

- 2) Ikua K, Ishioka K, Sato Y, Imamura Y, Asano K, Koyano S, Inoue N, Suzutani T. A novel real-time PCR method for the determination and quantification of the two cytomegalovirus (CMV) gH-subtypes in clinical samples. *J Clin Microbiol.* 50: 499-501, 2012
- 3) 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:e000118, 2011
- 4) 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
- 5) 佐藤雅之、岡秀治、古谷野伸 他. 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
- 6) 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
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, USA.
- 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
- 3) 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、平成23年10月28-29日、福井
- 4) 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、平成23年8月19日、札幌
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

資料1

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。

- ① 5-6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 お子様がお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

表1

Fisher's exact test

啓発介入	感染あり	感染なし	
なし	6854	18	<div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="border-left: 1px solid black; border-right: 1px solid black; height: 20px; margin-right: 5px;"></div> ns (p=0.145) </div>
あり	776	0	

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。新生児期には頭部画像検査では、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7例で大脳白質の信号変化の所見を認め、13名中9名ではこの両者のいずれかで異常所見を認めた。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。その後のフォローアップでは、新生児期に難聴を指摘された2例以外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

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、従来の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。こうした点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。

(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) 新生児期 身体所見、難聴

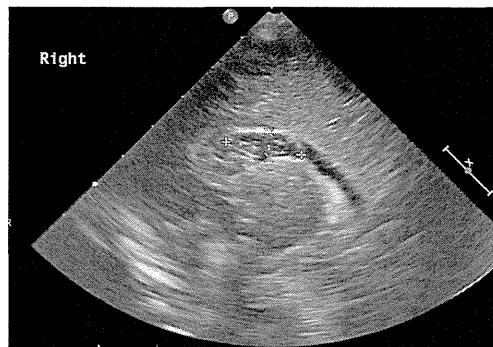
13 名中 3 名が低出生体重児であり、その 1 名は早産児であった。また、2 名は小頭症を認めた。肝脾腫、出血斑、血小板減少などのいわゆる症候性の先天性 CMV 感染の所見を呈した児はいなかった。1 名で新生児期に心室中隔欠損を認めた (その後の経過で自然閉鎖)。1 名で眼底検査にて瘢痕性病変が指摘された。そのうちの 2 名で、ABR にて両側および

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



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 3.6×10^4 から 1.3×10^3 (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

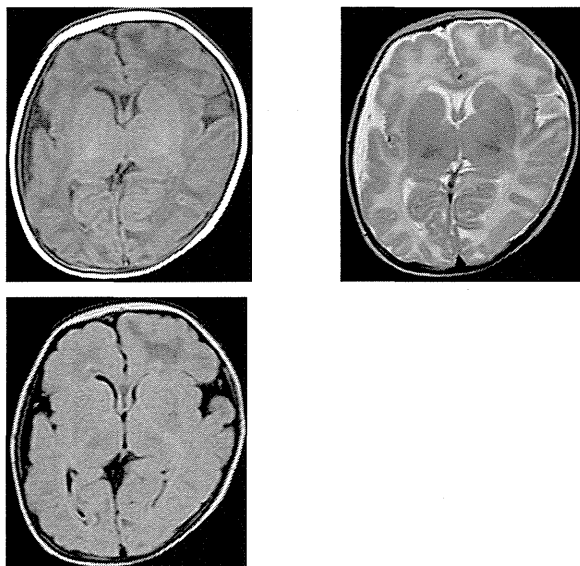
児の血液中 CMV IgM は、先天性感染の指標となる可能性が考えられているが、6 例で陽性、2 名で±、5 名で陰性であった。

(4) 新生児期頭部 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 新生児期頭部 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 7.7×10^4 から 7.0×10^2 (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。

(6) 聴覚フォローアップ状況

新生児期に両側性 1 名、片側性 1 名の難聴が指摘されていたが、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。

(7) 発達および神経症候についてフォローアップ状況

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。

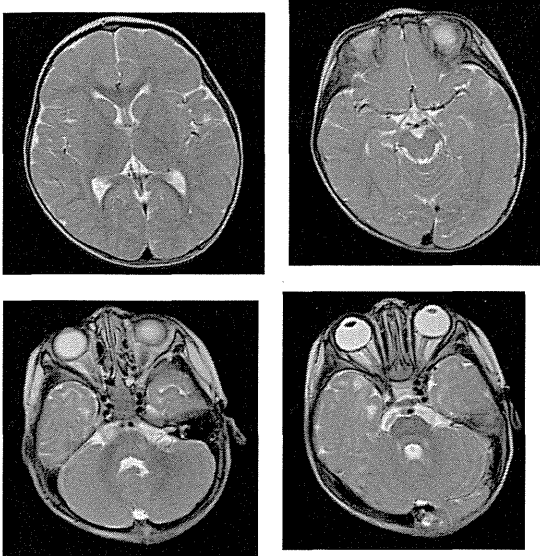
(4) 1 歳 6 か月時頭部 MRI 検査

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 3 1 歳 6 か月時頭部 MRI に見られた大脳白質の信号変化（水平断、T2 強調）



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。

本コホート群のフォローアップでは、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コホート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、どの様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、本コホート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。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

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。2年弱（2013年2月20日現在）で4134検体を検査し11検体（0.27%）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、自然免疫関連遺伝子上にあるSNPを解析した。TLR2遺伝子多型が先天性CMV感染のリスク因子として、NKG2D遺伝子多型が出生時の発症のリスク因子である可能性を明らかにした。

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。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。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、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 による自然免疫関連遺伝子型の解析

TLR2, 4, 9, NKG2D 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。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。この研究班の2年間において、総計4134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、11例であった。

2. 抗ウイルス治療に伴うCMVの動態

旭川医大、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、投薬終了後にリバン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。

3. 自然免疫関連遺伝子群の多型解析

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。基準に合致するTLR2、TLR4、TLR9、NKG2Dの多型部位を検討した。TLR2の多型と感染に相関が見られた。一方、TLR4やTLR9では、こうした差は認められなかった。また、NKG2Dの多型は出生時症候性と相関があることが明らかになった。

D. 考察

H20-22年度の研究班研究の成果として、2万3千人を感染研で検査し、0.31%の感染率であることを明らかにした。本研究班(H23-24)では、その延長線として、啓発効果の評価を目的として感染研で約4千人の検査を行ったが、啓発効果の評価法などが、班として設定されていなかったため、単に神戸・旭川の2地域のスクリーニングを実施したというだけに終わった。また、1検体600円で4千人を2年間実施するのに必要な研究費が検査のために配分されなかったために、経費的にも赤字となったこと。こうした点は、分担研究者として班研究の意義は薄かった。

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た。

感染リスク因子として同定された TLR2 の synonymous 変異を起こす多型部位は、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。synonymous 変異が、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。NKG2D の多型の生物学的機能との関連を今後検討する。自然免疫には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検討していきたい。

E. 結論

1. 尿濾紙法を用いて、新生児約 4 千人の先天性 CMV 感染を一元的に検査し、11 人の陽性児を同定した。しかし、啓発効果の評価などの計画の設定が明確でなかったために、投入された労力・経費に対して得られた情報は限られた。
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た。
3. TLR2 及び NKG2D 遺伝子の多型が、それぞれ感染及び発症の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
- 6) Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inoue N, 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.

- 7) 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
 - 8) 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
- 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
- 6) 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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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況と今後の展望」, 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

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】

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と病態との関連性を明らかにすることを目的として、先天感染児 5 症例について、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る pp65 特異的 CD8+ T 細胞の増殖反応が示された。また、CMV 特異的 CD8+ T 細胞応答の経時変化については、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ことが示唆された。また、CMV 感染にともなう各種細胞応答の性状を明らかにし、細胞応答に関与する CMV 遺伝子産物の同定および応答メカニズムを解析するために、ヒト神経系細胞株を用いた CMV 感染系およびテトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系を構築した。

A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染児の病態や重症度、予後は各症例で多様である。本研究では、先天性 CMV 感染症の発症リスクや重症度と関連する要因を明らかにし、病態形成機構の理解を深めることを目的とする。

当該疾患の病態形成には、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、各要因による病態形成機構については不明な点が多い。本研究では、宿主側要因として先天性 CMV 感染児の CMV 特異的細胞性免疫応答に着目し、その性状解析を行った。また、ウイルス側要因として、病態形成に関与する CMV 遺伝子産物の同定とその病原性発現機構を明らかにする目的で、ヒト神経系細胞株を用いた CMV 感染系およびテトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系を構築した。

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、ダイレクトシーケンシング法により 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 1)。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ために、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 2)。

3) テトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系の構築 :

ヒト神経系細胞株 U373MG 細胞の培養液は、10% Fetal Bovine Serum を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) を用いた。U373MG 細胞において、テトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系を構築するために、pFRT/*lacZ*、pcDNA6/TR、pcDNA5/FRT/TO、pOG44 (いずれも Invitrogen) を使用し、エレクトロポレーション法により細胞へ導入した。選択用抗生物質は、Zeocin、Blasticidin HCl (Invivogen)、Hygromycin B (和光純薬) を用いた。ヒト細胞株からの total RNA 抽出および cDNA 合成には、TRIZOL (Invitrogen)、SuperScript III First Strand Synthesis Kit (Invitrogen) を用いた。

4) 免疫染色法による蛋白質の検出

U373MG 細胞の固定および透過処理には、4% paraformaldehyde 液 (和光純薬)、および 1% Triton X-100 液を使用した。CMV IE 蛋白質の検出には、抗 IE1/IE2 抗体 (メルクミリポア社)、核染色には Cellstain DAPI 溶液 (同仁化学) を使用した。

(倫理面への配慮)

先天性 CMV 感染児の検体を用いた研究

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

(1) 先天性 CMV 感染児の CMV 特異的 CD8+ T 細胞の解析 :

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 タイピングを行い、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 (症候性) では、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 (症候性) では、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 3)。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

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 4)。

症例 3 (症候性) では、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 (無症候性) では、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 (無症候性) では、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 5)。

(2) ヒト神経系細胞株を用いた CMV 感染系およびテトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系の構築：

ヒト神経系細胞株 U373MG に CMV を感染させた結果、CMV による細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) とと思われる細胞形態変化および生細胞数の減少を示した (図 6)。次に、CMV 感染 U373MG 細胞において CMV 遺伝子産物の発現を RT-PCR 法により解析した結果、CMV 遺伝子 IE1、UL37x1、UL38、pp65 の各 mRNA を検出した (図 7)。

また、抗 IE1/IE2 抗体を用いた免疫染色法により、IE1/IE2 蛋白質を細胞核内に検出した (図 8)。この結果より、CMV は U373MG 細胞に感染し、CMV 遺伝子

産物を発現することが確認された。

次に、CMV 病原性に関する CMV 遺伝子産物の同定とその機能解析を行う目的で、テトラサイクリン誘導性 CMV 遺伝子発現系を U373MG 細胞を用いて構築した (図 9)。U373MG 細胞に対して pFRT/*lacZ* および pcDNA6/TR を順次導入し、Zeocin および 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 を同時導入し hygromycin B で選択することで Flp-In/TREx U373MG-IE2 細胞を樹立した (図 9)。Flp-In/TREx U373MG-IE2 細胞をテトラサイクリンで処理した後、各タイムポイント (0、4、8、24、48、72、96 時間) に細胞を回収し、cDNA を合成した。この cDNA を用いた RT-PCR 解析により、IE2 mRNA がテトラサイクリン誘導性に発現することを確認した (図 10)。続いて、IE2 蛋白質のテトラサイクリン誘導性発現も免疫染色により確認した (図 11)。

D. 考察

(1) 先天感染児由来の 5 検体について、MHC Tetramer を用いて CMV 特異的 CD8+ T 細胞の検出、定量を行った。その結果、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、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 特異的免疫応答の継時変化の有無と病態との関連性を明らかにする目的で、先天感染児 3 例において、pp65 特異的 CD8+ T 細胞の継時変化を解析した。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、増強傾向にあることが示唆された。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ともなう変化であるのか、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。

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。

(2) 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、CMV 遺伝子産物発現が観察されたことから、U373MG 細胞は CMV に対して感染感受性を示すことが確認された。また、U373MG 細胞において任意の CMV 遺伝子をテトラサイクリン誘導性に発現できる細胞 Flp-In/TREx U373MG を樹立後、CMV 前初期遺伝子である IE2 遺伝子を導入した結果、テトラサイクリン誘導性に IE2 遺伝子産物が誘導されることを確認した。CMV は標的細胞に感染後、各 CMV 遺伝子産物が様々なメカニズムで細胞応答を引き起こすと考えられる。このことから、ヒト細胞における CMV 感染系や CMV 遺伝子産物の誘導性発現系は、CMV 感染に伴う細胞応答、CMV 遺伝子産物の病原性発現機構などを理解する上で有用な実験系になると考えられる。

G. 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. XV International Congress of Virology. September 11th-16th, 2011. Sapporo.

2) 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

なし

図 1

MHC Tetramerを用いたCMV特異的CD8⁺T細胞の検出

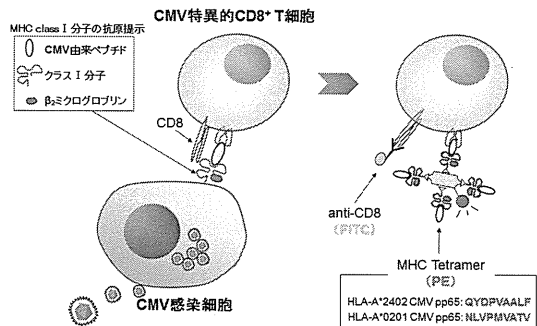


図 4

生後9ヶ月

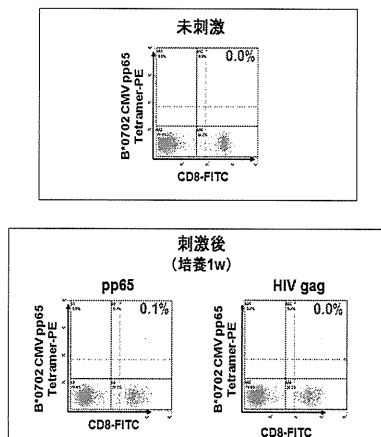


図 2

MHC Tetramerを用いたCMV特異的CD8⁺T細胞の検出

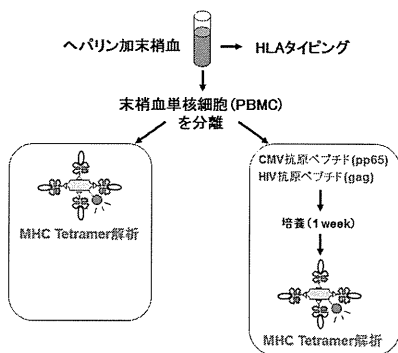


図 5

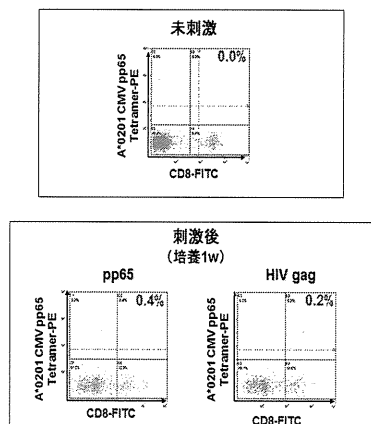


図 3

生後3ヶ月

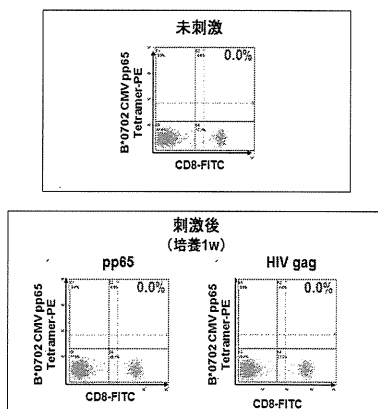


図 6

HCMV感染にともなうU373MG細胞の形態変化

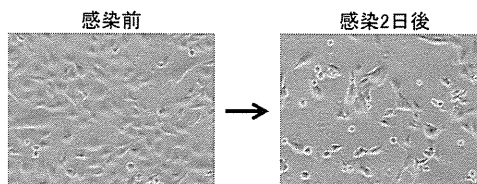


図 7

HCMV感染U373MG細胞における
ウイルス遺伝子発現

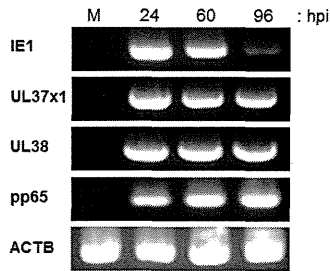


図 8

HCMV感染U373MG細胞における
HCMV蛋白質IE1/IE2の発現

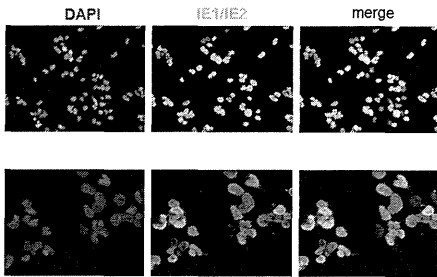


図 9

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

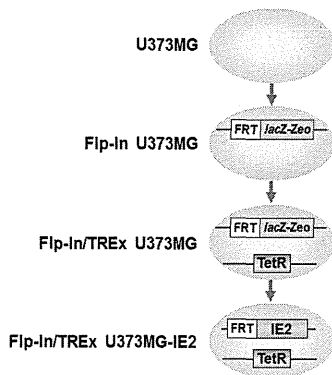


図 10

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

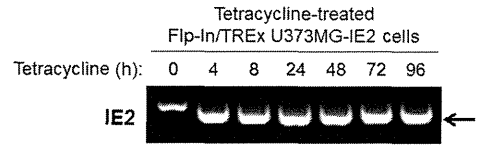
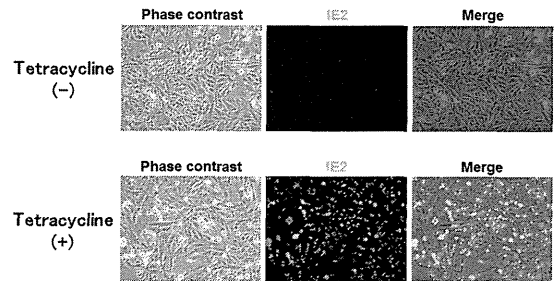


図 11

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



V. 会 議 記 録