

201224046A

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）

先天性サイトメガロウイルス感染症  
による難聴のマス・スクリーニングおよび  
治療法に関する研究

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 岩崎 聡

平成 25（2013）年 3 月

## 目 次

I. 先天性サイトメガロウイルス感染症のマススクリーニングシステムの 構築および発症予防に関する研究 研究者名簿	1
II. 総括研究報告	
先天性サイトメガロウイルス感染症のマススクリーニングシステムの 構築および発症予防に関する研究	5
岩崎 聡	
III. 分担研究報告	
1. 先天性サイトメガロウイルス感染症のマススクリーニングおよび 治療法に関する研究	18
小池 健一	
2. 先天性サイトメガロウイルス感染症のマススクリーニングおよび 治療法に関する研究	23
小川 洋	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
V. 研究成果の刊行物・別刷	31

I. 先天性サイトメガロウイルス感染症の  
マススクリーニングシステムの構築  
および発症予防に関する研究

研究者名簿

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金障害者対策総合研究事業  
(感覚器障害分野)

先天性サイトメガロウイルス感染症のマススクリーニングシステムの構築  
および発症予防に関する研究

区 分	氏 名	所 属	職 名
研究代表者	岩崎 聡	信州大学医学部附属病院人工聴覚器学講座	教 授
研究分担者	宇佐美真一	信州大学医学部耳鼻咽喉科	教授
	塩沢 丹里	信州大学医学部産科婦人科	教授
	小池 健一	信州大学医学部小児科	教授
	小川 洋	福島県立医科大学附属会津医療センター 耳鼻咽喉科	教授
	工 穰	信州大学医学部耳鼻咽喉科	准教授
	茂木 英明	信州大学医学部耳鼻咽喉科	助教
研究協力者	矢野 卓也	信州大学医学部耳鼻咽喉科	医員
	西尾 信哉	信州大学医学部耳鼻咽喉科	助教
	大平 哲史	信州大学医学部産科婦人科	助教
	稲葉 雄二	信州大学医学部小児科	准教授

## Ⅱ. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金  
障害者対策総合研究事業（感覚器障害分野）  
総括研究報告書

先天性サイトメガロウイルス感染症のマススクリーニングシステムの構築  
および発症予防に関する研究

研究代表者 岩崎 聡（信州大学医学部附属病院人工聴覚器学講座・教授）

研究要旨

先天サイトメガロウイルス感染は、全出生児の0.5～2.5%に認められる比較的頻度の高い先天ウイルス感染症のひとつであり、感染児のうち10%は神経学的な発育障害、網脈絡膜炎、先天性感音難聴を呈する。また、残りの約90%は無症候性で出生時には無症状であるが、その中の35%は遅発性の中等度～高度難聴を発症すると報告されている。特に、遅発性・進行性の種々の症状に関しては、ガンシクロビルや特異抗体を用いた発症予防、進行予防が可能であることが報告されており、先天サイトメガロウイルス感染の早期発見のためのマススクリーニングシステムの構築と、早期発見後の予防医療の確立により、症状の重篤化を予防することが期待される。本研究では先天性サイトメガロウイルス感染症を早期発見するためのマススクリーニングに適したシステムの開発を目的として検討をおこなった。マス・スクリーニングとしてDNA検査を行うためには、簡便にサンプル採取が可能で、長期間保存可能なシステムが必要となるため、先天性代謝異常スクリーニングとして実施されるガスリーカードへの採血時に、DNAを高品質で長期間保存可能なFTAカードに同時にスポットする採取法の有効性に関する検討を行った。その結果、抽出済みDNAサンプルと比較して、感度が83%、特異度は97%という結果が得られた。感度が83%であったため、プローブの配列の見直しを進めるとともに、見逃しを避ける目的で4重測定を行う事で感度を高める事が可能になり、マス・スクリーニングとして実用可能なレベルの検出系を確立することができた。また、確立した検出系を用いたマス・スクリーニングを開始した。

研究分担者氏名・所属機関名・職名	医学部産科婦人科学講座・教授)
宇佐美真一（信州大学医学部耳鼻咽喉	小池 健一（信州大学医学部小児科学講
科学講座・教授)、塩沢 丹里（信州大学	座・教授)、小川 洋（福島県立医科大学

附属会津医療センター耳鼻咽喉科・教授)、  
工 穰 (信州大学医学部耳鼻咽喉科学講  
座・准教授)、茂木 英明 (信州大学医学  
部耳鼻咽喉科・助教)

研究協力者

矢野卓也 (信州大学医学部耳鼻咽喉科・  
医員)、西尾 信哉 (信州大学医学部耳  
鼻咽喉科・助教)、大平哲史 (信州大学医  
学部産科婦人科学講座・助教)、稲葉雄二  
(信州大学医学部小児科学講座・准教授)

## A. 研究目的

先天サイトメガロウイルス感染は、全出  
生児の 0.5~2.5%に認められる比較的頻  
度の高い先天ウイルス感染症のひとつで  
あり、感染児のうち 10%は神経学的な発  
育障害、網脈絡膜炎、先天性感音難聴を  
呈する。また、残りの約 90%は無症候性  
で出生時には無症状であるが、その中の  
35%は遅発性の中等度~高度難聴を発症  
すると報告されている。

特に、遅発性・進行性の種々の症状に  
関しては、ガンシクロビルや特異抗体を  
用いた発症予防、進行予防が可能である  
ことが報告されており、先天サイトメガ  
ロウイルス感染の早期発見のためのマス  
スクリーニングシステムの構築と、早期  
発見後の予防医療の確立により、症状の  
重篤化を予防することが期待される。本  
研究では先天性サイトメガロウイルス感  
染症を早期発見するためのマススクリー  
ニングに適したシステムの開発を目的と

して検討をおこなった。

また、併せて本邦における妊娠中再感  
染のリスクに関して検討を行うため、本  
邦におけるサイトメガロウイルスの株を  
決定するために、抗原部位であるグリコ  
プロテイン B (gB)遺伝子の配列決定を行  
った。

## B. 研究方法

### 1) 保存臍帯を用いた先天性 CMV 感染 症検査

先天 CMV 感染症の検査は新生児尿中に  
含まれるサイトメガロウイルス DNA 検  
査がゴールドスタンダードであるが、  
生後 2 週間以上経過した症例では、先天  
感染なのか、出生後初感染なのかを区別  
することが困難であるため、難聴の診断  
がなされる生後 6 ヶ月ごろに診断を行う  
ためにはレトロスペクティブに先天性感  
染の有無を区別可能な検査手法の確立が  
必要である。そこで、保存乾燥臍帯を用  
いた先天 CMV ウイルスの解析を計画し  
た。本研究には、平成 22 年より平成 24  
年の間に収集された一側性難聴患者およ  
び両側性難聴患者の合計 260 例の保存臍  
帯を用いた。また、これら難聴症例の臨  
床情報の収集を行った。

保存臍帯は Nuclear Free 滅菌水中で  
4 時間静置してふやかした後にはさみ  
を用いて細断し、QIAGEN 社 DNeasy  
Blood and Tissue Kit を用いて組織から  
の DNA 抽出プロトコールに従って DNA  
の抽出を行った。

抽出された DNA の濃度を正確に測定するために、Invitrogen 社の Quant it dsDNA broad range kit を用いてインターカラー法による dsDNA の定量を行い、蛍光強度の計測には Invitrogen 社の Qubit fluor mater を用いた。

CMV の検出には、TaqMan 法を用いた定量 PCR を行った。TaqMan 法の測定に用いるプローブは比較的保存性の高いサイトメガロウイルスの US14 遺伝子座に設計した。反応性のコントロールとしてはヒトゲノム上の *GJB2* 遺伝子部位に設計した TaqMan Probe により DNA 量のコントロールとした。定量リアルタイム PCR 測定には、Applied biosystems 社の Step One Plus を用いた。判断には症候群性の先天 CMV 感染症症例の保存臍帯 4 サンプルを陽性コントロールとして用い、健常児 7 例の保存臍帯を陰性コントロールとして用いた。

## 2) FTA カードを用いた先天性 CMV 感染症のマス・スクリーニング検査手法の確立およびマス・スクリーニング

保存臍帯を用いた検査は定量性が高く有用な検査ではあるが、DNA 抽出のプロセスに時間がかかるため、マス・スクリーニングを行うためには、より高いスループットの検査系を確立する必要がある。

本年度はマス・スクリーニングに適した検査手法の確立に関する検討を行った。マス・スクリーニングとして DNA 検査を行うためには、簡便にサンプル採取が可

能で、長期間保存可能なシステムが必要となるため、先天性代謝異常スクリーニングとして実施されるガスリーカードへの採血時に、DNA を高品質で長期間保存可能な FTA カードに同時にスポットする採取法の有効性に関する検討を行った。

新生児の両親を対象に説明用パンフレットを用いて十分に説明を行った後に書面で同意を取得し、先天性代謝異常症スクリーニング検査（ガスリー検査）を行う際に、併せて FTA カードにも血液検体を採取した。FTA カードは室温にて 30 分間乾燥後、測定を行うまでは室温で保管可能である。測定時に 1.2mm 径のマイクロパンチを用いて血液検体をくりぬいた後に FTA wash buffer で洗浄を行い、TE buffer で再度洗浄を行う。洗浄後の FTA カードをそのまま鋳型に用いて保存臍帯で使用しているのと同様の Taq Man 法を用いた定量 PCR 法によりサイトメガロウイルス US14 遺伝子の測定を行った。また、鋳型 DNA の定量コントロールとして、ヒトゲノム上の *GJB2* 遺伝子の定量も実施した。

## 3) 本邦における CMV 株の直接シーケンス解析

先天性 CMV 感染症の原因として最も多いのが妊娠中の初感染であるが、実際には妊娠初期の IgG が陽性であっても先天 CMV 感染が起こるケースが報告されている。その原因として免疫機能低下に



よる CMV の再活性化とともに、異なる株への再感染が指摘されている。平成 24 年度は先天 CMV 感染陽性であった 12 例を対象にサイトメガロウイルスの抗原部位であるグリコプロテイン B (gB 遺伝子) の配列決定を行った。配列決定は gB 遺伝子の領域に設計したプライマーを用いて PCR 法により gB 遺伝子領域を増幅し、ABI 社 BigDye Terminator v1.1 を用い直接シーケンス法により配列決定を行った。直接シーケンスには ABI 3130xl を用いた。得られた配列を基にアミノ酸配列を決定して clustal W を用いて既知の CMV gB 遺伝子配列との比較を行った。

#### 4) マスクリーニング後の診察フローチャートの作成

従来行われてきた先天サイトメガロウイルス感染症に関する検討では、症候群性の CMV 児あるいは難聴児など症状を有する児が対象であったため、病状に併せた適切な医学的介入のフローが明確であったが、マス・スクリーニングにより全出生児を対象に検討が実施されるため、CMV 陽性であることが診断された児に対するフォローアップ手法に関しては未だ定まっていない状況である。

そこで、本年度は小児科および耳鼻咽喉科を主体にスクリーニング検査陽性症例に対するフォローアッププランの検討を行い、マスクリーニング後の陽性例に対する介入の流れを定めた。

(倫理面への配慮)

被験者に対して十分な説明を行ったうえ、書面で同意を取得して、サンプルを採取した。また、サンプル採取に際しては匿名化を行い個人情報の保護に配慮した。

### C. 研究結果

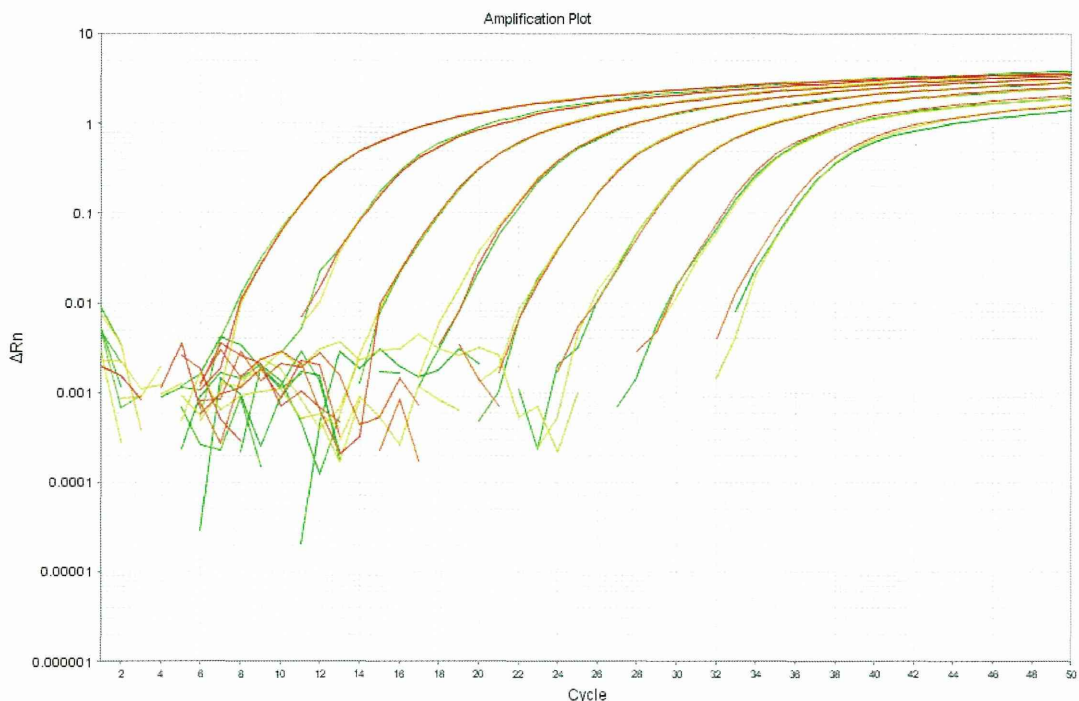
#### 1) 保存臍帯を用いた先天性 CMV 感染症検査

US14 領域に設計した TaqMan Probe を用いた定量 PCR を用いて先天 CMV 感染の有無を検討する検出系を用い保存臍帯を用いた先天性 CMV 感染症検査の有効性に関する検討を行った。

検討の際には、新生児期に尿中より CMV DNA の検出された症候群性の先天サイトメガロウイルス感染児 2 名の保存臍帯を陽性コントロールとして用いた。また、難聴を持たない児 7 名の保存臍帯を陰性コントロールとして用い、同様の検査を 14 回繰り返して実施し、検査ごとにどの程度測定値が振れるかに関する検討も併せて実施した。

その結果、本研究により確立された検出系は非常に再現性が高く全 14 回実施したアッセイにおいて、陽性コントロール、陰性コントロールとも擬陽性・偽陰性として検出されたケースは無かった。また、定量性に関する検討を行った所、非常に定量性も高いことが明らかとなった (図 1)。

また、確立された検出系を用いて、難



**図 1 陽性コントロールオリゴヌクレオチドを用いた定量試験の結果**  
 10 倍希釈系列のサンプルの 3 重測定の結果を示す。ダイナミックレンジも広くまた誤差も非常に少ない検出系を構築した。

聴患者 260 名より保存臍帯の提供を受けて、CMV DNA の検出を試みた結果 20 名 (7.7%) より CMV DNA を検出した。

また、本研究により先天 CMV 感染が陽性であることが確認された一側性難聴患者のうち 1 名では、血清中の CMV 抗体価の上昇も認められることより、現在もウイルスがアクティブな状態にある可能性が強く示唆されたことより、当院小児科においてガンシクロビルを用いた予防的治療が開始された。

**2) FTA カードを用いた先天性 CMV 感染症マスキング検査に関する検討**

一般的に先天 CMV 感染症児の血液中の CMV は尿中に排出される CMV と比較して 100 倍程度少ない事が報告されてお

り、また、乾燥血液サンプル (ろ紙 DBS) を用いた場合にはさらに 1/5 程度の感度となる事が知られている。本研究においても、FTA カードを用いた場合にその検出感度が問題となることが想定されるため、陽性検体および陰性コントロールを用いて感度・特異度の検討を行った (図 2)。

その結果、陽性コントロールでは同一サンプルの 12 回計測で 10 回の検出であり、感度は  $10/12=83\%$  程度であった。一方特異度に関しては非常に高く、擬陽性はほとんど認められず 36 検体の測定で 1 検体のみであった (97%)。この結果より、本検査では擬陽性となるケースは非常に少ないのに対して偽陰性となる可能性が 15% 程度と比較的高率であったため、4

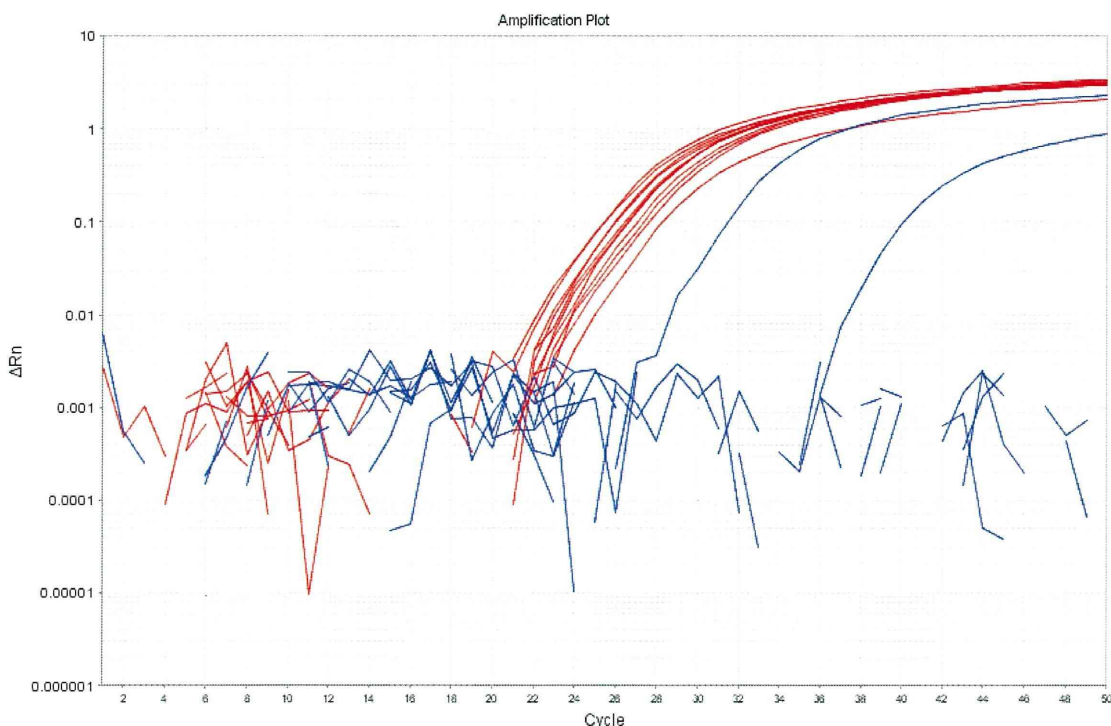


図2 FTAカードを用いたCMVスクリーニング検査の例

ヒトゲノムDNA上に設計したGJB2遺伝子の増幅産物（赤色）は、多少のばらつきを認めるものの、ほぼ一定の増幅を示しており、FTAカードより得られるDNA量が同程度であることを示す。青色はCMVウイルスUS14遺伝子上に設計したプローブの産物を示す。青色左側は陽性コントロールとして用いた症候群性CMV感染症児の増幅産物、青色右側はマスクリーニングにより検出された陽性症例を示す。

重測定を行い偽陰性率を低下させる方法を採用した。

### 3) FTAカードを用いた先天性CMV感染マスキング

確立したFTAカードを用いたハイスループットのリアルタイム系を用い長野県内のマスキングを行うためのパイロット研究として、信州大学医学部附属病院耳鼻いんこう科、産科、小児科で研究実施のための打ち合わせを重ね、実際にCMVのスクリーニング検査システムを立ち上げた。現在までに154検体の解析を完了しており、うち3例で陽性との

結果が得られている。しかしながら、1) ウイルス検査では極微量のコンタミネーションでも検出され問題となるケースが存在する、2) FTAカードによる検出系では定量性が低いことが知られており、コピー数と臨床像の相関解析が困難であることより、FTAカードで陽性となったケースに関しては、保存臍帯を用いた再検査を行い正確なコピー数を確認する流れとした。

実際にFTAカードで陽性と判断された3例のうち保存臍帯サンプルの得られた2例について再検査を行った所、1例で保存臍帯でも陽性であることが確認され、ス

クリーニング検査として有効であることが確認された。

#### 4) 本邦における CMV 株の検討

稀ではあるが、CMV 抗体を保持する妊婦であっても先天 CMV 感染児が生まれるケースがある。この原因としては CMV の再活性化および異なる CMV 株への再感染が報告されている。本研究では、保存臍帯を用いた先天性 CMV 感染症検査の結果、CMV 陽性となった症例を対象に、抗原部位として報告されている glycoprotein B 領域を PCR 法により増幅し直接シーケンス法により塩基配列の決定を行った。その結果、本邦における CMV 株は大きく 2 種類に大別されることが明らかとなった。また、その頻度は 7 検体中 3 検体が type 1、7 検体中 4 検体が type 3 であることが明らかとなり、ほぼ同程度の頻度で存在することが明らかとなった (図 3)。また、難聴の重症度などに関しては大きな差は認められなかった。

#### 5) マスクリーニング後の診察フローチャートの作成

マス・スクリーニングにより全出生児を対象に検討が実施されるため、CMV 陽性であることが診断された児に対するフォローアップ手法に関しては未だ定まっていない状況である。

そこで、本年度は小児科および耳鼻咽喉科を主体にスクリーニング検査陽性症

例に対するフォローアッププランの検討を行い、マスクリーニング後の陽性例に対する介入の流れを定めた。

スクリーニング検査によって検出された陽性児について、必要な事項としては 1) 臨床経過の追跡調査 (血液、画像、電気生理学的検査と、経時的な発達検査を行い、神経学的予後について詳細に解析するとともに臨床的な交絡因子と神経学的予後についての関連を検討する。) 2) 治療的介入効果の評価 (治療に関するプロトコールと効果判定方法を策定し解析する。) の 2 つを、長野県内の各施設で共通して実施する必要があるため、陽性例に対する診断のフローチャートと生後 1、4、7 ヶ月および 1 歳～5 歳における検査項目をまとめた。次年度以降に実際にフォローアップに活用しその有効性と問題点に関して更なる検討を行う予定である。

#### D. 考察

本研究では定量性およびスループットに優れた定量 PCR 法による検出システムを開発するとともに、260 例の保存臍帯より抽出した DNA を用いて解析を行った。

その結果、20 名 (7.7%) の難聴児の保存臍帯より CMV DNA を検出した。よって、本邦における先天 CMV 感染症による難聴患者の割合は、難聴患者全体の 10%程度という結果を裏付けることがで

検体ID	*													type													
18	P	V	Q	A	S	G	V	S	R	R	G	T	T	L	E	S	R	V	L	S	T	K	S	V	L	3	
211	P	V	Q	A	S	G	V	S	R	R	G	T	T	L	E	S	R	V	L	S	T	R	L	A	F	3	
3	S	A	E	T	R	S	L	L	H	N	D	G	N	A	H	N	M	H	L	V	G	S	K	S	V	L	1
2219	P	V	Q	A	S	G	V	S	R	R	G	T	T	L	E	S	R	V	L	S	T	R	S	V	L	3	
148	P	V	Q	A	S	G	V	S	R	R	G	T	T	L	E	S	R	V	L	S	T	R	S	V	L	3	
207	P	V	Q	A	S	G	V	S	R	R	G	T	T	L	E	S	R	V	L	S	T	K	S	V	L	3	
212	S	A	E	T	R	S	L	L	H	N	D	G	N	A	H	N	M	H	L	V	G	S	K	S	V	L	1
218	S	A	E	T	R	S	L	L	H	N	D	G	N	A	H	N	M	H	L	V	G	S	K				1

図3 CMV 抗原部位 Glycoprotein B のアミノ酸配列

保存臍帯を用いた先天性 CMV 感染症検査の結果、CMV 陽性となった症例を対象に、抗原部位として報告されている glycoprotein B 領域を PCR 法により増幅し直接シーケンス法により塩基配列の決定を行った。本邦においては、大きく 2 株に大別される可能性が明らかとなった。

きた。先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴の特徴としては、従来の報告と同様、非常にバラエティに富んでおり、一側・両側性の難聴が有り、進行性・遅発性のケースもあることが明らかと成ってきたため、マスキングによるハイリスク児のピックアップの重要性が改めて示唆された。

また、スループットに優れたマスキング法として、FTA カードと定量 PCR 法を組み合わせた検出システムを開発するとともに、その感度・特異度を明らかにした。過去の報告と同様に、FTA カードを用いた場合には、血液から DNA を抽出した場合と比較して、検出感度が 1/4~1/5 程度に低下することが確認されたため、4 重測定を行うことにより偽陰性を減らす系を確立した。また、確立された検出系を用いて、154 例の FTA を用いた解析を行った結果、3 名より CMV DNA を検出した。この児に関しては、保存臍帯を用いた再検査を行い、フォローアッ

プを行う計画である。今後さらに多数の症例を検討することで、本邦における罹患患者頻度を明らかにすることが可能であると期待される。

また、再感染の可能性に関して検討を行うため、CMV 株は大きく 2 種類に大別されることが明らかとなった。また、その頻度は type 1、type3 とも、ほぼ同程度の頻度で存在することが明らかとなった。海外も含め CMV には大きく分けて 4 株あることが報告されており、今回の検討でもそのうち 2 株が主に存在しており再感染の可能性があることが示された。

## E. 結論

本研究により、定量性およびスループットに優れた定量 PCR 法による検出システムを構築するとともに、その感度および特異度に関して明らかにした。また、FTA カードを用いたマスキング法として 154 名の新生児のスクリーニング検査を実施する事が出来た。さらにまた、

本邦における CMV 株の検討を行い、2 株存在することが確認された。今後更に多数の症例を解析することで、本邦における罹患者頻度が明らかとなることが期待される。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Iwasaki S, Nishio S, Moteki H, Takumi Y, Fukushima K, Kasai N, Usami S: Language development in Japanese children who receive cochlear implant and/or hearing aid. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 76:433-8, 2012
2. 岩崎 聡、西尾信哉、茂木英明、工 穰、笠井紀夫、福島邦博、宇佐美真一：人工内耳装用時期と言語発達の検討—全国多施設調査研究結果—。 *Audiology Japan* 55 : 56—60、2012
3. 山田奈保子、西尾信哉、岩崎 聡、工 穰、宇佐美真一、福島邦博、笠井紀夫：人工内耳と補聴器の装用開始年齢による言語発達検査結果の検討。 *Audiology Japan* 55 : 175—181、2012
4. 西尾信哉、岩崎 聡、宇佐美真一、笠井紀夫、福島邦博：難聴児における低出生時体重児の占める割合およびその言語発達に関する検討。 *Audiology Japan* 55: 146-151、2012
5. 佐藤梨里子、岩崎 聡、鈴木伸嘉、田澤真奈美、茂木英明、工 穰、宇佐美真一：補聴器適合検査の指針による補聴器適合評価の検討。 *Audiology Japan in press*
6. Iwasaki S, Usami S: Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. Patricia Price eds. *Cytomegalovirus infection*. INTECH Publications, 2013.
7. Sano H, Okamoto M, Ohhashi K, Iwasaki S, Ogawa K: Quality of life reported by patients with idiopathic sudden sensorineural hearing loss. *Otol Nreurotol* 34:36-40, 2013.

8. Iwasaki S, Sano H, Nishio S, Takumi Y, Okamoto M, Usami S, Ogawa K: Hearing handicap in adults with unilateral deafness and bilateral hearing loss. *Otol Neurotol* (in press)

### 学会発表

1. 岩崎聡、茂木英明、工 穰、宇佐美真一：先天性サイトメガロウイルス感染症のマス・スクリーニングおよび治療法に関する研究. 第 1 回 耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス 2012.9.15
2. 岩崎聡、佐野肇、西尾信哉、工 穰、岡本牧人、宇佐美真一、小川郁：片側難聴と両側難聴のハンディーキャンプについて—HHIA&VAS による評価— 第 57 回日本聴覚医学会総会. 2012.10.11~12 京都

## G. 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

### Ⅲ. 分担研究報告

# 先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴のマス・スクリーニング および治療法に関する研究

研究分担者 小池 健一 信州大学教授

## 研究要旨

先天性サイトメガロウイルス（CCMV）感染症については、その検出方法、神経学的予後、治療方法などが未解明である。これらを明らかにするために、スクリーニング検査によって検出された陽性者について、その神経学的検査と予後について詳細に検討するためのプロトコルを作成した。さらに、治療に関するプロトコルと効果判定方法を定め、多施設での共同研究体制を構築した。今後、該当患者をすべてデータベース化することによって、神経学的予後と治療的介入による効果について解明すべく研究を開始した。

### A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス（CCMV）感染症の検出方法を確立し、それら患者における神経学的予後について、様々な交絡因子とともに解析しそれを明らかにする。さらに、治療方法とその効果を検討し、本疾患のガイドライン策定に寄与することを目的とする。

### B. 研究方法

対スクリーニング検査によって検出された陽性者について、血液、画像、電気生理学的検査と、経時的な発達検査を行い、神経学的予後について詳細に解析する。臨床的な交絡因子と神経学的予後についての関連を検討する。さらに、治療に関するプロトコルと効果判定方法を策定し、解析する。以上の検査・評価基準と治療方法は12の関連施設で共同研究体制をとり、統一基

準の下で行い、データベース化して解析する。

（倫理面への配慮）

本研究は全て、信州大学倫理委員会の承認を受けて行っている。観察研究部分と、治療にかかる介入研究部分と、それぞれ保護者に対して十分な説明の下、インフォームドコンセントを得て進めている。研究で得られたデータは全て匿名化し、小児医学講座内で厳重に管理している。

### C. 研究結果

研究開始年度である本年度は、研究プロトコルの作成と共同研究体制の構築を行った。研究の概要を図1のように示し、共同研究施設と協議し、すべての施設で協同研究の同意が得られた。研究プロトコルについては、評価プロトコル（表1）、治療方針（表2）、フォローアッププラン（表3）



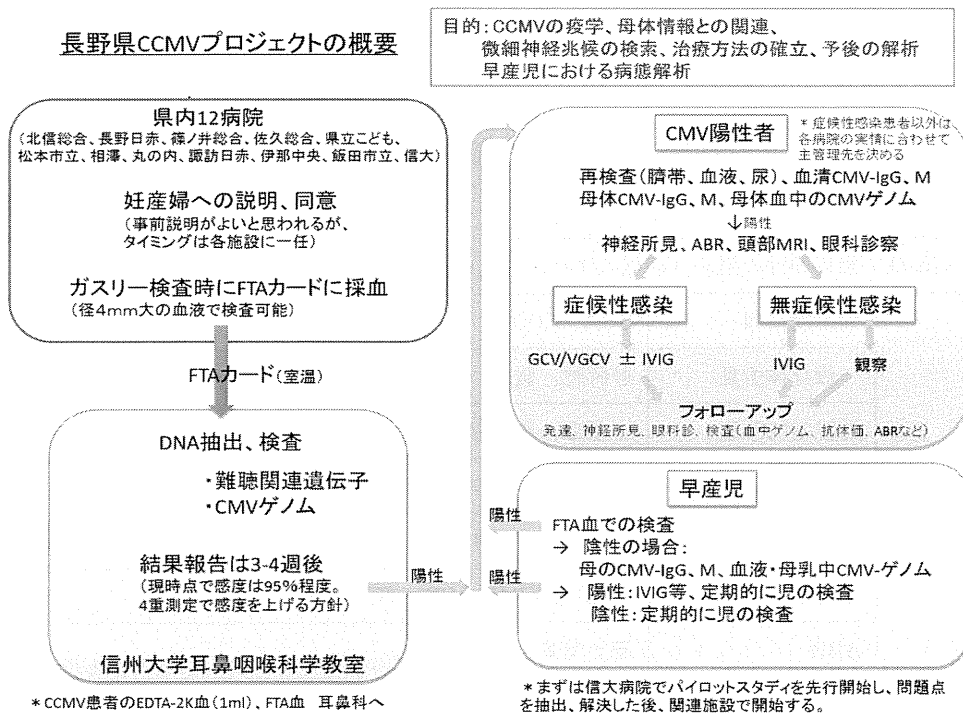


図1. 研究の概要の説明図

の通り策定した。現在このプロトコールに沿って症例を集積中である。

#### D. 考察

この数年、CCMV感染症によると思われる発達障害児の報告が増加している。しかしその頻度や神経学的予後を規定する因子などの詳細は不明で、治療方法も統一した見解はない。一方、若年女性におけるCMV抗体保有率は低下していると言われており、この問題は喫緊の課題である。今回、多施設共同研究が可能となり、多数症例が集積され、この問題に対する回答が得られるものとする。

#### E. 結論

多施設共同研究体制の下で、共通の評価、治療プロトコールを策定したことによって、

今後、本疾患における神経学的予後の改善に貢献する知見が得られるものと考えられた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

本年度は報告対象となる論文はない。前述した研究プロトコールに沿ってフォローした数症例を、中間データとして第5回日本小児科学会長野地方会(平成25年6月23日、長野市)で発表予定。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし

表 1. 評価プロトコール

①一次評価		
	診断の確定	CMV-PCR 再検 (血液、尿、臍帯)、血清 CMV-IgG・M
②二次評価		
	症候性・無症候性の鑑別、病型の決定、母体の評価	
	周産期情報	SGA、早産
	一般身体所見	肝脾腫、黄疸、貧血、呼吸器症状、点状出血、紫斑
	神経学的診察	小頭症、不活発、筋緊張低下、哺乳不良、痙攣
	眼科診察	脈絡網膜炎、白内障
	血液検査	ALT、PLT、D-Bil、Hb
	髄液検査	細胞数、CMV-PCR、蛋白、糖
	ABR	聴力閾値、脳幹機能
	頭部 CT	脳内石灰化
	頭部 MRI	脳萎縮、脳室拡大、上衣下仮性嚢胞、大脳白質病変、大脳皮質形成異常、小脳低形成 (萎縮)、髄鞘化遅延、水頭症
	母体の評価	血中 CMV-IgG・M、血中 CMV-PCR
<病型分類>	無症候性	異常所見なし
	症候性脳所見型	脳室拡大、脳内石灰化、網脈絡膜炎、ABR 異常など、脳所見のみ
	症候性全身型	脳所見に加え肝障害、出血斑、血小板減少、眼科的異常などを伴う
③フォローアップ		
	無症候性感染	表 3 に従い、発育・発達、血液検査、ABR、画像検査でフォローする
	症候性感染	表 3 に従い、発育・発達、血液検査、ABR、画像検査でフォローする

表 2. 治療プロトコール

症候性	全身型	IVIG	300mg/kg/回 2~3 時間かけて点滴静注 治療開始 1 週目と 2 週目に 1 回ずつ、計 2 回
		VGCV	16mg/kg/回 1 日 2 回内服 6 週間 (調剤方法は別添資料を参照)
		GCV	内服困難例、全身状態不良例などでは、VGCV のかわりに GCV を使用しても構わない：6mg/kg/回 1 日 2 回点滴静注 6 週間
	脳所見型	IVIG	全身型と同様
		VGCV	8mg/kg/回 1 日 2 回内服 6 週間
		GCV	全身型と同様
無症候性	無治療または IVIG (全身型と同様)		

表 3. フォローアッププラン

暦齢	神経 診察	血液 検査	尿検査	聴力検 査	KIDS/新版 K 式/WISC	眼科診	頭部 MRI
1か月齢	○	○	○	○		○	○
4か月齢	○	○	○				
7か月齢	○	○	○	○	○		
1歳	○	○	○	○		○	
2歳	○	○	○	○	○		○
3歳	○	○	○	○	○		
4歳	○	○	○	○	○		
5歳	○	○	○	○	○		

# 先天性サイトメガロウイルスによる難聴のマス・スクリーニング および治療法に関する研究

研究分担者 小川 洋 福島県立医科大学教授

## 研究要旨

マウスサイトメガロウイルスを出生直後のマウスに脳内接種をすることにより高率に聴覚障害をきたすマウスCMV感染モデルの作製を試み、感染部位の観察を行った。このマウスの実験系では生後6週までの期間におよそ80%という高率に聴覚障害を引き起こすことができた。これらのマウスの側頭骨病理標本においてHE染色では巨細胞は確認できず、形態学的な変化は軽度であり、免疫染色においてラセン神経節に感染細胞が確認された。

## A. 研究目的

ヒトサイトメガロウイルスの先天感染による聴覚障害は先天性難聴の原因として頻度が高いものの、聴覚障害を引き起こすメカニズムに関しては不明な点が多い。聴覚障害を引き起こすメカニズムを解明するためには感染動物モデルを用いて機能的、形態的な研究を行うことが重要である。従来、先天性感染モデルとしてモルモットを用いた実験系や、内耳感染モデルとしてマウスやラットを用いた系の報告がなされてきた。サイトメガロウイルス (CMV) は種特異性が高く、ヒトCMVはヒトに、モルモットCMVはモルモット、マウスCMVはマウスにしか感染しない。ウイルス感染が示されたモデルにおいても聴覚障害を必ずしも引き起こすとは限らず、高率に聴覚障害をきたすモデルの作製が期待されていた。今回われわれは、マウスCMVにより高率に聴覚障害をきたすマウスCMV感染モデルの作製を試み、感染部位の観察を行った。

## B. 研究方法

### 1. 感染モデルの作製

マウスCをBalb/3T3 細胞上で増殖させ、上清をウイルス液として回収し、 $1.7 \times 10^2$  pfu (plaque formation unit) の濃度のウイルス量を生後24時間以内のマウス (Balb/c) 右脳室に27Gの針を用いて接種した。対象としてマウス腹腔内に同様のウイルス量を接種した。このウイルス量は腹腔内投与においてほぼ50%のマウスが死亡する量である。

### 2. ABR (auditory brain stem response) の計測

マウスはネンブタール3ml + セロクター2%注射液0.9ml + 生理食塩水16.9mlで調整した麻酔液を0.006ml/gで腹腔内投与による麻酔を施したのち、検査側耳後部、対側耳後部、腹部に針電極を刺入し、検査側外耳道入口にスピーカーを設置し刺激音を与え、検査側耳後部皮下と腹部皮下間でABR