

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月8日現在

機関番号：17301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591185
 研究課題名（和文） 先天性サイトメガロウイルス及びHHV6感染のインパクト：
 長崎県コホート研究
 研究課題名（英文） Impact of Congenital Cytomegalovirus and Human Herpesvirus-6
 Infections: A Cohort Study in Nagasaki Prefecture
 研究代表者
 森内 昌子 (MORIUCHI MASAKO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：60322301

研究成果の概要（和文）：

長崎県内で生まれた、または里帰り分娩の後で県内に戻ってきた乳幼児で、両側性高度感音性難聴、先天性水頭症、West症候群、広汎性発達障害を呈した症例を登録し、乾燥保存臍帯または先天代謝異常スクリーニング濾紙血検体を取り寄せてDNAを抽出しreal-time PCRでサイトメガロウイルス（CMV）およびヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）DNAの検索を行った。広汎性発達障害児2名を含め、これらの障害児の一部からCMV DNAが検出されたが、HHV6 DNAは検出されなかった。

研究成果の概要（英文）：

We have registered infants and toddlers who were born or lived in Nagasaki Prefecture with any of the following medical problems: bilateral profound sensorineural hearing loss, congenital hydrocephalus, refractory epilepsy (mostly, West syndrome) and pervasive developmental disorder (PDD).

We collected their dried umbilical cord or dried blood spot specimens for detection of cytomegalovirus (CMV) and human herpesvirus-6 (HHV-6) DNA. We could demonstrate congenital CMV infection in some of those infants including two children with PDD; however, HHV-6 DNA was not detected from any of those specimens.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

先天性CMV感染は、生まれつきの中枢神経障害の原因として先進国の多くでDown症候群に匹敵するインパクトを持っている。

ただし、先天性CMV感染の疫学には地域差（人種や社会経済的要因による違い）がみられ、有効な対策を立てるにはそれぞれの地域での実態を知ることが求められる。

私達が2001-03年にかけて長崎県内の妊婦のCMV感染の血清疫学調査を行ったところ、抗体陽性率は87%で日本の他の地域（例えば札幌では67%）や先進諸国（30~60%）と比べ高率であった。しかし妊娠中の初感染率は0.74~1.5%と決して低くなかった。

先天性CMV感染の重要性が認識されない理由は、出生時に既に症候性である場合も保険適応のある診断法（CMV-IgMの検出）の感度が低いことに加え、生後すぐには無症候性のことも多く、後に様々な形で発症した時点では病原診断が困難なため見過ごされている例が非常に多いことが上げられる。

近年先天代謝異常スクリーニング濾紙血検体や臍帯を検体とすることで、生後長期間が経過した後でも先天性CMV感染の診断が可能になってきた。

私達は、難聴のみを障害として特殊教育を受けている長崎県立聾学校生徒を対象に、臍帯を用いて先天性CMV感染の後方視的調査を行ったところ、12%の症例で感染が証明された。これらの症例は全く先天性CMV感染が疑われていなかったことから、実際に多くの症例が見過ごされていることは明らかである。さらに私達は、同様の手法により、難聴以外の障害においても、高率に先天性CMV感染の証拠を見出している。例えば、広汎性発達障害（自閉症スペクトラム）の小児29名の調査では、2名（7%）で先天性CMV感染が診断されている。

現在、厚生労働科研費研究班「全新生児を対象とした先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染スクリーニング体制の構築に向けたパイロット調査と感染児臨床像の解析エビデンスに基づく治療指針の基盤策定」の活動の一環として前方視的調査を実施中であり、長崎市内で総計3,000出生分のスクリーニングが行われる。2009年10月の時点で約2,400検体中7例（0.3%）の先天性CMV感染が同定されている。

一方、ヒトヘルペスウイルス6型（HHV-6）は、ウイルス学的にはCMVと類縁のものであり、先天性感染を起こすことが報告されているが、その実態はよくわかっていない。

2. 研究の目的

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染による健康被害（特に中枢神経障害）は、患者や家族のQOLを著しく下げ社会経済的に大きな負担を与える。先進国では先天

性の中枢神経障害の原因として Down 症候群と並び最も多いと考えられている。しかしながら本邦における実態は不明であり、そのため予防や早期診断や早期介入のために有効な対策を立てることができない。その理由の一つは、遅発性障害が出現した時点では先天性感染の診断が下せないことである。前方視的調査は実態を把握する上で有効な手段だが、先天性感染児の出生は約0.3%でその20%程度にしか発症しないので、相当規模で実施しない限り全体像を捉えることはできない。

そこで、前方視的調査と併行して、より広い地域を調査対象とした後方視的調査（症状のある小児を対象として先天性CMV感染を後方視的に診断する）を行い、その実態を把握する。

3. 研究の方法

本研究は（壱岐・対馬地方を除く）長崎県全域を対象としたコホート研究である。

長崎県下の様々な中枢神経系障害を有する小児は、それぞれの障害を専門に扱っている全県的な診療チームまたは研究チームが核となって登録され、疫学的臨床的特徴を入力する。

□

先天代謝異常スクリーニング濾紙血や臍帯を用いて先天性ウイルス感染を後方視的診断する。

□

同時進行している前方視的研究（新生児マスキング事業パイロット研究）のデータと照合し検討解析する。

□

長崎県内の先天性CMVまたはHHV-6感染の頻度およびその健康被害の実態を明らかにする。

1) 患者登録

*グループA：①高度両側性感音性難聴、②先天性水頭症、③難治性てんかん

*グループB：④広汎性発達障害 [自閉症スペクトラム]、⑤精神運動発達遅滞

① 長崎県下では重症両側性感音性難聴の小児は、長崎小児難聴研究会（長崎大学医学部耳鼻咽喉科教授 高橋晴雄、長崎県立聾学校 田中英雄、長崎大学医学部小児科教授 森内浩幸ら）のメンバーで把握されており、全症例が登録される。

② 長崎県下では殆ど全ての先天性水頭症は胎児エコーにより生前診断され、長崎大学医学部産婦人科（増崎英明教授）と国立病院機構長崎医療センター産婦人科（安日一郎部長）の元に母体搬送され、両施設との共同研究体制（長崎県先天性水頭症研究チーム）で全症例が登録される。

③ 長崎県下の小児難治性てんかん症例は、長崎小児神経懇話会（事務局：長崎大学小児科医局）で登録され、治療方針について話し合われている。特に本研究では West 症候群や Lenox-Gastaut 症候群に焦点を当て、全症例を登録し検討していく。

④および⑤ 長崎県下では長崎県立子ども医療福祉センターおよび長崎県自閉症・発達障害支援センターを中心に、複数の施設で自閉症や発達障害児のスクリーニング、診断、療育等の活動に当たっている。これらの施設において診断された全症例を登録するとともに、無作為に抽出し、かつ保護者からの同意が得られた小児についてウイルス学的検索を行う。

2) ウイルス学的検索

検体の収集：長崎大学医学部倫理委員会に承認を受けた形式に則り、文書と口頭での説明の上で同意書を取り、長崎県総合保健センターに保管されていたガスリー試験紙および/又は家庭に保管されている臍帯を取り寄せる。

DNA の抽出：検体間の cross-contamination を避けるためにカッターナイフの清潔な刃を検体毎に替えて、濾紙血の場合は一辺約 3 mm 大の正方形 3 個分を、臍帯の場合は 30 mg 程度の断片を取り分ける。QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN)を用いて DNA を抽出する。

CMV および HHV-6 DNA の検出と定量：Taqman probe 法による real-time PCR によって検体中の CMV および HHV-6 の DNA コピー数を調べる。QuantiTect®Probe PCR Kit (QIAGEN)によって反応を組み立て、iCycleriQ Real-Time Detection System (Bio-Rad)を用いて増幅と解析を行う。同じ検体について、β-globin 遺伝子のコピー数も real-time PCR によって測定して検体中の細胞数を算定し、検体間の比較のための標準化を行った。

3) 疫学臨床的データとウイルス学的データ

の照合と解析

疾患群①-⑤のそれぞれについて、得られた疫学臨床的データとウイルス学的データを照合し、これらの疾患群における先天性 CMV または HHV-6 感染の頻度を求め、さらにこれらの先天性ウイルス感染が後方視的に診断された症例の疫学的臨床的特徴の有無を解析していく。

加えて、H22 年度で第一期が終了する予定の厚生労働科研費研究班「全新生児を対象とした先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染スクリーニング体制の構築に向けたパイロット調査と感染児臨床像の解析エビデンスに基づく治療指針の基盤策定」で得られる長崎県における先天性 CMV 感染の頻度とこの前方視的研究で発見された先天性感染児の臨床像を合わせて解析することで、両者の弱点（本申請課題は大きなコホートを扱うことができるが後方視的な調査である⇔厚労科研費研究は前方視的研究であるがコホートのサイズが小さい）をお互いに補って、長崎県における先天性 CMV 感染の実態を明らかにすることができる。

4. 研究成果

現時点までに登録され、検索が行われた検体は以下の通りである。

1) 両側性高度感音性難聴

平成21-23年度にかけて約40名の両側性難聴児が見つかっている。このうち高度感音性に相当するものの最終確認が行われている。この他、他の県で里帰り分娩した後長崎県に戻ってから高度感音性難聴が判明した児2名について、先天性CMV感染が確定している。HHV6 DNAは検出されていない。

2) 先天性水頭症

平成21-23年度にかけて約20名の先天性水頭症の患者が登録された。現在までに検査を行うことができた10名のうち1名に先天性CMV感染が確定している。HHV6 DNAは検出されていない。

3) 難治性てんかん

過去にWest症候群として登録された患者のうち協力の得られた患者5名について検討し、先天代謝スクリーニング濾紙血または臍帯を入手して検索したところ、2名からCMV DNAが検出された。HHV6 DNAは検出されていない。

4) 広汎性発達障害

長崎県立子ども医療福祉センターおよび長崎県自閉症・発達障害支援センター、さらに長崎市障害福祉センターの協力により、32名

の広汎性発達障害児の保護者から同意を得て、先天代謝スクリーニング濾紙血検体または臍帯を入手し、29名分についてDNAを抽出し検索を行ったところ、2名からCMV DNAが検出された。HHV6 DNAは検出されていない。

5) 精神運動発達遅滞

全県的な協力体制の元に、前方視的および後方視的な研究のプロトコールが完成し、着手するところである。

以下、最も詳細に検討することができたPDDについて概要を述べる。

長崎市とその近郊の医療・療育機関で広汎性発達障害と診断を受け外来・通園フォロー中の患児で、保護者から同意を得ることができた29例を対象とした。これらの対象について、新生児マススクリーニング検査で使用した残りのガスリー用紙濾紙血（長崎県総合保健センターにて保存）もしくは出生後に脱落した臍帯（家庭にて保存）（平成12年12月以後に出生かつ県内の施設で出生した児はガスリー用紙で、それ以外の児は臍帯で行った）を取り寄せ、CMVおよびHHV-6 DNAの検出を試みた。

以下の2例からCMV DNAを検出することができたが、HHV-6 DNAが検出された例はなかった。

症例1) 2001年生まれの女兒

家族歴：特記事項なし

周産期母体合併症：特になし

出生時の状況：在胎38週、2554gにて出生、帝王切開、仮死なし、光線療法なし、その他周産期異常なし

診断までの経過：頸定3か月、寝返り6か月、歩行1歳、初語2歳、人見知り7か月。1歳半より言語の遅れについて家族が気になっていたが1歳半健診は受診していない。2歳9か月時、市保健センターに相談後、ハートセンター受診（2歳10か月）。けいれん既往なし。

所見：視線合いにくい、クレーンハンドあり、手かざしあり、場面に応じた発語はあり、文字が好きでひらがな、カタカナ、アルファベットを読む、マイペース、自傷行為あり。コミュニケーション不良、こだわり、常同運動、手をかざす。Eye contactなし。情緒交流乏しい。聴力障害なし。

診断時の発達指数：60（新版K式）（認知・適応：72、言語・社会：49）

脳画像検査：未施行。脳波：異常なし。

診断名：自閉性障害（DSM-IV）

症例2) 2001年生まれの男児

家族歴：特記事項なし

周産期母体合併症：

出生時の状況：在胎40週、3404gにて出生、仮死なし

発達歴：頸定3か月、以後運動発達は順調、2歳で初語、3歳で2語文。3歳頃から新奇場面でパニックを起こし、コミュニケーション不良、感覚過敏がみられた。4歳4か月時に初診。けいれん既往なし。聴力障害なし。

診断時の発達指数：84（遠城寺式）（移動運動88、手の運動104、生活96、対人関係55、発語81、言語理解81）。

6歳時の発達：田中ビネー IQ94

6歳11か月時の心の論理：課題パス
現在普通学級に通い適応良好で療育は終了している

脳画像検査：未施行。脳波：未施行。

診断：アスペルガー症候群（DSM-IV）

今回の研究でPDD症例29例のうち2例にCMVのDNAが検出された（6.9%）。一方、長崎市とその近郊で2008年から2010年に出生した新生児で、尿からCMVが検出されたのは3230例中10例であった（0.31%）。ここで帰無仮説を「先天性CMV感染症の発症に広汎性発達障害児と健常児では差はない」、対立仮説を「広汎性発達障害児は健常児に比べて有意に先天性CMV感染症が多い」とし、カイ二乗検定を行うと有意水準5%の範囲（ $p = 0.004$ ）で帰無仮説が棄却され対立仮説が採択された。

このように、PDDとして管理されている子どもの中に、有意に高い確率で先天性CMV感染児が含まれていることから、PDDの成因の一つとして先天性CMV感染の関与が示めされた。さらに、その他には全く異常を認めることなく、PDDだけを臨床像とする先天性CMV感染症があることを示唆している。

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9件）

1. Tagawa M, Minematsu T, Masuzaki H, Ishimaru T, Moriuchi H.

Seroepidemiological survey of cytomegalovirus infection among pregnant women in Nagasaki, Japan. *Pediatr Int*. 査読有、vol.52, 2010, pp459-462

2. Kawatani M, Nakai A, Okuno T, Kobata

- R, Moriuchi M, Moriuchi H, et al. Detection of cytomegalovirus in preserved umbilical cord from a boy with autistic disorder. *Pediatr Int*. 査読有 vol.52, 2010, pp304-307
3. 森内昌子, 森内浩幸. 話題の感染症：母子感染するウイルスー共生か矯正か. *モダンメディア*, 査読無, 56巻, 2010, pp153-158
 4. 森内昌子, 新時代のワクチン戦略について考えるーヘルペス・サイトメガロウイルス. *日本臨床*, 査読無, 54巻増刊号別冊, 2010, pp1400-1406
 5. 森内昌子, 森内浩幸. ウイルス性母子感染症. *化学療法の領域*. 査読無, 26巻, 2010, pp.2353-2362.
 6. Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, (他5名), 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 multicenter study. *BMJ Open* 査読有, 2011; 1: 000118.
 7. 森内昌子, 森内浩幸. 気をつけなければならない小児感染症の管理、最近の考えは？先天性サイトメガロウイルス感染症. *小児科臨床*. 査読無, 64巻, 2011, pp.2575-2581.
 8. Koyano S, Moriuchi H, (他3名, 4番目): Newborn screening of congenital cytomegalovirus infection using saliva can be influenced by breast feeding. *Arch Dis Child Fetal Ed*, 査読有, vol.98, 2013, F182.
 9. Moriuchi H (他3名, 1番目) Mother-to-child transmission of human T-cell leukemia virus type I. *Pediatr Infect Dis J*, 査読有, vol.32, 2013, pp.175-177.

[学会発表] (計5件)

1. Moriuchi M, Sakamoto A, Motoyama K, Matsuzaki J, Moriuchi H. A retrospective diagnosis of congenital CMV infection in Japanese children with pervasive developmental disorders using dried umbilical cord. 3rd Congenital CMV Conference 2010, 2010年9月23-25日, パリ (フランス)
2. Moriuchi H, (他10名). A multi-center study on the treatment of congenital CMV in Japan. 3rd Congenital CMV Conference 2010, 2010年9月23-25日, パリ (フランス)
3. Motomura H, Miyakawa M, Moriuchi M, Yoshino H, Yoshida LM, Minematsu T, Tho LH, Ariyoshi K, Anh DD, Moriuchi H. A birth cohort study on congenital cytomegalovirus infection in Khanh Hoa Province, Vietnam. *Pediatric Academic*

- Societies/ Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting, 2011年4月30日-5月1日, デンバー (USA)
4. Moriuchi M, Moriuchi H. Mother-to-child transmission of cytomegalovirus and human T-cell leukemia virus. *Pediatric Academic Societies/ Asian Society for Pediatric Research Joint Meeting*, 2011年4月30日-5月1日, デンバー (USA)
 5. Moriuchi H, (他3名). Clinicoepidemiological states of congenital cytomegalovirus infection: a nationwide survey in Japan. 4th Congenital CMV Conference. 2012年10月29日-11月2日. サンフランシスコ (USA).

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)
該当なし
- 取得状況 (計0件)
該当なし

[その他]

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森内 昌子 (MORIUCHI MASAKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60322301

(2) 研究分担者

森内 浩幸 (MORIUCHI HIROYUKI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90315234