

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390182

研究課題名（和文） 先天性サイトメガロウイルス感染症の実態調査に関する研究

研究課題名（英文） A study about the incidence of congenital cytomegalovirus infection in Japan.

研究代表者

宮川 広実 (MIYAGAWA HIROMI)

大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任研究員

研究者番号：10346207

研究成果の概要（和文）：先天性サイトメガロウイルス感染症（CMV）のスクリーニングに用いるため、ろ紙血から CMV DNA を検出する LAMP 法の系を確立できた。この LAMP 法と nested PCR 法を用いて約 1000 例の新生児に対して先天性 CMV 感染症のスクリーニングを行ったところ、3 例の不顕性感染症児を診断できた。

研究成果の概要（英文）：we have established rapid method to screen for congenital cytomegalovirus infection using loop-mediated isothermal amplification of DNA extracted from filter paper containing dried blood.

We screened about 1000 neonates and confirmed three asymptomatic infected neonates. This method is sensitive and more cost effective than the nested PCR method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3200000	960000	4160000
2008 年度	2300000	690000	2990000
2009 年度	2600000	780000	3380000
年度			
年度			
総計	8100000	2430000	10530000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・公衆衛生学・健康科学

キーワード：母子保健、胎内感染、サイトメガロウイルス

## 1. 研究開始当初の背景

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は、母親が妊娠中に CMV 感染を受けると胎児が感染し、難聴や精神運動発達遅延等の永続的な障害や血小板減少、肝機能異常などを認める疾患である。CMV はヘルペスウイルスの一種であり一旦感染すると体内に潜伏するため、妊娠を契機に体内の CMV が再活性化

し、胎児に感染を引き起こすこともあるが、もっとも問題になるのは、妊娠中に母体が初感染を受けることである。日本では妊婦の CMV 抗体陽性率が高く妊娠中の初感染は少ないとされてきた。しかし近年の報告によると妊婦の抗体陽性率は約 70%まで低下しており、特に 20 歳代の妊婦では 60%以下にまで低下している。欧米などの先進国ではすでに

妊婦のCMV抗体陽性率は40から50%と低く、CMVは胎内感染の原因微生物の第一位で、全出生の0.5から3%が先天性CMV感染症であることがわかっている。今後日本でも同様に増加が懸念される疾患であるが、全国的な調査は少なく、1992年から1993年に森田らによって行われた症候性先天性CMV感染症の報告(Acta Paediatr Jpn., 1998)では、その発生頻度は100,000出生に1.6と非常に低いものであった。我々が平成14年から17年にかけて日本未熟児新生児学会の新生児稀有疾患サーベイランス事業としておこなった全国調査でも、届出のあった症例は、3年間で37例のみであった。報告が少ない理由として、学会に所属している医師がいる医療機関のみが対象であるため国内の全ての事例を把握できていないこと、症状をもとにしたサーベイランスで、典型的な症状をもった重症な症例のみしか報告されていないということがあげられた。先天性CMV感染症は症状が多彩で、胎内感染をうけても出生時には症状がみとめられない不顕性感染であることも多く、積極的なウイルス学的診断がなされない限り診断することが難しい。しかし、出生時にあきらかな症状を呈していなくてもその後難聴などの神経症状が認められる進行性の症例が約10%存在する。これらの症例は、後にCMVの感染が明らかになっても、血清抗体価や血中尿中ウイルスの存在から先天感染であるか、出生後の感染であるかを区別することが難しく確定診断に至らないため、先天性CMV感染症に関する実態の把握を困難にしている。我々はこれらの事例に対し、出生時にすでに感染があったことを明らかにするため、保存臍帯(へそのお)を用いてCMVDNAの検出を試みた。原因不明の発達遅延や、難聴があった小児に対し、臍帯のDNA検索を行ったところ、41例の小児のうち、14例でCMVDNAが陽性であった。この結果からみても、実際には、報告されている以上の先天性CMV感染症が発生していることが示唆され、実態調査が急務であると考えた。またKimberlinらは、先天性CMV感染症児に乳児期早期から抗ウイルス剤による治療をおこなうことで、難聴などの神経症状の予後が改善することを明らかにしており(J Pediatr. 2003)出生後早期に診断をおこなうことは、個々の症例の予後のためにも非常に大切なことである。そこで我々は新生児期に、先天性CMV感染症のスクリーニング検査を行うことが必要であると考えた。しかしながら診断方法として元来行われていたウイルス分離法は、検出までに数週間必要で、非常に手間もかかることからスクリーニングには適していない。そこでBarbiらが2000年に報告したろ紙血からDNAを抽出し、nested PCR法を用いてCMVDNAを検出する高感度な方法を

用いることとした。採血機会はほぼ100%の新生児が受検している先天性代謝異常症のマススクリーニング(ガスリー検査)の機会を利用した。これにより大阪府内の3施設で出生した1,176人の新生児を対象にした検査で、先天性CMV感染症であると診断された児は2例であるという結果を得た(J Med Virol. 2006)。診断された2例は不顕性感染であった。

この調査の結果、先天性CMV感染症児が少なからず出生していることが明らかとなり、日本における発生率の実態とその予後の調査が早急に必要で、より多くの新生児を対象にしたマススクリーニングを行うべきであるという考えに至った。

## 2. 研究の目的

(1)発生率や予後の調査のため、先天性CMV感染症を診断するよりも、簡便かつ安価なスクリーニングに適した方法としてLAMP法を開発する。

(2)その手法を用いて新生児に対する先天性CMV感染症のスクリーニングを行い、日本における発生率の実態を把握する。先天性感染症であることが診断された児はウイルス学的神経学的なフォローを行い、適切な医療支援を行う。

(3)不顕性感染症児を含めた、先天性CMV感染症を診断することで、その後症状を呈する児と、不顕性のまま問題なく経過する児のウイルス学的な相違を検討する。

## 3. 研究の方法

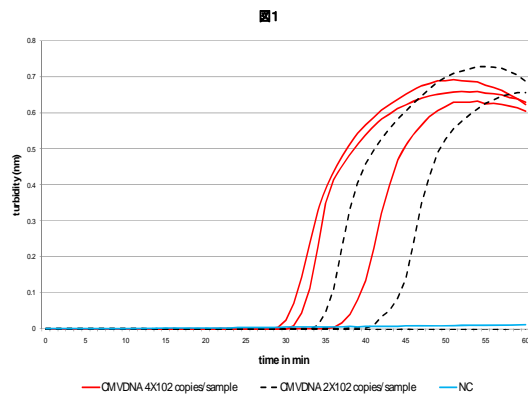
(1)ろ紙血からCMVDNAが検出できるLAMP法を開発し、臨床検体における感度、特異性について詳細に検討し、臨床応用が可能なことを確認した。

(2)nested PCR法およびLAMP法を用いた新生児に対する先天性CMV感染症のスクリーニングを大阪府内の2医療機関において施行した。検査の機会は新生児代謝異常症のマススクリーニング検査(ガスリー検査)時を利用し、保護者の同意を得た上で、ろ紙に採血を行った。検体は大阪府立公衆衛生研究所に搬入され、CMVDNAの検出を行った。

結果を希望する保護者には1ヵ月健診時に担当医から結果を知らせた。CMVDNAが陽性で、先天性CMV感染症と診断され、保護者の同意が得られれば、新生児に対する定期的なフォローを行った。

## 4. 研究成果

(1)DNA polymerase領域を標的としたLAMP法の系を開発しその検出感度は $2 \times 10^2$ copies/sample(図1)で、nested PCRに比較するとやや検出感度は劣るものの、臨床応用が可能であった。



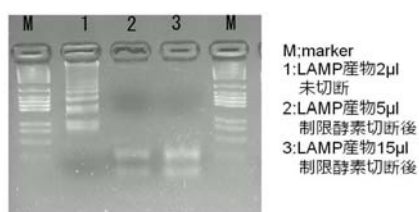
(2)この方法を用いて平成19年から20年度にかけて約1100例の新生児に対して行ったスクリーニングの結果、3例の先天性CMV感染症を診断した(表1)。LAMP法の特異性は良好でnested PCR法と一致した結果が得られ、現在論文を投稿中である。

BW (g) \ GA (週)	GA (週)				計	CMV陽性
	<30	30~<35	35~<40	>40		
<1000	1				1	0
1000~<1500	5	14			19	0
1500~<2000		30	10	0	40	0
2000~<2500		10	115	8	133	0
2500~<3000		2	313	103	418	2
3000~<3500			221	206	427	1
>3500			32	58	90	0
計	6	56	691	375	1128	
CMV陽性	0	0	3	0	0	

表1

(3)しかしながら、臨床検体をスクリーニングする上で、現行のLAMP法では非特異的な増幅が問題となることがあり、特異増幅の判別法について検討した。具体的には、まず増幅産物中に含まれる制限酵素切断部位で切断後、産物を泳動し増幅産物が均一な断片に切断されていることを確認する方法を検討した。既知の陽性検体においてLAMP反応を行った後にAciIとPstIで切断した産物を電

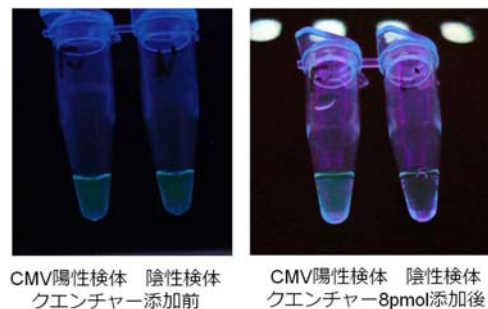
図2



気泳動した結果、均一な断片に切断されていることが確認でき(図2)、この方法は有用であった。

さらに、電気泳動を行うことなく、特異的増幅と非特異的増幅を裸眼で迅速に判別する方法を検討した。これは蛍光ラベルしたループプライマーを用いて増幅反応を行った後、クエンチャーラベルした相補的な配列のプライマーを添加する方法(K. A. Curitisら, 2009)である。特異的増幅ではなかった場合には、蛍光ラベルしたループプライマーが反応液中にフリーで存在するため、クエンチャーラベルした相補的な配列のプライマーと結合して蛍光が消失するが、特異的増幅の場合には、蛍光は消失しないので判別を行うことができる。陽性コントロールと陰性コントロールでの検討結果、至適添加濃度を決定でき、蛍光の消失での判別が確認できた(図3)。よって、今後は前述の方法により、より確実かつ迅速診断が可能となる。

図3



### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計12件)

- ①宮川広実、予防接種の最近の話題、小児保健研究、査読無、69(2)、214-216、2010.3
- ②山崎謙治、中田恵子、依田知子イムノクロマト法によるノロウイルス胃腸炎診断の有用性 臨床病理、査読無、57(10) 961-964、2009
- ③田口真澄、神吉政史、依田知子、河合高生、川津健太郎、山崎歩、坂田淳子、原田哲也、勢戸和子、久米田裕子 2006-2008年に大阪府で発生したSalmonella Enteritidis食中毒事件. 病原微生物検出情報、査読無、2009(8), (Infectious Agents Surveillance Report, IASR) p7-8、2009
- ④Tomoko Yoda, Yasuhiko Suzuki, Kenji Yamazaki, Naomi Sakon, Masashi Kanki, Tetsuo Kase, Kazuo Takahashi, and Kiyoshi Inoue, Application of a Modified Loop-Mediated Isothermal Amplification Kit for Detecting Norovirus Genogroups I

and II, , J. Medical Virology 査読有 81, 2072-2078, 2009

⑤Kurata T, Miyagawa H, Furutani E, Kase T, Takahashi K, An outbreak of measles classified as genotype H1 in 2008 in Osaka Prefecture. Jpn J Infect Dis. 査読有, 628(1), 76-77, 2009

⑥Basu Dev Pandey, Ajay Poudel, Tomoko Yoda, Aki Tamaru, Naozumi Oda, Yukari Fukushima, Binod Lekhak, Basista Risal, Bishnu Acharya, Bshwa Sapkota, Chie Nakajima, Tooru Taniguchi, Benjawan Phetsuksiri and Yasuhiko Suzuki, Development of an in-house loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and evaluation in sputum samples of Nepalese patients. J. Medical Microbiology, 査読有 57, 439-443, 2008

⑦宮川広実、予防接種と子供の健康、助産師、査読無、(日本助産師会機関誌)、62(3)、32-34、2008

⑧宮川広実、麻疹サーベイランスの現状と今後、大阪公衆衛生、査読無、79、16-18、2008

⑨宮川広実、サイトメガロウイルス感染症、総合臨床、査読無、56、898-902、2007

⑩宮川広実 田口真澄ほか 17 名、大阪府における麻疹の流行状況 病原微生物検出情報、査読無、(Vol.28 p 254-255 : 2007 年 9 月号)

⑪宮川広実、浅井定三郎、ほか 16 名、大阪府の麻疹報告事例に対する追跡調査結果 大阪小児科医会会報、査読無、2007 年 7 月、No142、P13-17

⑫ Hidetoshi Taniguchi, Ikuko Mohri, Hitomi Okabe-Arahoru, Kosuke Aritake, Kazuko Wada, Takahisa Kanekiyo, Shuh Narumiya, Masahiro Nakayama, Keiichi Ozono, Yoshihiro Urade, and Masako Taniike , Prostaglandin D<sub>2</sub> Protects Neonatal Mouse Brain from Hypoxic Ischemic Injury The Journal of Neuroscience 査読有, April 18, 2007, 27(16):4303-4312

[学会発表] (計 7 件)

①宮川広実、ワクチンで予防可能な疾患の現状について、第 17 回豊中市医師会小児科医会、2010 年 2 月 27 日、豊中

②宮川広実 大阪府における新型インフルエンザの現状 第 184 回大阪小児科学会、2009 年 12 月 5 日、大阪

③柳本嘉時、道之前八重、井崎和史、内田賀子、大坪麻、柴田真理、高瀬俊夫、宮川広実、角膜内皮炎を合併した先天性サイトメガロウイルス感染症に対してガンシクロピルの全身投与と点眼によって治療を行った極低出生体重児の一例、第 53 回日本未熟児新生

児学会学術集会、2009 年 12 月 1 日、横浜

④伊橋舞、三好洋子、山本威久、下辻常介、宮川広実 HHV6 integration の一例 第 41 回日本小児感染症学会、2009 年 11 月 14 日、福井

⑤宮川広実、地方感染症情報センターにおける取組み、第 68 回日本公衆衛生学会自由集会「感染症情報の現状と展望を考える会」、2009 年 10 月 22 日、奈良

⑥宮川広実、先天性サイトメガロウイルス感染症のスクリーニングにおける LAMP 法の有用性について第 40 回小児感染症学会、2008 年 11 月 15 日、名古屋

⑦宮川広実、高橋和郎ほか 10 名、第 66 回日本公衆衛生学会総会ポスター発表、大阪府の麻疹 2 次調査報告大阪府立公衆衛生研究所 2007 年 10 月 25 日 松山

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮川広実 (MIYAGAWA HIROMI)  
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任  
研究員  
研究者番号：10346207

### (2) 研究分担者

依田知子 (YODA TOMOKO)  
大阪府立公衆衛生研究所・感染症部・主任  
研究員  
研究者番号：20250318

和田和子 (WADA KAZUKO)  
大阪大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：30294094  
(H19→H20: 連携研究者)