

B. 研究方法

1) 先天性 CMV 感染の診断法の標準化

National Institute for biological Standards and Control から購入した国際標準物質 (HCMV Merlin 株の凍結乾燥製剤) を、CMV DNA が検出されないヒト尿に希釈し、DNA 抽出した後、リアルタイム PCR 法を用いて CMV DNA 定量を行った (Wada, J Clin Microbiol, 2007)。各サンプルを duplicate で測定し、計 4 回の測定結果を平均した。この検討より、臨床検体の測定結果を「IU (国際単位)」表記とした。続いて、先天性 CMV 感染症と過去に診断されている患者の尿を用い、リアルタイム PCR 法にて CMV DNA を測定した。対照に血清学的に CMV 未感染の乳児の尿を用いた。

2) 先天性 CMV 感染症診断サービスの構築：

分担研究施設 (東京大学小児科、岡明；旭川医科大学小児科、古谷野伸；神戸大学小児科、森岡一朗；藤田保健衛生大学小児科、吉川哲史；長崎大学小児科、森内浩幸) と共同で、先天性 CMV 感染症診断サービスの流れ、患者該当基準、運用方法を協議・作成した。

(倫理面への配慮)

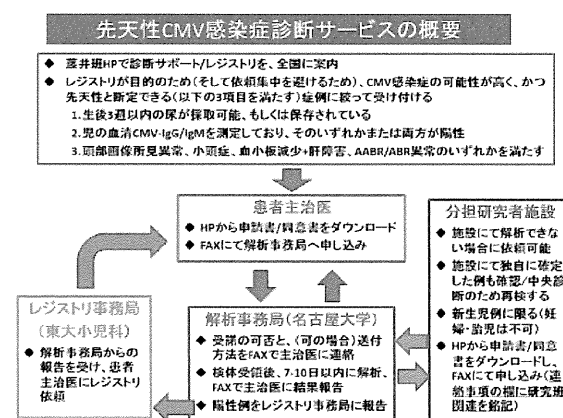
本研究はヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、個人情報管理に万全を期して実施する。検査の実施に当たっては、文書による説明および同意を取る。また、研究の公開、個人情報の保護など臨床研究に関する倫理指針を遵守する。患者の匿名化により患者に不利益が及ぶ可能性を排除する。患者の人権擁護、個人情報の保護、データベースの機密性等については特に注意を払いこれを保証する。本研究は、名古屋大学附属病院の倫理委員会にて、実施承認された。

C. 研究結果

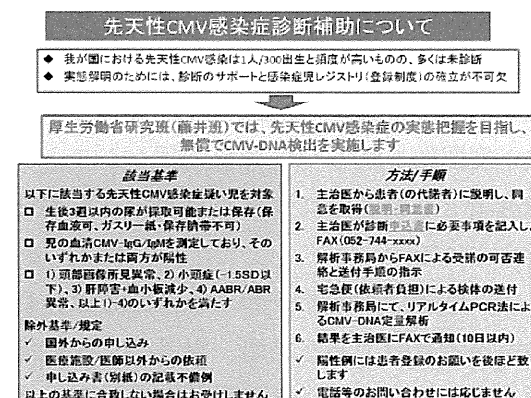
1) 先天性 CMV 感染診断法の確立と標準化：自施設の系を国際標準物質でキャリブレーションした結果、CMV DNA 量は 1 コピー/mL (自施設) = 2.5 IU/mL であった。先天性 CMV 感染症児の尿から、多量の CMV DNA が検出された。一方、非感染児の尿からは CMV DNA は検出されなかった。

2) 先天性 CMV 感染症診断サービスの構築：

以下に診断サービスの概要 (案) を示す。研究班のホームページを通し、診断サービス実施を公開・宣伝する。先天性 CMV 感染症が疑われる児を診察した各主治医は、ホームページから申込書をダウンロードし、FASX にて解析施設である名古屋大学に検査依頼をする。



測定受け入れ患者該当基準は以下の通りとした。本サービスの目的は患者登録であるため、なるべく陽性症例を多く拾えるように該当基準を設定した。



申し込みの際に用いる患者情報シートを

示す。陽性例はレジストリに参加後、更に詳しい情報収集を行うが、診断サービスの段階では限られた情報のみに留めた。

厚生労働省研究班(藤井班) 先天性CMV感染症診断 解析事務局御中
FAX番号 052-744-XXXX

***** 先天性CMV感染症診断 申込書 *****

施設名 _____ 所属名 _____
施設住所 _____
主治医名 _____
FAX番号 _____ (検査受検の可否・結果をお伝えします)
電話番号 _____ (申込書に不備があったとき問い合わせます)

患者情報 (下記は必須です。記載漏れの場合受検できないことがあります)
母妊娠歴 回妊娠 回経産 同胞の数 人 出産時年齢 歳
IUGR (無・有・妊娠 週から) 胎児エコー所見 ()
妊娠中のCMV感染症(有・無・不詳) 有の場合(初感染・再感染・不明)
初・再感染の判定根拠 ()
生年月 年 月 日 (男・女) Appgar score 1分 点 / 5分 点
在胎週数 週 日 出生体重 _____ g 身長 _____ cm 頭圍 _____ cm
日齢 _____ 日 (申請時の日齢)
先天性CMV感染症を疑う根拠
CMV-IgM結果 陰() 陽() 方法()
CMV-IgG結果 陰() 陽() 方法()
その他のウイルス学的検査結果 ()
頭脳画像異常(例:石灰化、脳室拡大、脳萎縮、皮質形成異常、白質信号変化等)
有・無 方法() 所見()
小頭症(＜-1.5SD以下) 有・無 () SD
肝障害(ALT≥100IU/L) 有・無 () ALT _____ IU/L
血小板減少(≤15万/mm³) 有・無 値() /mm³
AABR pass/refer/未接 referの場合(右側・左側・両側)
AABR異常あり/AABR異常なし/未接 所見()

患者同意 有・無 (同意が無い場合は検査受検できません)
検体 原則として全尿を提出して頂きます。全尿1mlを採取し、冷蔵(4℃)保存してください。
尿(全尿) 有・無 採取()月 日、生後()日(送・未定) 保存方法(冷蔵・凍結)
生後3歳を過ぎており、他に保存検体がない場合のみ全血(△/▽)血(至五)も受け付けます。
全血 量()mL 採取()月 日、生後()日 保存方法(冷蔵・凍結)

連絡事項(あれば)

以上、相違ありません。 署名 _____

D. 考察

現在、臨床的に先天性 CMV 感染が疑われた症例を確定診断する施設がないことが問題となっている。先天性 CMV 感染症児レジストリへのリクルートはもとより、研究班として相談を受けた場合に中央診断を行い、診断可能な体制を構築することは不可欠である。本年度、我々は先天性 CMV 感染の診断法を標準化し、広く臨床医がアクセスできる先天性 CMV 感染症診断サービスの構築を試みた。また、CMV DNA 定量に、国際単位を導入し、標準化を行った。これらは、次年度開始される CMV 感染症児レジストリの運用と有効利用に大きく寄与するものと考えられる。

CMV 感染症診断サービスについては、目的が患者登録であるため、なるべく陽性症例を多く拾えるように該当基準を設定した。特にハイリスクである先天性難聴児を多く

登録し見落とさないように、該当基準に工夫をこらした。

CMV 先天感染症児レジストリシステムが確立されたなら、感染及び後遺症発生の実態把握が可能となるとともに、医療機関への様々な情報提供に生かすことができるであろう。海外では先天性 CMV 感染症児に高率に合併する難聴に対して、ガンシクロビル／バルガンシクロビルを用いた治療が確立されつつある。わが国においても、一部の施設でガンシクロビル治療が行われているが保険適応なく、標準治療には至っていない。レジストリにより、治療実態の調査も可能となる。更には、先天性 CMV 感染症児の長期予後明らかになるであろう。これらは CMV 先天感染症児に対する治療の適応・治療法の選択に、貴重な情報源となると考えられる。

E. 結論

先天性 CMV 感染症児レジストリの確立を目指して、先天性 CMV 感染の診断法を標準化し、広く臨床医がアクセスできる先天性 CMV 感染症診断サービスの構築を試みた。本診断サービスはレジストリの運用と有効利用に大きく寄与するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawada J, Ito Y, Torii Y, Kimura H, Iwata N. Remission of juvenile idiopathic arthritis with primary Epstein-Barr virus infection. *Rheumatol* 52:956-8 2013
2. Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A. Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome. *Neuropediatrics* 44:155-8, 2013
3. Ito Y, Kawamura Y, Iwata S, Kawada J,

- Yoshikawa T, Kimura H. Demonstration of type II latency in T lymphocytes of Epstein-Barr Virus -associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 60: 326-328, 2013
4. Esaki S, Goshima F, Kimura H, Murakami S, Nishiyama Y. Enhanced antitumoral activity of oncolytic herpes simplex virus with gemcitabine using colorectal tumor models. *Int J Cancer* 132:1592-601, 2013
 5. Torii Y, Kimura H, Hayashi K, Suzuki M, Kawada J, Kojima S, Katano Y, Goto H, Ito Y. Causes of vertical transmission of hepatitis B virus under the at-risk prevention strategy in Japan. *Microbiol Immunol* 57:118-21, 2013
 6. Narita Y, Murata T, Ryo A, Kawashima D, Sugimoto A, Kanda T, Kimura H, Tsurumi T. Pin1 interacts with the Epstein-Barr virus DNA polymerase catalytic subunit and regulates viral DNA replication. *J Virol* 87:2120-7, 2013
 7. Isobe Y, Hamano Y, Yoshinori Ito Y, Kimura H, Tsukada N, Sugimoto K, Komatsu N. A monoclonal expansion of Epstein-Barr virus-infected natural killer cells after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *J Clin Virol* 56:150-2, 2013
 8. Ohta R, Imai M, Kawada J, Kimura H, Ito Y. Interleukin-17A-producing T lymphocytes in chronic active Epstein-Barr virus infection. *Microbiol Immunol* 57:139-44, 2013
 9. Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32:699-701, 2013
 10. Kawano Y, Iwata S, Kawada J, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kojima S, Kimura H, Ito Y. Plasma viral MicroRNA profiles reveal potential biomarkers for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 208: 771-9, 2013
 11. Sugimoto A, Sato Y, Kanda T, Murata T, Narita Y, Kawashima D, Kimura H, Tsurumi T. Different Distributions of Epstein-Barr virus early and late gene transcripts within viral replication compartments. *J Virol* 87: 6693-9, 2013
 12. Murata T, Iwata S, Siddiquey NA, Kanazawa T, Goshima F, Kimura H, Tsurumi T. Heat shock protein 90 inhibitors repress latent membrane protein 1 (LMP1) expression and proliferation of Epstein-Barr virus-positive natural killer cell lymphoma. *PLoS One* 8:e63566, 2013
 13. Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H. Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55, 566-571, 2013
 14. Suzuki M, Torii Y, Kawada J, Kimura H, Kamei H, Onishi Y, Kaneko K, Ando H, Kiuchi T, Ito Y. Immunogenicity of inactivated seasonal influenza vaccine in adult and pediatric liver transplant recipients over two seasons. *Microbiol Immunol* 57:715-22.2013
 15. Ito Y, Suzuki R, Torii Y, Kawa K, Kikuta A, Kojima S, Kimura H. HLA-A*26 and HLA-B*52 are associated with a risk of developing EBV-associated T/NK lymphoproliferative disease. *Blood e-Letter*

ID: bloodjournal_el; 8085, 2013

16. Kato S, Miyata T, Takata K, Shimada S, Ito Y, Tomita A, Elsayed AA, Takahashi E, Asano N, Kinoshita T, Kimura H, Nakamura S. Epstein-Barr virus-positive cytotoxic T-cell lymphoma followed by chronic active Epstein-Barr virus infection-associated T/NK-cell lymphoproliferative disorder: a case report. *Hum Pathol* 44:2849-52, 2013
17. Kimura H, Kawada J, Ito Y. Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms. *Nagoya J Med Sci* 75: 169-79, 2013

2. 学会発表

1. 木村 宏. 「母子感染」ー単純ヘルペスウイルス. 第 20 回ヘルペス感染症フォーラム.札幌. 2013年8月23日
2. Kawano Y, Iwata S, Kawada JI, Gotoh K, Suzuki M, Torii Y, Kimura H, Ito Y. Circulating Viral MicroRNAs Are Potential Biomarkers for Disease Status in Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA , July 22, 2013
3. Kawada JI, Ito Y, Iwata S, Kawano Y, Kanazawa T, Siddiquey MN, and Kimura H. mTOR inhibitors induce cell cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma. The 38th International Herpesvirus Workshop, Grand Rapids, USA , July 22, 2013,

1. 特許取得

- 1) 特許第 5205609 号. ウイルス検出用オリゴヌクレオチドセット、EBV、CMV 及び HHV-6 の分析方法及び検出キット. 発明者;木村 宏、西山幸廣、和田かおる、久保田直実特許取得日 : 2013 年 3 月 1 日
- 2) 特許第 5429679 号: ウイルス感染細胞の検出・同定法及びキット. 発明者;木村 宏、西山幸廣. 特許取得日 : 2013 年 12 月 13 日

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

G. 知的所有権の取得状況

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Torii Y, Kimura H , Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Clinico-epidemiological studies of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan.	<i>Pediatr Infect Dis J</i>	32	699-701	2013
Ito Y, Kimura H , Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan.	<i>Pediatr Int</i>	55	566-571	2013

妊婦の抗体測定と胎児超音波診断による先天性サイトメガロウイルス感染症の予後予測

分担研究者 愛泉会日南病院疾病制御研究所 峰松俊夫

研究要旨

現在、先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の妊娠中の検査として、母体の血清学的検査、胎児検体のウイルス学的検査、胎児の超音波画像検査が実施されている。これらの検査のうち、胎児検体を用いるウイルス学的検査は妊娠に対しての侵襲性が高い。そこで、先天性 CMV 感染症の発症・予後の予想が血清学的診断と胎児超音波検査の組み合わせで可能かを検討した。

出生児 1163 名のうち、胎内 CMV 感染は 5 名（先天性 CMV 感染発生率 0.43%）だった。そのうち症候性感染は 2 名（先天性 CMV 感染症発生率 0.17%）であり、1 名が重症先天性 CMV 感染症と診断され、残りの 1 名が感音性難聴となった。これら症候性感染となった 2 名は、妊娠初期に IgM 抗体陽性、Avidity Index 低値の初感染妊婦から出生しており、重症児は胎児超音波診断においても頭部・腹部超音波異常を示していた。

今回の我々の研究では、抗 CMV IgG 抗体の Avidity Index 測定、IgM 抗体の検出、および胎児超音波診断の所見を総合的に判断すれば、CMV 感染児の予後判断に役立てられ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く、全出生児の 0.3-0.4% が胎内感染を起こしている。

しかし、胎内 CMV 感染を証明しても、必ずしも出生時に児が発症してくるとは限らず、また、出生後しばらくしてから難聴等の中枢神経障害を示すこともあれば、全く障害を示さずに健常児と同様に育つ児もいる。

妊娠初期における妊婦の CMV 抗体スクリーニングは、人工中絶の増加を招く恐れがあるものの、その後の妊娠生活等における教育指導に役立てることもできる。そのためには、妊婦への情報提供へとつながる先天性 CMV 感染症の予後予測が可能な診断法の確立が必要である。

胎内 CMV 感染（症）の診断は、母体の血清学的検査、羊水等の胎児検体を用いたウイルス学的検査、および超音波診断検査が主な

検査法となっている。このうち胎児検体の採取には侵襲を伴い、流産を引き起こすこともある。よって、血清学的検査と超音波検査法の組み合わせで、感染児の予後予測ができれば望ましい。

本研究では先天性 CMV 感染症の発症・予後の予測を可能とできるかを研究の目的として、母体の抗 CMV 抗体測定および胎児超音波診断と出生児の神経学的後遺症の関係を調べた。

B. 研究方法

妊婦・胎児・新生児に対する臨床研究は宮崎大学医学部の治験審査委員会の承認を得て、研究協力へのインフォームドコンセントの了承が得られた出生 1163 例を対象として実施した。

実験方法の概要を図 1 に示した。

妊娠初期 8 週から 12 週に母体の血清を採取し、デンカ生研社の EIA キットあるいはシ

シーメンス社のエンザイグノスト B キットを用いた ELISA 法により、キット添付の説明書の方法に従って、抗 CMV IgG 抗体と IgM 抗体を測定した。

IgM 抗体が陽性だった症例では、宮崎大学において詳細な超音波画像診断システムにて胎児の状態を調べ、妊婦家族の希望があれば羊水穿刺を実施し、胎児の CMV 感染の有無を調べた。

抗 CMV IgG 抗体が陽性だった血清は、IgG 抗体の Avidity を測定した。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。その後は添付説明書の通りに、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。

妊娠初期に抗 CMV IgM 抗体が陰性だった妊娠例については、妊婦健診において通常スケジュールの胎児超音波診断を実施することとした。

また、妊娠初期に IgG 抗体が陰性だった妊婦は、妊娠中期および後期にも初期と同様に抗 CMV IgG 抗体と IgM 抗体を測定した。その中で妊娠経過中に IgG 抗体陽転を示した症例については、妊娠中の初感染とみなし、宮崎大学において胎児の超音波検査を詳細に実施した。

児の出生後は、出生 1 週間以内の新生児尿を検体として、CMV 遺伝子の有無を調べた。尿中 DNA をヨウ素沈殿法にて分離・精製し、PCR にて CMV の前初期抗原遺伝子領域およ

び pp71 後期遺伝子領域を増幅し、アガロースゲル電気泳動法で増幅 DNA の確認を行った。

尿中から CMV 核酸が増幅検出された先天性 CMV 感染児については、眼底網膜検査や聴性脳幹反応 (ABR) 検査等を実施して、中枢神経障害等の発症の有無を出生後 3 年間追跡調査した。

C. 研究結果

研究結果の概要を図 2 に示した。

出生数 1163 例を研究対象とし、妊娠初期の抗 CMV IgG 抗体と IgM 抗体検査を 10.8 ± 2.2 週で実施した。

妊娠初期の妊婦の CMV 抗体陰性率は 16.7% (194/1163) であり、妊婦の CMV 既感染率は 83.3% (969/1163) であった。IgM 抗体陽性者は全数の 3.4% (40/1163) だった。IgM 抗体陽性者はすべて IgG 抗体陽性でもあり、IgG 抗体陽性妊婦の IgM 抗体陽性率は 4.1% (40/969) であった。IgG 抗体陰性で IgM 抗体陽性の妊婦は確認できなかったことから、今回の研究において感染極初期の妊婦はいなかったと判断した。

IgG 抗体陽性妊婦について、IgG 抗体の AI を測定したところ、AI 35%未満の低値を認められたのは、IgM 抗体陽性者では 22.5% (9/40)、IgM 抗体陰性者では 7.4% (69/929) であった。

出生児の尿から CMV DNA を検出して先天性 CMV 感染の調べた結果、出生児の 5 名が陽性であり、先天性 CMV 感染率は 0.43% (5/1163) であった。

感染児 5 名のうち 2 名が先天性 CMV 感染症として発症していた。そのうち重症型の 1 名は超音波診断において異常像 (脳室拡大、腸管高輝度エコー像、羊水過少) を示していた。また、その母親は妊娠初期に IgM 抗体陽性で、IgG 抗体 AI も低値であり、CMV 初感染妊婦からの出生と判断した。

発症した残り 1 名は出生後に難聴症状を示し、AI 低値から、初感染妊婦からの出生と判断した。

感染は成立したが、発症しなかった 3 名のうち 2 名は IgG 抗体 AI 高値の妊婦からの出生であり、既感染妊婦において、妊婦が

CMV 重感染あるいは再活性化による回帰感染を起こして胎児に感染したものと判断した。

無症状で経過した児 1 名は妊娠中に抗体陽転した妊婦、すなわち妊娠中後期での初感染妊婦からの出生であった。

D. 考察

宮崎県において 2000 年ごろの妊婦の CMV 抗体陽性率は 90% を超えていたが、今回の研究では妊婦の CMV 抗体陽性率は 83.3% であった。全国平均ほどではなくても、宮崎県においても最近の妊婦の CMV 抗体陽性率の減少が認められた。

ところで、CMV 感染の初期には CMV 抗原に対して低結合力 (low-avidity) の IgG 抗体が産生され、感染の経過にしたがって、しだいに高結合力 (high-avidity) IgG 抗体が産生されることが知られている (Blackburn, N.K. et al.: J. Med. Virol. 33:6-9, 1991)。すなわち、Avidity Index (AI) を測定して、それが低値のものほど感染初期、AI が高値であれば感染から時間が経過した既感染者であると判断できる。妊娠初期の 12 週までに CMV 感染すれば重症 CMV 感染症児が出生しやすいことが知られており、妊婦の感染時期を推定することは先天性 CMV 感染症の成り行きを考慮する上で重要な情報である。そこで、抗 CMV IgG 抗体および IgM 抗体の検出に加えて、妊婦の抗 CMV 抗体の avidity の測定が先天性 CMV 感染症における予後の判断に利用可能かを本研究では重点的に検討することにした。

AI 測定値から感染児の予後を検討したところ (表 1)、AI 35% 未満の低 AI 妊婦において、すなわち CMV 初感染妊婦において、症候性の先天性 CMV 感染が有意に高い確率で発生していた。

また、重症となった先天性 CMV 感染症児は、中枢性麻痺、発達遅滞、両側聴神経障害を認めたが、胎児の胎児超音波診断においても頭腹部の異常像を認めていた。超音波画像診断での異常所見は、児の予後を予測する上での判断材料となりうると思われた。

今回の我々の研究では、IgG 抗体の Avidity Index の測定、IgM 抗体の検出、および胎児超音波診断を組み合わせることで、CMV 感

染児の予後判断に役立てることが可能と考えられた。

E. 結論

1) 妊婦の抗 CMV IgG 抗体陽性率 (CMV 感染率) は 83.32% (969 名/1163 名中)、そのうちの 4.13% (40 名/969 名中) が IgM 抗体陽性であった。

2) 妊娠初期に CMV IgG 抗体陰性者 194 名中の 1 名が妊娠中に IgG 抗体陽性となり、妊娠中の抗体陽転率は 0.51% であった。

3) 出生児 1163 名のうち、胎内 CMV 感染は 5 名 (先天性 CMV 感染発生率 0.43%) だった。そのうち症候性感染は 2 名 (先天性 CMV 感染症発生率 0.17%) であり、1 名が重症先天性 CMV 感染症と診断され、残りの 1 名が感音性難聴となった。

4) 本研究において先天性 CMV 感染症は、妊娠早期において母体血清が抗 CMV IgM 抗体陽性かつ抗 CMV IgG 抗体が低 AI だった妊婦からの出生児に認められた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kazufumi Ikuta, Toshio Minematsu, Naoki Inoue, Takahiko Kubo, Kimisato Asano, Kei Ishibashi, Takashi Imamura, Hidetaka Nakai, Tetsushi Yoshikawa, Hiroyuki Moriuchi, Shigeyoshi Fujiwara, Shin Koyano, Tatsuo Suzutani : Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. J Clin Virol. 58(2) : 474-478, 2013.
- 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. 36 : 10-15, 2014.

2. 学会発表

- 1) 長又哲史、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、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 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013, 5, 札幌
- 2) 森上聡子、蝦名康彦、平久進也、谷村憲司、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染症の発症予知
第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会、2013, 5, 札幌
- 3) 蝦名康彦、平久進也、長又哲史、森上聡子、谷村憲司、出口雅士、森岡一朗、園山綾子、峰松俊夫、山田秀人：IgG avidity 測定による先天性サイトメガロウイルス感染の発生予知
第 28 回ヘルペスウイルス研究会、2013, 5, 淡路市
- 4) Yasuhiko Ebina, Ayako Sonoyama, Ichiro Morioka, Kenji Tanimura, Shinya Tairaku, Toshio Minematsu, and Hideto Yamada : Diagnostic value of IgG Avidity of pregnant women for the prediction of congenital cytomegalovirus infection.
17th International Conference on Prenatal Diagnosis and Therapy, 2013, June, Lisbon
- 5) 長又哲史、蝦名康彦、峰松俊夫：効果的な CMV スクリーニング法の確立を目指して。
第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013, 6, 倉敷
- 6) 蝦名康彦、長又哲史、峰松俊夫：母体血サイトメガロウイルス IgG avidity 測定による先天性感染の発症予知。
第 54 回日本臨床ウイルス学会、2013, 6, 倉敷
- 7) 生田和史、峰松俊夫、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：先天性サイトメガロウイルス感染におけるウイルス血清型・DNA 型の解析
第 67 回日本細菌学会 東北支部総会、2013, 8, 仙台
- 8) 峰松俊夫：先天性サイトメガロウイルス感染症における IgG 抗体の Avidity 測定法
第 18 回日本神経感染症学会、2013, 10, 宮崎
- 9) 峰松俊夫：先天性サイトメガロウイルス感染症対策のための検査と診断法
第 19 回三重県生涯教育特別研修セミナー、2013, 10, 津
- 10) 金子政時、山下理絵、村岡純輔、鈴木智幸、小玉由紀、鮫島浩、池ノ上克、峰松俊夫：体内サイトメガロウイルス感染症の母体スクリーニングにおける IgG avidity の有用性
第 58 回に本末熟児新生児学会学術集会、2013, 11-12, 石川
- 11) 鳥谷部邦明、池田智明、池尻誠、森川文博、三井栄、村田博昭、菅秀、藤澤隆夫、庵原俊昭、増田佐和子、峰松俊夫：臨床研究「三重県の妊婦におけるサイトメガロウイルス感染に関する研究」について平成 25 年度新生児聴覚スクリーニングに関する研究会、2014, 2, 津

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし

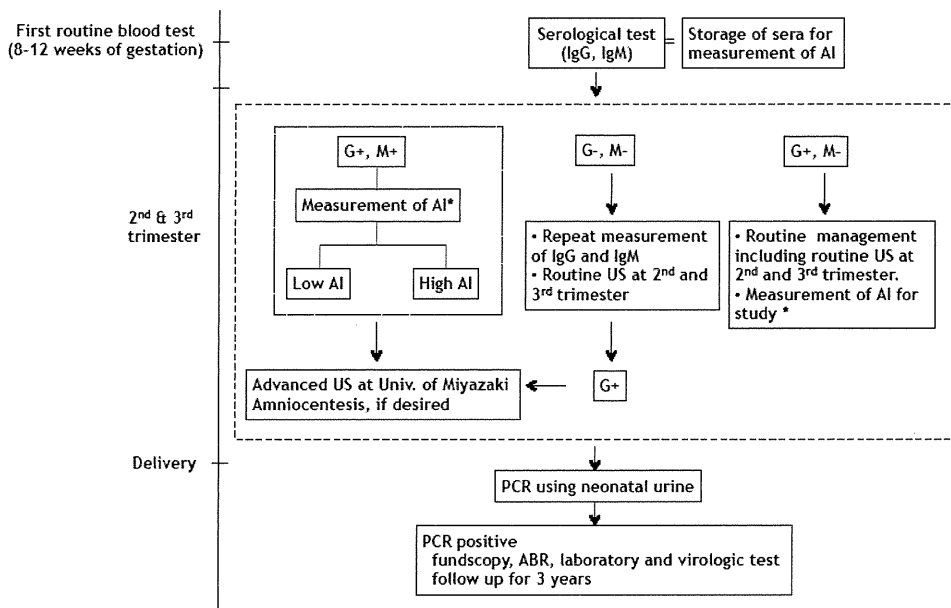


図1 研究方法の概略（詳細は本文参照）

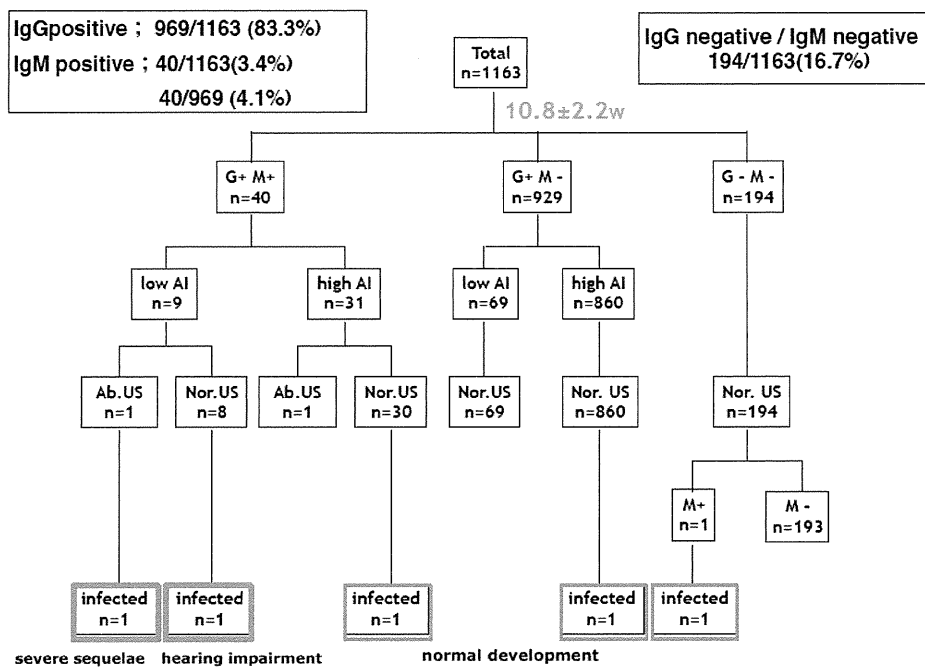


図2 研究結果概要（先天性CMV感染率 0.43% (5/1163)）

表 1. 抗CMV IgG抗体Avidity Index に基づく IgM抗体陽性、胎児感染、後遺症の発生数

IgG AI (%)	Number of Cases	Positive IgM antibody (n)	Infection (n)	Sequelae (n)
0 < - < 35	79	10	3	2
35 - < 50	130	6	0	0
50 - < 70	301	15	1	0
70 - 100	460	10	1	0

AI; avidity index , *; p <0.01
抗体陽性例を含む検討.

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikuta K, <u>Minematsu T</u> , Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	J Clin Virol	58	474-478.	2013

症候性先天性サイトメガロウイルス感染児への抗ウイルス療法の検討

研究分担者 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

長崎県で2013年1-12月にヒトT細胞白血病ウイルスI型（HTLV-1）キャリアから生まれた3歳以降の児の追跡調査を行った。2010年には119名の妊婦がキャリアと同定されていたが、今回追跡調査できた児はその他の年齢も含めて13名のみだった。PA法陽性例が1例（母乳栄養児）あったが、確認検査を実施しないまま結果を説明していることが判明し、プロトコールが遵守できていない問題が浮かび上がった。

A. 研究背景・目的

ガンシクロビルによる抗ウイルス療法によって、症候性先天性CMV感染児の聴力（Kimberlin et al, J Pediatr. 2003; 143: 16-25）および精神運動発達（Oliver et al, J Clin Virol 2009; 46: S22-6）の予後の改善が期待できる。しかし6週間に及ぶ経静脈的治療は、患者・家族のQOLの低下に加えて、医療経済的負担も大きい。プロドラッグであるバルガンシクロビルの経口投与であれば外来加療も可能であるが（Kimberlin et al, 2008; 197: 836-45）、乳児に投与するための剤形はなく、その有効性や安全性に関するエビデンスは十分ではない。

B. 研究方法

厚生労働科学研究費・古谷野班の成果の一つとして発表した「先天性CMV感染治療プロトコール」（森内浩幸, 小児感染免疫 2010; 22: 385-9）に沿って加療された例、特にバルガンシクロビルによる治療例において、そのウイルス学的効果、臨床的効果、副作用の有無、血中濃度のデータをまとめた。

ウイルス学的効果判定には、全血中および尿中のCMVゲノムコピー数をreal-time PCRに

より定量した。

ガンシクロビル血中濃度の測定は、バルガンシクロビル投与開始5-7日の時点で実施した。投与後30分、90分、6時間、そして11時間の4点での採血を基本としたが、外来患者などで実施困難な場合は投与後90分と11時間の2点で採血した。液体クロマトグラフィー/タンデムマススペクトロメトリー法による測定は、田辺R&Dサービス分析化学部に依頼した。

（倫理面への配慮）

本研究は、長崎大学病院臨床研究倫理委員会および関連病院における倫理委員会で審査され承認を受けている。研究協力者には口頭と文書で説明し、文書で同意を得ている。

C. 研究結果

1. 自験例8名の成績

表1にバルガンシクロビルによる抗ウイルス療法を行い、その後半年以上の追跡調査が出来ている8例についてまとめた。

8例中3例において副作用（好中球減少）のため休薬が必要となったが、それ以外の副作用は認めなかった。

薬剤血中濃度に関しては、概ね期待通りの

Cmax 値が得られた一方でトラフ値のバラツキは大きかった。

ウイルス学的には 7 例でウイルス血症の消失が速やかに認められたが、1 例ではウイルス血症の軽減を認めたものの消失には至らなかった。

当初から聴力障害が認められていた 5 例も、聴力障害が認められていなかった 3 例も追跡調査の最終時点では治療開始時と比べほぼ不変（増悪は認めない）であった。1 例は投与中に聴力の改善が認められたものの、投与終了後に徐々に元のレベルに戻った。

2. 他施設例を含めた解析

全国の多くの施設でもバルガンシクロビルによる抗ウイルス療法が実施された。ウイルス学的効果が確認された 41 例中 36 例はウイルス血症の消失、5 例ではウイルス血症の軽減化を認めた。

規定の投与量・投与間隔に基づいてバルガンシクロビルの経口投与が行われた 48 例において、投与後 90 分のピーク値は平均 3.3 µg/mL であったが、0.715 ~ 6.849 µg/mL と症例によって大きく異なっていた（図 1）。

確認された中で一過性の好中球減少以外の副作用は認められなかった。

D. 考察

バルガンシクロビル投与は殆どの場合でウイルス学的に著効が認められ、問題となるような短期的副作用は生じなかった。血中濃度が症例毎に大きくばらついた理由は不明であり、施設間で調剤方法や投与方法に差違がなかったか検討していきたい。

また、バルガンシクロビル投与 6 週間と 6 か月とで有効性と安全性を比較検討した最近の研究において、後者は前者と比べ聴覚や発達の予後が有意に改善しており、副作用において大差なかったと報告されている。今後は 6 か月投与

もオプションに加えて検討を重ねる必要がある。

E. 結論

バルガンシクロビル投与は先天性 CMV 感染症に対する治療法として有効であり、短期的には安全に実施できた。しかし長期的な副作用の問題は今後もモニターしていく必要があり、また血中濃度のバラツキに関する検討も必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

①Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, Moriuchi H, Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T: Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers. *J Clin Virol* 58(2):474-478, 2013

②Koyano 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 Neonatal Ed* 98(2):F182, 2013.

③Torii Y, Kimura H, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H; for the Japanese Society for Pediatric Infectious Diseases. Clinicoepidemiologic status of mother-to-child infections: A nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J* 32(6):699-701, 2013.

④Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Narita A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi; for the Japanese Society for Pediatric Infectious Diseases. Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and

neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int* 55: 566-71, 2013.

⑤森内浩幸：教育講演 鶉の目鷹の目、フクロウの目ーサイトメガロウイルスを見逃すな！日本未熟児新生児学会雑誌 25: 7-12, 2013.

⑥森内浩幸：特集 いま知りたい！母子感染対策トキソプラズマ，サイトメガロウイルスを中心に 予防対策の基本 特にトキソプラズマ，サイトメガロウイルスの注意点. *助産雑誌* 67(7):530-538, 2013.

⑦森内浩幸：XⅢ. 先天性・母子感染症 TORCH 症候群. *日本臨牀 別冊新領域別症候群シリーズ感染症症候群 NO.25 (第2版) 下* : 659-668, 2013.

⑧森内浩幸：XⅢ. 先天性・母子感染症 先天性サイトメガロウイルス感染症. *日本臨牀 別冊新領域別症候群シリーズ感染症症候群 NO.25 (第2版) 下* : 679-685, 2013.

⑨森内浩幸：先天性サイトメガロウイルス感染症. (黒崎知道, 田原卓浩 (編): *プライマリ・ケアの感染症 身近な疑問に答える Q&A* : 168-169, 2013.

2. 学会発表

①Sakamoto et al, Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infections in children with autistic spectrum disorders by using preserved dried umbilical cord or dried blood spot samples. *Pediatric Academic*

Societies Annual Meeting. Washington DC, USA. May 4-7, 2013.

②石橋麻奈美ら. 先天性サイトメガロウイルス感染症に対する valganciclovir 治療の有効性と安全性の検討. 第49回日本周産期・新生児医学会学術集会. 横浜. 2013年7月14-16日.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

表 1. バルガンシクロビル療法を実施した自験例のまとめ

VGCV投与後の経過 (半年以上追跡調査できた自験例)								
症例	1	2	3	4	5	6	7	8
治療期間 <small>(特異抗原陰性)</small>	6週	5週*	6週	6週*	6週	6週*	6週	6週
Cmax	-	2.552	4.09	2.845	2.273	3.347	2.922	3.002
Trough値	-	0.152	0.831	1.12	0.167	<0.1	0.885	0.767
副反応	なし	好中球減少	なし	好中球減少	なし	好中球減少	なし	なし
ウイルス学的反応	有効	有効	有効	有効	有効	やや有効	有効	有効
終了後のリバウンド	なし	なし	なし	あり	あり	あり	なし	なし
臨床的なリバウンド	なし	なし	なし	眼底所見の悪化	なし	なし	なし	なし
現在	4Y8M	3Y5M	2Y9M	1Y8M	1Y5M	9M	9M	9M
精神運動発達遅滞	軽度	なし	軽度 (Down症)	中等度	軽度	なし	なし	なし
難聴の有無と治療後の変化	右側・不変	右側・不変	なし・不変	左側・不変	両側・不変	両側・不変	なし・不変	なし・不変

図 1. バルガンシクロビル療法を実施した自験例と他施設例のまとめ

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
森内浩幸	先天性サイトメガロウイルス感染症.	黒崎知道, 田原卓浩	総合小児医療：プライマリ・ケアの感染症 身近な疑問に答える Q&A	中山書店	東京都	2013	168-169

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ikuta K, Minematsu T, Inoue N, Kubo T, Asano K, Ishibashi K, Imamura T, Nakai H, Yoshikawa T, <u>Moriuchi H</u> , Fujiwara S, Koyano S, Suzutani T.	Cytomegalovirus (CMV) glycoprotein H-based serological analysis in Japanese healthy pregnant women, and in neonates with congenital CMV infection and their mothers.	J Clin Virol.	58	474-478.	2013
<u>Koyano S</u> , <u>Inoue N</u> , 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
Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H.	Clinico-epidemiological states of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan.	Pediatr Infect Dis J	32	699-701	2013

Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, Tanaka T, Tajiri H, Yoto Y, Tanaka-Taya K, Kanegane H, Nariai A, Sakata H, Tsutsumi H, Oda M, Yokota S, Morishima T, Moriuchi H	Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan.	Pediatr Int	55	566-571	2013
森内浩幸	教育講演 鵜の目鷹の目、フクロウの目ーサイトメガロウイルスを見逃すな！	日本未熟児新生児学会雑誌	25	7-12	2013
森内浩幸	特集 いま知りたい！母子感染対策トキソプラズマ，サイトメガロウイルスを中心に 予防対策の基本 特にトキソプラズマ，サイトメガロウイルスの注意点.	助産雑誌	67	5630-538	2013
森内浩幸	XⅢ. 先天性・母子感染症 TORCH症候群. NO.25 (第2版) 下	日本臨牀 別冊新領域別症候群シリーズ 感染症症候群	25 (第2版)	659-668	2013
森内浩幸	XⅢ. 先天性・母子感染症 先天性サイトメガロウイルス感染症.	日本臨牀 別冊新領域別症候群シリーズ 感染症症候群	25 (第2版)	679-685	2013

厚生労働科学研究費補助金
(平成 25 年度 成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)
(分担) 研究報告書

母子感染の実態把握及び検査・治療に関する研究
尿からの CMV DNA 直接検出に関する基礎検討：real-time PCR 法と LAMP 法の比較

(分担) 研究者 吉川 哲史 藤田保健衛生大学医学部、教授

研究要旨

サイトメガロウイルス (Cytomegalovirus: CMV) についての、診断、治療に関する技術開発ならびに実際の臨床応用に向けた橋渡し研究を行うことを目的として以下の検討を行った。先行する藤枝班、山田班の研究期間中に先天性 CMV 感染と診断された患児 11 名ならびに同胞 1 名から採取した尿 18 検体を用いて (患児保護者からの同意取得済み)、QIAamp DNA blood mini kit を使用して DNA 抽出した場合と、尿を直接検体として使用した場合で、real-time PCR 法と LAMP 法での CMV DNA 検出について解析した。その結果、予想通り LAMP 法では CMV DNA 陽性となっても、real-time PCR 法では陰性となる検体がみられた。よって、LAMP 法は尿から DNA 抽出することなく直接 CMV DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となりえると思われた。

A. 研究目的

TORCH 症候群 (トキソプラズマ、風疹、サイトメガロウイルス、ヘルペスの母子感染により発症する小児先天性疾患の総称) をはじめとした母子感染症は、中枢神経系、聴覚系、視覚系など多岐に渡る重篤な後遺症を来し、患児の生涯にわたり重大な問題となる。こうした後遺症は早期介入・治療により予後改善が可能であることが示されており、今後、予防、診断、治療の包括的な母子感染医療体制の構築が求められている。母子感染については研究レベルで新たな診断や治療技術が開発されてきているが、我が国の臨床医療技術としては導入されておらず、医療現場での混乱を来している。我々の施設では、特に頻度が高いサイトメガロウイルス

(Cytomegalovirus: CMV) についての、診断、治療に関する技術開発ならびに実際の臨床応用に向けた橋渡し研究を行う。

B. 研究方法

A. 新生児 CMV 診断開発と中央検査体制

① CMV 感染症の DNA 診断技術の体外診断用医薬品化に向けた開発：

(i) 前向き研究：実際に 1-3 歳の正常コントロール児 (肺炎・喘息等にて当院へ入院した患児) より尿・血液を採取して (通常診療)、血清学検査 (通常診療) を実施。採取血清、匿名化した臨床情報を当該施設へ送り、のちに得られた CMV DNA 検出 (研究行為) の結果との比較検討を行う。当院では検体採取し、臨床情報とともに

に藤田保健衛生大学で連結可能匿名化した後に、国立感染症研究所 (感染研)、岐阜薬科大学感染制御学研究室、名古屋大学ウイルス学研究室、共同研究企業に送付され CMV DNA 検出を行う。

(ii) 後向き研究：先天性 CMV 感染は頻度の少ない疾患であり、検査法の開発に十分な例数を確保することが困難であるため、先天性感染症例は先行研究班での新生児スクリーニング事業 (当科が該当) での先天感染が診断された児の保存されている保存検体 (尿) を感染研、岐阜薬科大学感染制御学研究室、名古屋大学ウイルス学研究室、共同研究企業に送り、CMV DNA 検出 (研究行為) を行う。

② 先天性 CMV 感染疑い症例の DNA 診断：

前向き研究：国内で先天感染が疑われる場合に検査を受け入れる施設がなく診断できる体制にないため、研究班として相談を受けた場合に Central Laboratory が検査を行い、診断可能な体制を作る。特にハイリスクである先天性難聴児での検査を呼び掛けて早期診断が可能な国内体制を作る。医師より文書により説明を受け保護者が文章にて同意した児の尿・血液を採取し

(通常診療)、連結可能匿名化した後、CMV DNA 検出による診断 (研究行為) を行う。本学ならびに本学関連施設で先天性 CMV 感染疑い児が発生した際、あるいは中部地区の医療機関から先天性 CMV 感染児疑い症例の相談を受けた場合には、当施設で臨床的問題に対する相談に応じるとともにウイルス学的解析を実施。③ 新規検査法の開発：ウイルス DNA 検査による迅速診

断法について技術開発を行う。これまでの研究成果を基に、先天性CMV患児尿を使った直接LAMP法によるウイルスゲノム迅速検出法の確立を進める。

B. 感染児レジストリ・治療薬開発・コホート調査

①前向き研究：感染児レジストリ：CMVとトキソプラズマの先天性感染と診断あるいは可能性が非常に高い児について国内の患者についてのレジストリシステムを作成し、母子感染の実態を把握するとともに、フォローアップを行い実態調査する。本研究班の中で先天感染として診断された児についても、同意を得られた児についてはレジストリに登録し、成長発達、合併症などについてフォローし（通常診療と同時実施の研究行為）、先天感染の病像を明かにする。

②前向き研究：先天性CMV感染コホートの予後調査：本邦で行われた先天性CMV感染の新生児スクリーニング検査で診断されたコホート群について、その予後調査を行う（研究行為）。

C. 検体使用なし：CMVとトキソプラズマの母子感染の国内相談体制：

①相談指針の作成：妊婦の感染の可能性がある場合に、医療機関からの相談を受けて適切な検査等について情報提供する。

1) 対象となる症例と検体：①- (i) 3歳以下の正常コントロール児（肺炎・喘息等にて当院へ入院した患児）から採取した尿(5ml)、血液(2ml)、①- (ii) 先行研究時に採取した先天性CMV患児尿(残余量)、②- (i) 関連施設での先天性CMV感染疑い児の尿(5ml)、血液(2ml)。

2) 期間：倫理委員会承認後～承認から5年後まで。

3) 目標症例数：

① 前向き研究：新生児・乳児 先天性CMV感染あるいは先天性トキソプラズマ感染が疑われる児（全体予定数年間200例X5年間 合計1000例；内 東大予定数年間50例X5年間 合計250例）特に除外基準なし（すべて倫理的な配慮を必要とする研究参加者（未成年者））

② コントロール症例（研究班全体100例）：当院分担症例は30例

（倫理面の配慮）

以下のような対策を講じ、本学倫理審査委員会で本研究計画を承認申請し、現在 revise を再申請中。

a インフォームドコンセント：①- (i) 3歳以下の正常コントロール児（肺炎・喘息等にて当院へ入院した患児）から採取した尿、血液：患児保護者に書面を用いて説明、同意を

得た後に検体採取する。尚、同意しないことにより診療上の不利益のないことを明示する。

①- (ii) 先行研究時に採取した先天性CMV患児尿：本学ならびに関連施設で先天性CMV感染が証明された患児から通常診療として採取された保存尿を用いるため、この場合検査制度管理目的等のために余剰検体が使用されることについての同意を得られている。

②- (i) 関連施設での先天性CMV感染疑い児の尿、血液：患児保護者に通常診療に必要な説明と同意を行った上で検体採取する。その他の研究内容については、ヒトからの検体採取、臨床情報を得るものではなくインフォームドコンセントについては該当しない。

b 個人への利益：①- (i) 研究でのコントロールとしての3歳以下の健康小児、ならびに①- (ii) に該当する先行研究時の先天性CMV患児については個人への利益はない。コントロール患者については通常の入院時検査の余剰検体を使用するため、対象者へのリスクはなく、不利益も微量な余剰検体採取に伴う極めて限定的なものと考えられる。

c 個人情報の保護については説明文書に記載。当院で採取した検体輸送に際しては、コード番号にて匿名化を図り、対照表を基に研究班班長のみ連結化が可能となるような形をとる。連結可能匿名化により個人情報を保護する。対照表は暗号化した上で、パスワードにて管理されたエクセルファイルにて管理する（研究責任者吉川哲史教授室内で施錠管理されたコンピューター）。検体輸送に際し、検体ラベルにはコード番号のみを記載し、別に保管した対照表を基に個人情報管理者：薬剤部鈴木竜太氏のみ連結化が可能となるような形をとる。中央に集積された検体、臨床情報はすべて、資料提供施設（東京大学を含む）において連結可能匿名化する。東京大学での資料の対応表・符号を付与した資料等の管理場所：東京大学医学部産婦人科生殖免疫研究室、東京大学医学部小児科研究室。責任を持って管理する研究従事者名 藤井知行（産婦人科）、岡明（小児科）。対応表はLANに繋がれていないパスワードロックのかかるスタンドアローンのパソコンに保管し、研究終了後は継続保存の同意が得られた場合を除き、データを削除する。

d.利益相反：本研究に係る全ての費用は厚生労働科学研究費で支払われる。利益相反はなし。

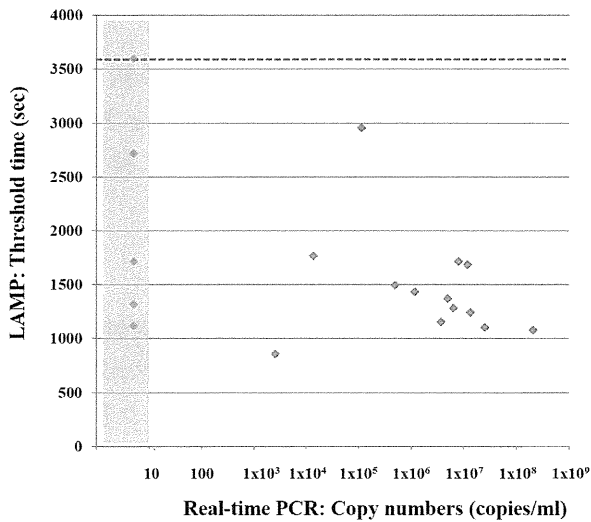
C.研究結果

1. 倫理審査：本学での研究実施のための倫理審査申請を行い、審査委員からのコメントを基に revise を作成し再審査中である。

2. 尿からの CMV DNA 直接検出に関する基礎検討：先行する藤枝班、山田班の研究期間中に本学並びに関連病院で先天性 CMV 感染と診断された患儿 11 名ならびに同胞 1 名から採取した尿 18 検体を用いて（患儿保護者からの同意取得済み）、QIAamp DNA blood mini kit を使用して DNA 抽出した場合と、尿を直接検体として使用した場合で、real-time PCR 法と LAMP 法での CMV DNA 検出について解析した。

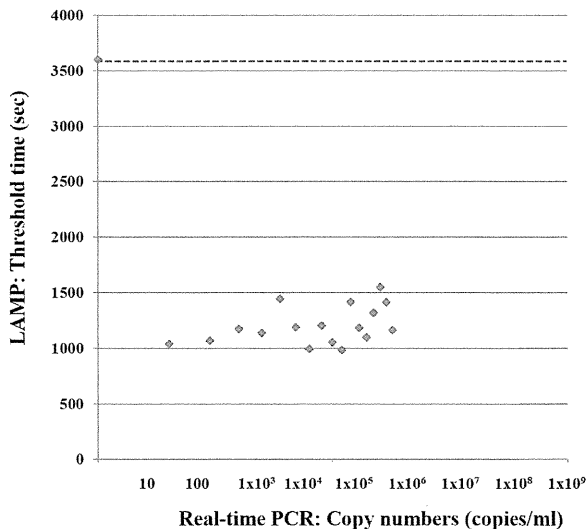
1) 直接法の場合の比較

網掛け部分の検体は LAMP 法では検出可能だが、real-time PCR 法では検出不可能。



2) DNA 抽出後の検体による比較

1 検体は両方法とも検出限界以下だが、その他の検体はいずれの方法でも検出可能。



D. 考察

班全体の研究の中で、当施設の担当部分に焦点を絞り倫理委員会へ申請し、委員からの指摘を基に revise を作成して再審査申請中。近日中に承認が得られると予想され、その後健康コントロール血清などの採取に着手する予定である。

尿からの DNA 抽出を省略したより簡便な先天性 CMV 感染診断法の確立をめざし、保存尿検体を使用して基礎検討を行った。対象検体数は少ないが、予想通り LAMP 法では CMV DNA 陽性となっても、real-time PCR 法では陰性となる検体がみられた。よって、LAMP 法は尿から DNA 抽出することなく直接 CMV DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となりえると思われる。多数例のスクリーニングには、real-time PCR 法のほうがすぐれていると考えられる。しかしながら、実際の臨床現場では先天性 CMV 感染疑いの症例は散発するため、LAMP 法によるより簡便、迅速な直接 DNA 検出法の有用性は極めて高いと思われる。これには、LAMP 法で使用する *Bst* ポリメラーゼが阻害物質に強いことが影響していると思われるが、今後血尿や蛋白尿などの影響に関する基礎的な検討を加え臨床応用へ向けたデータを蓄積してゆく必要がある。

E. 結論

LAMP 法では、尿から DNA 抽出することなく直接ウイルス DNA 検出が可能で、先天性 CMV 感染の迅速かつ簡便な診断法となり得る。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当せず

研究協力者

藤田保健衛生大学小児科 河村吉紀

母子感染患者のフォローアップとレジストリに関する研究

研究分担者：岡明 東京大学医学部小児科

研究協力者：岩崎博之 東京大学医学部小児科

研究要旨 母子感染の中でも頻度が高く臨床的にも問題である先天性サイトメガロウイルス感染症（先天性CMV）と先天性トキソプラズマ感染症（先天性トキソ）について、本研究班として診断を行った児を中心としてレジストリを立ち上げ、今後はコホート集団として経過を観察することとした。診断時に同意を得てレジストリへの登録を行い、標準的なフォローアッププロトコルを提示するとともに、分担研究者による十分な情報提供を行うこととした。最新の新たな診断方法等により診断される患者母集団が変化してきており、その自然経過を明かにするとともに、頭部MRIなどの新しい検査結果により知的発達などのハイリスクの児を早期発見し、将来的には治療に結びつけるためにもコホート集団として調査を行っていくことが重要である。

A. 研究目的

母子感染症は以前よりTORCH症候群として、胎児期から終生にわたる障害をきたす重要な病態として知られてきた。

A-1 先天性サイトメガロウイルス感染症（先天性CMV）の現状と課題

TORCH症候群の中でも先天性CMVは、最も頻度の高い先天感染症として知られている。ヒトはCMVウイルスの唯一の宿主であり、感染すると長期にウイルスを尿などに排出するために水平感染を起こしやすい。抗体を保有していても再感染や再活性化も起こるため、麻疹などの終生免疫を獲得する疾患とは異なり、成人でも感染者が多い疾患であり、妊婦が感染をした場合に胎盤を通じて胎児に移行することが知られている。

我々の厚生労働科学研究での新生児スクリーニング調査研究では先天性CMVの頻度は1人/300人であり、これは現在新生児スクリーニング診断が行われているクレチン症の10倍の頻度であった。（Koyano S, et al 2011）。年間100万人の新生児の中で、先天性CMVの児は3000～4000名が罹患していることとなり、大変に重要な問題となっている。

この先天性CMVは、最近以下の様な点で

特に注目をされている。

（1）先天性難聴の重要な原因：先天性CMVでは、内耳の内リンパ系にウイルスが侵入し上皮細胞に感染し迷路炎をきたした後に、内リンパ系を破壊する。その結果、難聴を来すことが知られている。先天性難聴に対しては、早期診断・療育の重要性が認識されてきており、その中でも先天性CMVの占める頻度が高いことが認識されてきている。現在、難聴については新生児聴覚スクリーニングが施行されているが、先天性CMVでは新生児期以降に難聴が進行することも知られており、難聴の診断上の課題となっている。

（2）診断法の進歩：母子感染症の診断は、例えばCMV等のウイルスについてはウイルス分離等の方法が教科書的には記載されているが、臨床上実際的に有用な方法とはなっておらず、臨床現場で診断されることは非常にまれであり、正確な診断は困難な状況であった。近年、ウイルスの核酸検査が行われる様になり、比較的容易に診断が可能となってきている。特にCMVについては尿中に血液中よりも多コピー数が分泌されることから、尿を用いたスクリーニング検査なども可能になってきており、我々の先行研究でも濾紙を用いた先天性CMVをスクリーニングすることが可能であった。