

201419062B

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究開発事業
(障害者対策総合研究開発事業 (感覚器障害分野))

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

平成 24-26 年度 総合研究報告書

研究代表者 岩崎 聡

平成 27 (2015) 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. 総合研究報告 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 岩崎 聡 (信州大学)	-----	5
III. 研究成果の刊行物一覧	-----	27
IV. 研究成果の刊行物一覧・別刷	-----	33

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 24-26 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
 (障害者対策総合研究開発事業 (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	客員教授
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. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金
障害者対策総合研究事業（障害者対策総合研究開発事業（感覚器障害分野））

総合研究報告書

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）

研究分担者

宇佐美 真一（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

塩沢 丹里（信州大学医学部産科婦人科）

小池 健一（信州大学医学部小児科）

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）

工 穰（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

茂木 英明（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

研究協力者

矢野 卓也（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

西尾 信哉（信州大学医学部耳鼻咽喉科）

大平 哲史（信州大学医学部産科婦人科）

稲葉 雄二（信州大学医学部小児科）

本林 光雄（信州大学医学部小児科）

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、感染児のうち約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。残りの約90%は無症候性であり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可能であると期待される。

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検査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カードと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、また、確立した検出系を用いて、長野県内の7産科施設との多施設共同前向きコホート研究を行い、4034例の解析を実施した。その結果8例（0.2%）よりCMVが検出された。また、難聴患者に占める先天CMV感染症の割合を明らかにする事を目的に難聴患者の保存臍帯を用いた検査を実施した所、351例中31例（9%）にCMVが見出された。一般のスクリーニングの頻度である0.2%と比較して約40倍の高頻度で検出された事からも難聴の主要な原因の一つになっていることが改めて明らかとなった。

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%に認められるとされる比較的頻度の高い先天ウイルス感染のひとつである。先天性サイトメガロウイルス感染を認める児のうち、おおよそ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ことより、症候性先天性サイトメガロウイルス感染症と診断される。一方、残りの約90%は無症候性の先天サイトメガロウイルス感染であり、出生時には無症状であるが、その内

約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。

近年の新生児聴覚スクリーニング検査の普及により、先天性に難聴を有する児に関しては早期に発見が可能となったが、遅発性、進行性に難聴を発症するケースでは、新生児聴覚スクリーニング検査において難聴を認めず、通常難聴児よりも発見・介入ともに遅れることが問題となっている。

特に、先天性サイトメガロウイルス感染症の遅発性・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いるため、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法の確立により、症状の重篤化を予防することが期待されている疾患のひとつである。

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を開発するとともに、その有効性を明らかにすることを目的として、長野県内7施設との多施設共同前向きコホート研究をおこなった。また、マス・スクリーニング検査により先天性サイトメガロウイルス感染陽性となった児に対するフォローアッププランを小児科および耳鼻咽喉科の連携により作成した。

また、反対方向のアプローチとして、難聴患者に占める先天 CMV 感染症の割合を明らかにする後ろ向きコホート研究として、乾燥保存臍帯を用いた CMV DNA 検査を実施し、難聴児における先天サイトメガロウイルス感染症児の頻度に関して検討を行い、難聴児における先天サイトメガロウイルス感染症児の割合とその臨床的特徴を明らかにする事を目的に研究を行った。

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26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351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としては、比較的保存性の高いサイトメガロウイルス 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、Thermo Fisher Scientific 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。

本研究ではマス・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。具体的には、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 10 年間保管可能である。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) 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

本研究の目的である新生児を対象とした先天性サイトメガロウイルス感染のマス・スクリーニングを行うためには、多数の検体を効率よく検査可能な非常に高いスループットの検査系を確立する必要がある。本研究により確立した FTA カードによるサンプル採取と TaqMan assay を組み合わせた新しいマス・スクリーニング系を用いて、長野県をモデルにマス・スクリーニングの前向き多施設共同コホート研究を行った。

本研究では、長野県内の主要産科施設

9施設のうち、信州大学医学部附属病院、松本市民病院、諏訪赤十字病院、丸の内病院に加え、新たに飯田市立病院、篠ノ井総合病院、北信総合病院の合計7施設で多施設共同コホート研究を行った。(長野県においては、7施設で長野県全体の新生児数の約80%をカバーしており、地域差の少ない悉皆性の高い検討を行う事ができたと考えられる)。

ガスリー検査実施時に同時に血液サンプルを滴下したFTAカードを洗浄後、そのまま鑄型に用い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(前年度までの検討より5%程度の偽陰性があるため、4重測定を行い見逃しを減らすよう配慮した)。定量PCR測定にはStepOne Plus (Thermo Fisher Scientific)を用いた。また、鑄型DNAが正しく得られているか、また、その定量コントロールとして、ヒトゲノム上の*GJB2*遺伝子に対するTaqMan Probeも用意し同時に計測を行うことでDNAが得られている確認のためのコントロール検査も同時に実施した。

4) マスクリーニング後の診察フローチャートの作成およびフォローアップ

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、本研究では前年度までに小児科および耳鼻咽喉科を主体に確立した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に従い、マス・スクリーニング後の陽性例に対するフォローアップを実施した。また、陽性例に対しては、定期的に血中CMV濃度の測定を行い、コピー数の変化についても検討を行った。さらに、治療効果および副作用に関して十分な説明の上、書面で同意の得られた症例を対象にガンシクロビルの全身投与あるいはバルガンシクロビルの経口投与を行うとともに定期的にCMVのコピー数計測を行う積極的治療を実施した。

5) 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

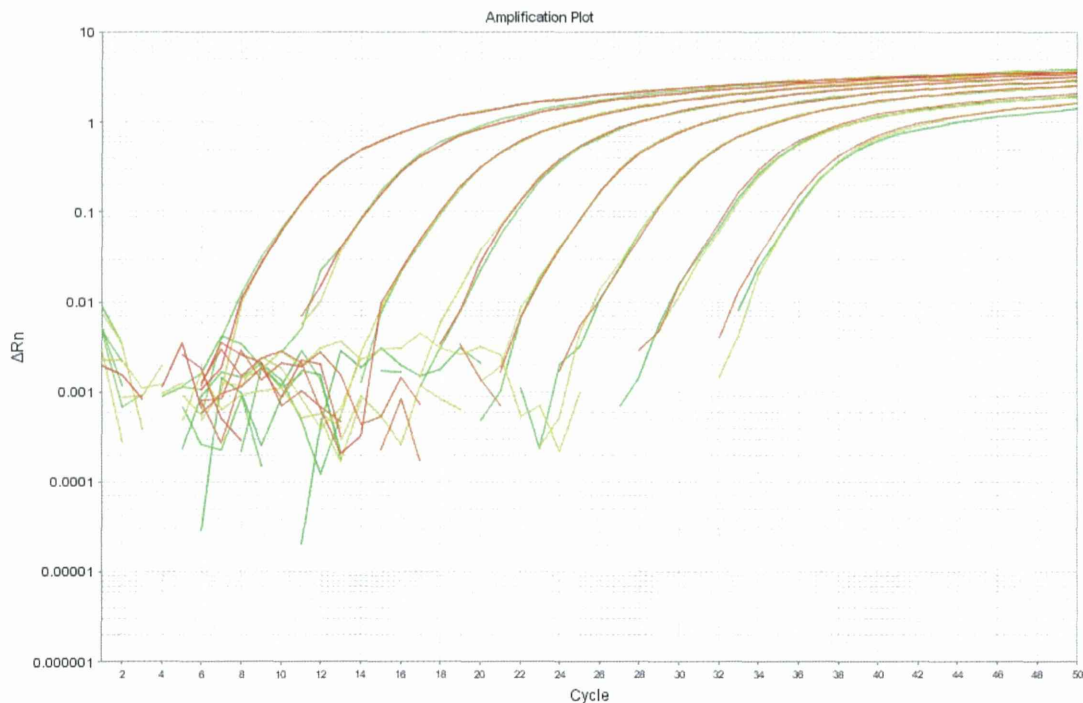


図 1 陽性コントロールオリゴヌクレオチドを用いた定量試験の結果
10 倍希釈系列のサンプルの 3 重測定の結果を示す。ダイナミックレンジも広くまた誤差も非常に少ない検出系を構築した。

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、BigDye Terminator v1.1 (Thermo Fisher Scientific) を用い直接シークエンス法により配列決定を行った。直接シークエンスには ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific) 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。

(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

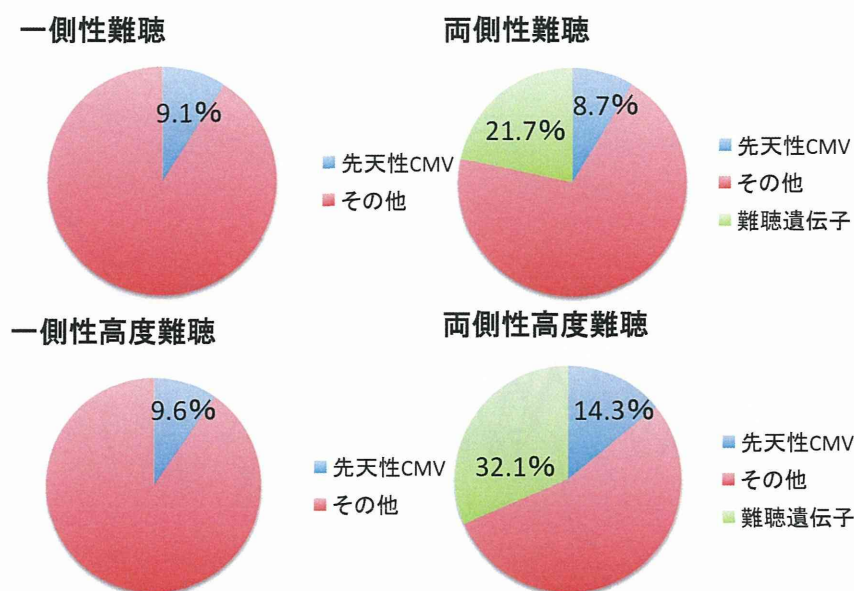


図1 難聴患者に占める先天 CMV 感染症の割合 (岩崎ら 2014)

難聴患者における先天性の一側性難聴患者の割合を明らかにする事を目的に、311 例の保存臍帯を用いた先天 CMV 感染症の検査を実施した。その結果、一側性難聴、両側性難聴のいずれのケースにおいても約 9%に先天 CMV 感染が認められた。また、重症度に関しては、両側高度難聴の場合にやや先天 CMV 感染症児の割合が多い事が明らかとなった。

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、難聴患者に占める先天 CMV 感染症の割合およびその臨床的特徴を明らかにする事を目的に保存乾燥臍帯を用いた先天 CMV ウイルスの解析を実施した。本年度は前年度までに引き続き、一側性難聴患者および両側性難聴患者を対象に昨年度

までに収集していた試料に本年度新たに収集した試料を加え合計 351 例より保存臍帯の提供を受けて、CMV DNA の検出を試みた結果 31 例 (9.0%) より CMV DNA を検出した。

詳細に見て行くと、両側性難聴群、一側性難聴群ともに約 9%の児より CMV DNA が検出された。また、同じ両側性難聴でも、難聴の程度が高度以上の群では 14.3%と頻度が高いことが明らかとなった。一方、一側性の高度難聴以上の群では 9.6%と全体と比較して検出率に大きな差は認められなかった (図2)。

この結果は、マス・スクリーニングにより明らかとなった健常児における先天性サイトメガロウイルス感染症児の割合

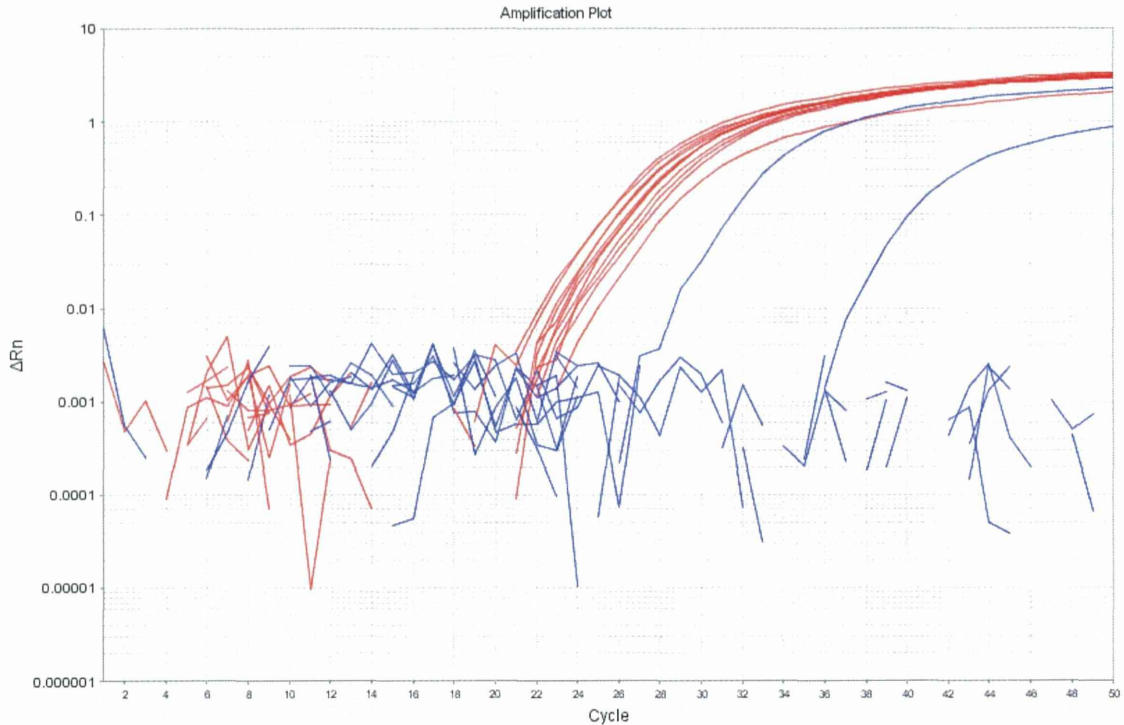


図2 FTAカードを用いたCMVスクリーニング検査の例

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量が同程度である事を示す。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、青色右側はマスキングにより検出された陽性症例を示す。

（後述）0.2%と比較すると、一側性難聴児、両側性難聴児とも、サイトメガロウイルス感染を認める児の割合が約40倍高率であることが明らかとなったことより、先天性サイトメガロウイルス感染症が難聴の重要な原因となっていることが改めて明らかとなった。また、先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴であることが明らかとなった児のうち2例は系か観察期間中に急激に難聴が増悪し、両側ろうとなった症例を経験し、サイトメガロウイルス感染症による難聴では急激な増悪の可能性が考えられる。今後、このような症例に対しては治療法として

ガンシクロビルの有効性を検討することが重要であろう。

2) FTAカードを用いた先天性CMV感染症マスキング検査手法の確立に関する研究

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程度の感度（尿サンプルを用いた場合の1/500程度）となる事が報告されている。しかし、マスキングの手法としては、全新出

生児を対象に本研究のためだけに尿サンプルを採取することが困難である事、尿サンプルに胎便が混入して検査不能となる例が 30%程度に認められることなどから、全新出生児において新生児尿を検体として使用することは実質上困難である。

そこで、本研究では、全新出生児の受診する先天性代謝異常症のマス・スクリーニング検査（ガスリー検査）の際に、併せて血液検体を採取する手法を検討した。本手法はそもそも全例実施するガスリー検査に併せて血液サンプルの採取を行うため、採取時の手間や収集率に関しては非常に効率的であることが期待される。特にガスリー検査で用いる通常ろ紙から抽出される DNA の品質による問題点を一部解決することを目的に、ガスリーろ紙より高品質な DNA サンプルが簡便に得られる FTA カードを用いるマス・スクリーニングシステムを検討した。

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 3）。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

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 感染症マススクリーニング検査

前項の方法により確立した FTA カードを用いたハイスループレットのマス・スクリーニング系がうまく機能することを確認することを目的に長野県内をモデルにパイロット研究として、信州大学医学部附属病院、松本市民病院、諏訪赤十字病院、丸の内病院、飯田市立病院、篠ノ井総合病院、北信総合病院の合計 7 施設の産科、小児科、耳鼻咽喉科の連携によりマス・スクリーニングとその後のフォローアップを開始した。

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。現在までに 4,034 例の解析を実施したうち、実際に FTA カードで陽性と判断された 16 例のうち保存臍帯サンプルの得られた 15 例について再検査を行った所、8 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。また、長野県における先天サイトメガロウイルス感染症児の割

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 1 マス・スクリーニング検査により先天サイトメガロウイルス感染の明らかとなった児に対するフォローアッププラン

先天サイトメガロウイルスに対するマス・スクリーニング検査において陽性となった児に対しては、保存臍帯を用いた確認検査を行った。確認検査においても先天サイトメガロウイルス感染陽性となった児に対しては、先天サイトメガロウイルス感染症により引き起こされる種々の疾患に対して、小児科、耳鼻咽喉科が連携して検査を行うとともに、1ヶ月健診時から5歳まで定期的にフォローアップ検査を行い、継続的に経過を捉えるプランを確立し、実際に陽性となった児に対してフォローアッププランに従った検査をおこなっている。

また、保護者に対して治療効果および副作用に関して十分な説明の得られた児に対して、表 2 に示す方法により、ガンシクロピルの全身投与あるいはバルガンシクロピルの経口投与による治療を実施している。治療に際しては週に1回の頻度で血中のサイトメガロウイルスのコピー数を測定するとともに、肝機能のモニタリングを行い副作用を軽減するように努め実施した。

合は、8例／4034例（0.2%）であり、ほぼ同程度の先天サイトメガロウイルス
本邦における過去の報告である 0.3%と 感染症児がいることが明らかとなった。

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。

4) マスクリーニング後の診察フローチャートの作成およびフォローアップ

本研究では、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して、症候の有無にかかわらず、定期的にフォローアップするためのフォローアップ手法に関して、小児科および耳鼻咽喉科を主体に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（表1）。

フォローアッププランでは、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つを定めた。また、協力医療機関を含め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、各施設において説明を実施した。また、症候群性・非症候群性も含め CMV 陽性例に関しては、実際にフォローアップにプランを活用し、その有効性と問題点に関して更なる検討を行っている。

また、先天 CMV 感染による種々の症状を抑制する事を目的に、ガンシクロビルによる治療が小児科を中心に行われており、その有効性を確認する事を目的に、血液中の CMV のコピー数の測定も併せて実施している。その結果 CMV が 2,000 コピー/ul 程度であったものが、2週間後に約 200 コピー/ul、4週間後に 15 コピー/ul と大幅に減少している事を確認できており、モニタリングに有用であることが改めて確認された。

5) 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。

6) 先天性サイトメガロウイルス感染症児の脳機能イメージング

当施設で人工内耳埋込術を実施した先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴児を対象に、PET を用いた脳機能イメージング解析を実施した。症例は 2 例とも両側性の中等度難聴で補聴器を装着していたが、難聴が増悪して人工内耳となった例である。この 2 例を対象に、中枢症状が無いことを確認するとともに、聴覚活用度合いを明らかとする事を目的に読話 (読唇) 課題を負荷した際の脳機

能イメージング解析を実施した。その結果、FDG-PET では極端な低代謝領域は認めず、形態のみならず機質的にも脳機能障害が無いことが確認された。また、読唇刺激負荷を行った際には、視覚刺激

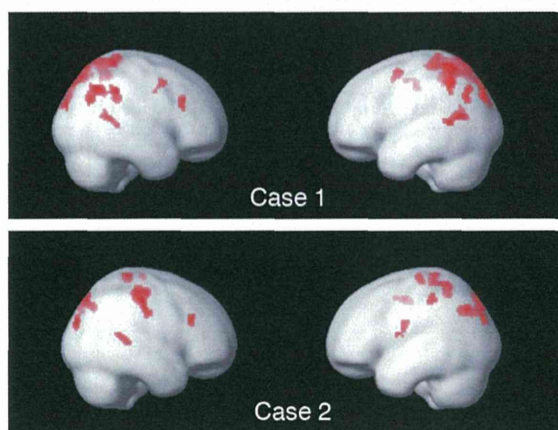


図4 先天 CMV 感染による小児難聴症例の読唇課題実施時の脳機能イメージング (Moteki et al., 2014)

両側性、進行性の難聴を呈した先天性 CMV 感染による難聴症例の人工内耳装着前に実施した読唇課題実施時の脳機能イメージングの結果 (健康コントロールとの差分領域) を示す。

健康コントロールと比較して、極端な低代謝領域が無いことが分かる。また、視覚刺激にも関わらず、上側頭回 (ウェルニッケ野) で活性化が認められるパターンとなっていた。この代謝パターンは先天の重度難聴者に多く認められるものであり、難聴が比較的早期より進行していた可能性を示唆するものであった。

であるにも関わらず 2 例とも上側頭回 (ウェルニッケ野) に活性化領域を認めた。この特徴は、先天の重度難聴児で視覚刺激を活用する児に共通してみられる特徴であり、本症例においても難聴が比較的早期より進行していた可能性を示唆するものである。なお、2 例とも人工内耳装着が 5 歳 5 ヶ月、4 歳 9 ヶ月と比較的遅かったこともあり、装着後の成績は

WISCIII の VIQ でそれぞれ 84 点、56 点であった。今後さらに症例を重ねて検討を行う必要がある。

D. 考察

本研究では、スループットに優れたマス・スクリーニング法として、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した。

特に本年度は前年度までに確立された検出系を用いて、4,034 例の解析を実施したうち、実際に FTA カードで陽性と判断された 16 例のうち保存臍帯サンプルの得られた 15 例について再検査を行った所、8 例で保存臍帯でも陽性であることが確認された (0.2%)。長野県において実施した多施設共同前向きコホート研究の結果認められた先天サイトメガロウイルス感染児の割合は本邦における過去の報告である 0.3%とほぼ同程度の先天サイトメガロウイルス感染症児がいることが明らかとなった。

また、陽性となった児に対しては、前年度までに作成したフォローアッププランに基づきフォローアップ中である。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、難聴患者に占める先天 CMV 感染症の割合を明らかにする事を目的に、311 例の保存臍帯より抽出した DNA を用いて同様の解析を行った。その結果、28 名 (9.0%) 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 of 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、マススクリーニ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。

このように、3 年間の研究機関を通じてマス・スクリーニングにより早期に先天性サイトメガロウイルス感染のある児をピックアップし、適切な医学的評価、また、必要に応じてガンシクロビルなどの治療へとむすびつける事が可能となった。しかしながら、遅発性に症候の出現する例も報告されているため、研究期間としては、3 年間で終了するものの、今後 5 年間のフォローアップを継続的行うとともに、実際に治療を行った児の予後に関しても定期的に報告を行って行く計画である。

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スクリーニングとして 4032 名の新生児のスクリーニング検査を実施し、8 例の先天サイトメガロ感染児をピックアップすることが出来た。また、これらの児に対しては小児科および耳鼻咽喉科の連携により定期的にフォローアップを行っている。さらにまた、難聴患者における先天 CMV 感染症児の割合が約 10%程度であることを見出した。以上のように 3 年間の研究期間を通じて、マス・スクリーニングシステムを開発し実用化することができた。しかしながら、遅発性に症候の出現する例も報告されているため、研究期間としては、3 年間で終了するものの、今後 5 年間のフォローアップを継続的行うとともに、実際に治療を行った児の予後についても定期的に報告を行って行く計画である。また、現在、長野県の県単独自業として、ガスリー検査に追加検査項目として追加する形で本研究の成果を社会還元する方向での打ち合わせをおこなっており、今後も発展的に事業を継続する計画である。

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*

[6] 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.

[7] 小川 洋 サイトメガロウイルス感染症とサイトメガロウイルスワクチン、耳鼻咽喉科頭頸部外科 84 (2) 137-142, 2012

[8] サイトメガロウイルス感染と周産期医療 Fetaql&NeonatalMedicine Vol.4 No.2

[9] 岩崎聡、古舘佐起子、西尾信也、矢野卓也、茂木英明、工 穰、宇佐美真一：一側性難聴児における先天性サイトメガロウイルス感染症の関与. Otol JPN 23: 848-853. 2013

[10] 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 34:644-649. 2013

[11] Iwasaki S, Usami S. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. INTECHchapter1: 1-15. 2013

[12] Moteki H, Suzuki M, Naito Y, Fujiwara K, Oguchi K, Nishio S, Iwasaki S, Usami S. Evaluation of cortical processing of language by use of

positron emission tomography in hearing loss children with congenital cytomegalovirus infection. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 78: 285-289. 2013

[13] Van de Heyning P. Adunka O. Arauz S. L. Atlas M. Baumgartner W. D. Brill, S. Bruce, I. Buchman C. Caversaccio M. Dillon M. Eikelboom R. Eskilsson G. Gavilan J. Godey B. Green K. Gstoettner W. Hagen R. Han, D. Iwasaki S. Kameswaran M. Karltorp E. Kleine Punte A. Kompis M. Kuthubutheen, J. Kuzovkov, V. Lassaletta L. Li Y. Lorens A. Manikoth M. Martin J. Mlynski R. Mueller J. O'Driscoll M. Parnes L. Pillsbury H. Prentiss S. Pulibalathingal S. Raine C. H. Rajan G. Rajeswaran R. Riechelmann H. Rivas A. Rivas J. A. Senn P. Skarzynski P. H. Sprinzl G. Staecker H. Stephan K. Sugarova S. Usami S. Wolf-Magele A. Yanov Y. Zernotti M. E. Zimmerman, K. Zorowka P. Skarzynski H. Standards of practice in the field of hearing implants. Cochlear Implants Int 14: 1-5. 2013

[14] 岩崎 聡：新しい人工聴覚. 耳喉頭頸 86:20-24. 2014

[15] 岩崎 聡：あらたな人工内耳の展開.