染研共用第2会議室」（感染研戸山庁舎 2階）

出席

研究代表者 山田秀人
研究分担者 岡 明、中村浩幸、古谷野 伸、井上直樹
研究協力者 森内浩幸、吉川哲史、廖 華南、山田壮一、森 雄司、
蝦名康彦、平久進也、森岡一朗
厚生労働省母子保健課
山本圭子課長補佐
オブザーバー 川名 尚

欠席

研究分担者 峰松俊夫
研究協力者 伊藤裕司、浅野仁覚
厚生労働省母子保健課 坂元主査

次 第

12:30～

開会の挨拶 研究代表者 山田秀人 (神戸大学産科婦人科)

12:40～ 研究に関する発表 I

司会 森岡一朗

1. 研究班の先天性 CMV 感染児コホートのフォローアップ報告
森岡一朗 (神戸大学小児科)

2. 乳児期に発見された肝機能障害、肝腫大のフォロー中に発達遅滞が
明確となり、後に乾燥臍帯を用いた PCR 法で先天性 CMV 感染が証明され
た 1 男児例

吉川哲史 (藤田保健衛生大学小児科)

3. 東京大学病院での先天性 CMV ウイルス感染児のフォローアップにつ
いて

岡 明 (杏林大学小児科)

4. 尿 CMV 陽性新生児 5 症例のその後の経過について

伊藤裕司 (国立成育医
療研究センター)

5. CMV 未感染妊婦に対する感染防止介入および先天感染児のフォロー
アップ

古谷野 伸 (旭川医大小児科)

13:40～ 研究に関する発表 II

司会 古谷野 伸

6. 母子感染に関する妊婦の知識調査

森岡一朗 (神戸大学小児科)

7. 全国妊婦健診施設を対象とした妊婦感染症スクリーニングと先天性感染の実態調査

平久進也 (神戸大学産科婦人科)

8. 母体血CMV IgG avidity測定による先天性感染の発生予知

蝦名康彦 (神戸大学産科婦人科)

9. 先天性CMV感染に対する免疫グロブリン胎児治療

山田秀人 (神戸大学産科婦人科)

10. 先天性CMV感染：啓発のための様々な試み

森内浩幸 (長崎大学小児科)

14:40～ 休憩

15:00～ 研究に関する発表 III

司会

井上直樹

11. 先天性CMV感染症に対する抗ウイルス療法の有効性と安全性

森内浩幸 (長崎大学小児科)

12. 新生児CMVスクリーニングの進捗と問題点、及び先天性CMV感染・発症リスク因子同定のための自然免疫関連遺伝子群の多型解析

井上直樹 (感染研ウイルス1部)

13. 培養細胞を用いたHCMV感染に対する細胞応答の解析

中村浩幸 (国立成育医療研究センター研究所母児感染研究部)

15:40～ 総合討議

司会

山田秀人

今後の研究計画について

中間報告に関すること（中間ヒアリング，継続申請書類等）

ホームページの開設およびその内容について

次回の日程

ご挨拶 川名 尚 （帝京大学溝口病院）

閉会の挨拶 山田秀人 （神戸大学産科婦人科）

発表者の方へ

- ・ 1 演題につき、発表時間（8分）、討論時間（4分）を含め12分程度です。
- ・ 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。

事務局連絡先

〒650-0017 神戸市中央区楠町 7-5-1

Phone 078-382-6000 Fax078-382-5756

神戸大学大学院医学研究科

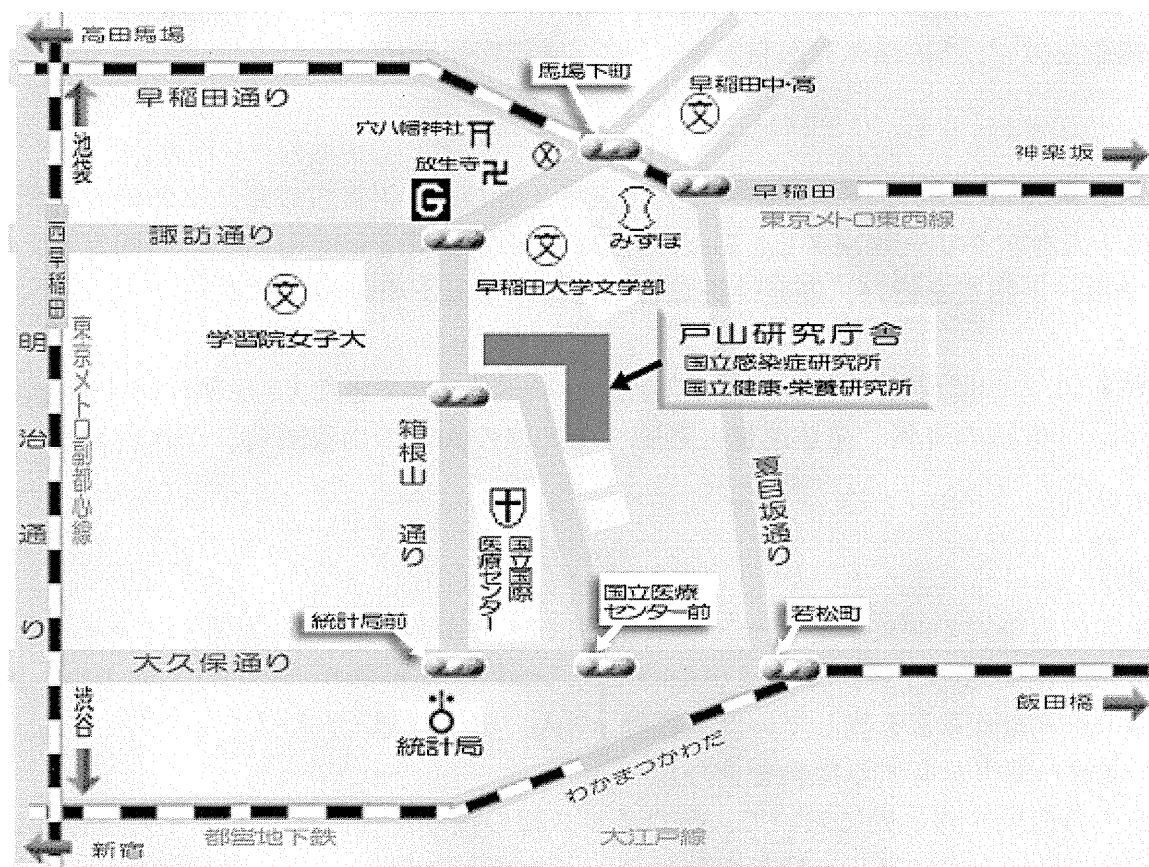
講師 森岡一朗（新生児） ichim@med.kobe-u.ac.jp

助教 平久進也（産科） st4547@med.kobe-u.ac.jp

秘書 伊藤治美 kobeobgy@med.kobe-u.ac.jp

山田秀人 yhideto@med.kobe-u.ac.jp

感染研への順路



最寄りの駅

地下鉄メトロ東西線早稲田駅から（徒歩8分）

都営地下鉄大江戸線若松河田駅から（徒歩8分）

地下鉄メトロ副都心線西早稲田駅から（徒歩20分）

1. 研究班の先天性 CMV 感染児コホートのフォローアップ報告

森岡一朗¹、古谷野 伸²、森内浩幸³、岡 明⁴、伊藤裕司⁵、吉川哲史⁶、浅野仁覚⁷、井上直樹⁸、山田秀人¹

¹ 神戸大学, ² 旭川医科大学, ³ 長崎大学, ⁴ 杏林大学, ⁵ 国立成育医療研究センター, ⁶ 藤田保健衛生大学, ⁷ 福島県立医科大学, ⁸ 国立感染症研究所

【目的】平成 20～22 年度本事業（研究代表者：藤枝、3 年目古谷野）において、新生児 2 万 3 千人をスクリーニングし、71 人（0.31%）の感染児を同定した。この同定した感染児のコホート調査を行い、遅発性後障害含む長期予後を明らかにする。

【方法】71 人の感染児のうち、1 歳以上フォローアップできた 61 症例の出生時の症候、抗ウイルス療法の有無、発達遅延・難聴・その他の異常の出現割合につき調査し、解析した。

【結果】

- 1) 61 人の感染児の平均フォローアップ期間は 31.8 か月（12～67 か月）であった。
- 2) 61 人の感染児のうち、15 人は出生時に何らかの症候があり、そのうちの 10 人（67%）に神経学的後障害を残していた（難聴：7 人、発達遅延：7 人、てんかん：3 人、1 人が複数の障害を有する症例を含む）。
- 3) 15 人の症候性感染児において、抗ウイルス薬の投与を受けた 9 人中 4 人（44%）が後障害を残したのに対し、投与を受けなかった 6 人中 5 人（83%）が後障害を残した。
- 4) 46 人の出生時無症候性の児で、4 人（9%）に神経学的障害を発症した（遅発性難聴：2 人、注意欠陥・多動性障害：1 人、自閉症：1 人）。この 4 人のうち 2 人（50%）で、出生時の CMV-IgM と血中 CMV-DNA が陽性であった。

【考察】過去の後方視的研究による報告と同様、我々の前方視的フォローアップ研究においても注意欠陥・多動性障害や自閉症のような軽度発達障害を発症する出生時無症候性先天性 CMV 感染児が存在した。症候性児に対する抗ウイルス薬療法に関しては有効性と安全性を検証し、先天性 CMV 感染症の治療法として確立させる必要があると考えられた。

2. 乳児期の肝機能障害、肝腫大のフォロー中に発達遅滞が明確になり、後に乾燥臍帯を用いた PCR 法で先天性サイトメガロウイルス感染が証明された 1 男児例

森 雄司¹、相原早希²、河村吉紀¹、大橋正博¹、加藤伴親²、吉川哲史¹
藤田保健衛生大学医学部小児科学¹、豊川市民病院小児科²

生下時に明らかな症候を欠く無症候性先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染児は、その後、難聴や発達障害をきたす可能性があることが明らかになってきた。また、そのような患児の診断に乾燥臍帯を用いた PCR 法でのウイルス DNA 検出が有用となる。今回我々は、乳児期の肝機能障害、肝腫大でフォローされていた患児が、その後徐々に発達障害が目立つようになり、乾燥臍帯から CMV DNA が検出され先天性 CMV 感染と診断された症例を経験した。

患児は、現在 3 歳 10 か月の男児。平成 20 年 12 月 11 日、妊娠 40 週 1 日、生下時体重 3134g にて正常分娩。周産期感染なし。家族歴は兄が 4 歳男児で成長、発達共に異常なし。1 歳 0 か月時に気管支炎で近医入院時に肝機能障害 (GOT:185、GPT:123)、肝腫大に気づかれた。肝炎ウイルス感染は全て否定され、EB ウイルスも未感染、CMV IgM(EIA): 1.62 と陽性だったため CMV 水平感染に伴う肝炎と診断された。その後、1 歳 3 か月時、4 か月時にそれぞれ喘息性気管支炎、腸炎で入院した。トランスアミナーゼ値は徐々に正常化した。約 3 から 4 横指の肝腫大が持続したため、入院中にタンデムマス解析を含む種々の検査を行ったが代謝異常を示唆する明らかな異常なく精査目的で 1 歳 6 か月に当院へ紹介。身体所見上約 4 横指の肝腫大、1.5 横指の脾腫を認めるものの、前医同様乳酸、ピルビン酸などに異常はなく、アシドーシスも認めなかったため経過観察とした。徐々に、言語発達遅滞が目立つようになってきたため、ABR を施行するも明らかな聴力低下を認めず経過観察とした。その後、肝脾腫は徐々に改善したものの、徐々に発達遅滞が目立つようになってきたため、3 歳時に乾燥臍帯を用いた CMV DNA 測定を実施。66 コピー/ μ g DNA のウイルス DNA が検出されたため、無症候性先天性 CMV 感染と診断した。3 歳 4 か月児の頭部 MRI 検査では明らかな異常所見は認めなかった。3 歳 10 か月時の新版 K 式発達検査で、姿勢・運動 DQ43、認知・適応 DQ69、言語・社会 DQ56、全領域 DQ61 と発達遅滞を認め、現在、外来で経過観察中である。

本症例を通し、無症候性先天性 CMV 感染児の臨床像の全貌を明らかにすることの重要性を再認識するとともに、このような症例が存在することを啓蒙することにより、より多くの症例蓄積が可能になると思われた。

3. 東京大学病院での先天性 CMV ウイルス感染児のフォローアップについて

岡 明、三牧正和、水野葉子、五石圭司

杏林大学医学部小児科、東京大学大学院医学系研究科小児科

当研究班のろ紙尿による新生児スクリーニングで先天性 CMV 感染と診断された 13 例について、現在、外来にて 11 例についてフォローアップを継続している。聴覚異常を新生児期に 2 例で指摘されているが、その後の遅発性の異常は認められていない。

全般的な発達については、現時点での最終の診察時年齢は 1 歳半以上であるが発達遅滞を認められていない。東大でのコホート群は、新生児期の頭部画像所見でも、MRI の大脳白質の信号変化と頭部超音波検査での側脳室前角付近の上衣下嚢胞の所見のみが認められた比較的軽症群と考えられ、現状での発達状況もそれに合致する所見であった。

しかし、今後集団に入ってあきらかとなる行動面での問題や将来の学習面でのフォローは継続する必要があると思われ、現在倫理委員会にさらなるフォローアップに向けた研究申請中である。

4. 尿 CMV 陽性新生児 5 症例のその後の経過について

伊藤裕司、塚本桂子

国立成育医療研究センター 周産期診療部 新生児科

【はじめに】遅発性難聴に関連する無症候性先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症を生後早期にスクリーニングで発見する目的で、厚生労働科学研究費補助金による臨床研究が 6 都道府県の周産期施設で行われた。当院での尿中 CMV スクリーニングの結果について報告する。

【対象と方法】対象は、2009 年 2 月～2010 年 6 月に当院で出生した在胎 35 週以上体重 2000 g 以上の正常新生児。生後 0～1 日に採取した濾紙尿検体から、real time-PCR 法により CMV DNA を検出し、陽性例について検討した。

【結果】、対象 1909 例中、文書によるインフォームドコンセントを得られた 1650 例に対して尿中 CMV スクリーニングを行った。尿中 CMV 陽性例は 5 例であり、発生頻度は 0.30% であった。

陽性例中、4 例は 2～5 歳の同胞があった。2 例は二羊膜二絨毛膜双胎の 1 児で、他児は陰性であった。母体は 33～42 歳で、妊娠中期の抗 CMV IgG 抗体は 3 例で既に陽性であった。全例胎児期は異常を認めなかった。出生時在胎週数は 37～38 週、体重は 2520～2862g であった。1 例で心室性期外収縮を認めた以外は臨床症状はなく、全例日令 6～8 で退院した。児の抗 CMV IgM 抗体は 2 例で陽性であった。新生児期の OAE は、全例両側正常であった。頭部 CT を行った 4 例中 3 例で、石灰化や脳室拡大などの異常所見を認めなかった。1 歳時点では、神経所見、眼底所見、聴力は正常であった。

各例の CMV DNA コピー数の推移を追跡した。血液では 5 例中 2 例は感度以下であったが、3 歳時点では 5 例中 5 例とも感度以下となった。

3 歳までの画像のフォローアップでは、4 例中 1 例において、MRI に異常所見が検出され、同症例にて、網膜に梗塞病変が確認された。また、神経学的発達に関しては 4 例中 1 例において、3 歳の時点で、言語発達の遅れを認めた。また、聴力障害の出現を認めた症例は 3 歳時点では認めていない。

【考察】無症候性先天性 CMV 感染症の頻度は、約 0.3% と考えられた。3 歳時点で、新たな MRI 異常所見と網膜梗塞所見、言語発達遅延を各 1 例認めた。

5. CMV 未感染妊婦に対する感染防止介入および先天感染児のフォローアップ

古谷野伸、長森恒久、高橋弘典、東 寛
旭川医科大学小児科

旭川医科大学関連では、2006 年から約 7,400 名の新生児に対して先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染スクリーニングを実施しており、そのうち陽性者は 18 名で、現在の感染率は 0.24%となっている。感染者の内、明らかな症候性児は難聴児 2 名であるが、1 名は 1 歳時からの遅発性難聴である。難聴は日常生活には影響がない程度で、今のところ 2 名共に発達には問題はない。また関連は不明だが注意欠陥多動性障害および言語発達遅滞の感染児 2 名を経過観察中である。この 2 名を先天性 CMV 感染児以外の同患者と比較しても、今のところ目立った特徴はない。また経過観察期間が 2 年を超えたスクリーニング陽性者の K 式発達検査を順次行っているが、現在まで DQ70 を下回るような明らかな精神遅滞は出ていない。

妊婦の CMV-IgG 検査は昨年 8 月から開始しており、現在まで 980 名の妊婦をスクリーニングした。CMV-IgG 陰性者は 328 名で 33.5%であった。これら抗体陰性者に対しては感染防止パンフレットを用いて、啓発活動を行っている。抗体陰性者の出産は 120 名となり、出産時に seroconversion していた妊婦は 1 名いたが、先天感染は起こらなかった。介入後の感染児の出生は今のところ 0 であるが、まだ介入前の先天感染率との間に統計学的な有意差は出ていない。

唾液による先天性 CMV 感染スクリーニングに対する母乳の影響を確認するために行った研究では、調べた 20 組の母子のうち 4 名の母乳から CMV DNA が検出された。また 4 名の新生児の哺乳後 30 分以内の唾液から CMV DNA が検出されたが、哺乳直前の唾液からは CMV は検出されなかった。唾液を用いたスクリーニングは母乳の影響を受ける事が明らかとなり、検体採取のタイミングやカットオフ値の設定が厳密に行われる必要がある。その他、頭部画像所見のみに異常のあった先天性 CMV 感染児に対して、バルガンシクロビルの治療を行ったので、その経過も報告する。

6. 母子感染に関する妊婦の知識調査

森岡一朗¹、園山綾子²、平久進也²、足立陽子²、谷村憲司²、蝦名康彦²、山田秀人²
神戸大学小児科¹、産科婦人科²

【目的】臨床で使用可能なサイトメガロウイルス (CMV) のワクチンがない現状において、妊婦の CMV 感染に関する知識や予防の意識を向上させることが、CMV 母子感染の発生予防につながる可能性がある。本研究では、母子感染を引き起こす CMV ほか各種感染症、病原微生物に関する妊婦の知識レベルをアンケート調査によって明らかにすることを目的とした。

【方法】倫理委員会の承認を得て、妊婦 343 人を対象に初診時に同意を得てアンケート調査を行った。平均年齢 34 歳、妊娠週数中央値 15 週、経産婦率 39%であった。胎児に影響を及ぼす可能性のある 13 種類の微生物についての認識度を調べた。ついで、風疹、トキソプラズマ、パルボウイルス B19、CMV に関して、1) 感染経路、2) 影響を及ぼす感染時期、3) 感染予防法についてアンケート調査を行った。結果を比較した。

【成績】1) 胎児に影響を及ぼす感染症として認識があったのは、TORCH の中で風疹 76%、梅毒 69%、トキソプラズマ 58%、パルボウイルス B19 28%、ヘルペス 27%、CMV 18% の順であった。2) 感染経路について正答率は、風疹 52%、トキソプラズマ 42%、パルボウイルス B19 12%、CMV は 8%であった。3) 影響を及ぼす感染時期は、風疹 40%、トキソプラズマ 30%、CMV 11%、パルボウイルス B19 8%で、4) 感染予防知識については、風疹 44%、トキソプラズマ 36%、CMV 11%、パルボウイルス B19 7%の順であった。1) -4) の項目で、CMV やパルボウイルス B19 の正答率は風疹やトキソプラズマに比べて有意に低かった。

【結論】病原微生物の種類によって妊婦の知識レベルに差があった。日本人妊婦の CMV 母子感染に関する知識はパルボウイルス B19 と同程度で、風疹やトキソプラズマと比較して低い現状が明らかになった。