

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17日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22791034

研究課題名（和文）

先天性サイトメガロウイルス感染が顕性感染へと至るリスク判定法の開発

研究課題名（英文）

Analysis of risk factors to be symptomatic congenital cytomegalovirus infection

研究代表者

生田 和史（IKUTA Kazufumi）

研究者番号：60512184

研究成果の概要（和文）：

サイトメガロウイルス（CMV）gH 領域について型特異的リアルタイム PCR 法を開発し、厚生労働科学研究によって同定された先天性 CMV 感染児について検討した。血清抗体型 (serotype) では両型が検出される例（重感染）であっても感染児尿中に存在するウイルス型 (genotype) は片型のみであり、先天性 CMV 感染を起こしているウイルスは両型ではないことがわかった。異型 CMV の重感染でも先天性 CMV 感染が起こされることを詳細に解明した。

研究成果の概要（英文）：

We established Cytomegalovirus (CMV) strain-specific real time PCR, and found that only a single genotype determined by CMV gH neutralizing epitope was found in the urine from neonates with congenital CMV infection, even though the case possessed antibodies against multiple CMV strains. Our results showed that CMV reinfection also caused congenital CMV infection.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成22年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成23年度	500,000	150,000	650,000
平成24年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：先天感染、サイトメガロウイルス、血清疫学、ELISA 法、リアルタイム PCR 法

1. 研究開始当初の背景

「先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染は妊娠中の CMV 初感染が原因である」と長らく考えられてきた。しかし、CMV には血清型とも呼ぶべき多型が存在し、妊娠中に中和できないタイプの CMV に重感染することも原因になりうる（New Eng J Med, 2001）。一方、先天性 CMV 感染の 80% は不顕性感染であるが、発症に至る感染と、不顕性に終わる感染とを見分ける危険因子

は全く解っていない。このことが 300 の出生に 1 名存在する、頻度の高い本感染の発症予防策を考えるうえでの大きな障害となっている。

我々の研究室では、血清抗体価から感染しているウイルスの型を判別できる ELISA 法を既に開発していた（Clin Infect Dis, 2007）。しかし血清学のみでは現在感染しているウイルスを解析するに不十分である。ウイルス型を判別できるリアルタ

イム PCR 法を開発すれば、感染した新生児が実際に尿中に排泄している CMV の DNA 量を型別に検出・定量することが可能であると仮定した。先天性 CMV 感染例の感染様式を明らかにし、感染様式と発症との関係を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

(1) 感染している CMV の血清型を判別できる ELISA 法の開発

中和抗体のエピトープはウイルス表面に存在する糖タンパク B (gB) と H (gH) に存在するが、このエピトープにウイルス株間で多型が存在し、AD169 型と Towne 型に大別できる。このエピトープを大腸菌で発現させ、ELISA の抗原として用いた。この ELISA を使って抗体を検出することによって、CMV 感染の有無のみならず、感染しているウイルスのタイプを判別できるようになった (Clin Infect Dis, 2007, Microbes Infect, 2008)。これを利用して、先天性 CMV 感染児における型別抗体から重感染の有無を判別する。

(2) 尿中の CMV DNA 量を型別に検出・定量できるリアルタイム PCR 法の開発

上記領域でリアルタイム PCR を行い、型別に特異的なプローブでの検出を行う。実際に排泄されているウイルスの型を判別し、定量出来る系の確立を目指す。排泄されているウイルスが血清型と一致するか否か、重感染の場合はどちらのウイルスが、どのくらいの量で排泄されているのかを検討する。

(3) 特異的 IgG サブクラス (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) 別の抗体を検出できる ELISA 法の開発

先天性 CMV 感染で CMV 特異的 IgM が検出できないのは、i) 感染時期が早く、IgG にクラススイッチしたためか、ii) 免疫寛容によって胎児が抗体を産生しないことが原因と考えられる。IgG のサブクラス別の抗体を検出する。胎盤を移行しやすいのは IgG₁>IgG₃>IgG₂>IgG₄、成人の血清中の量は IgG₁>IgG₂>IgG₃>IgG₄ の順である。母親と新生児の抗 CMV IgG 抗体をサブクラス別に検出、比較検討し、新生児が産生した IgG 抗体を母体からの移行抗体と区別し、顕性感染に認められる特徴を探る。また健常妊婦においてサブクラス別の抗体検出を行い、CMV gH 抗体が移行抗体として機能しうるのか否かを確認する。

CMV は人種を問わず、約 300 人に 1 人という頻度で先天性感染を引き起こし、その 10 人に 1 人は出生時に異常が気づかれる症候性感染である。さらに、出生時に異常は指摘されないものの、後に精神発達遅滞

や聴覚障害と診断されるものが 10%程度いる。我々の調査では、1000 人に 2~3 人いる聴覚障害者の 15%は先天性 CMV 感染が原因であり (J Infect Dis, 2007)、欧米からの報告では、精神発達遅延の原因の第一位が先天性 CMV 感染であるという。先天性 CMV 感染は人類に多大な健康問題を起こしているにもかかわらず、小児科医や産婦人科医ですら認識は低い。その原因は感染者である妊婦や胎児、新生児に対する予防的な治療法がないことにつきる。新たな治療法を開発を阻む理由は、感染の 80%が不顕性感染であり、感染者全員に適応できる安価で安全な治療法を開発はあまりにもハードルが高いことにある。本研究によって発症リスクの予測ができれば、発症予防対策の大幅な進展が望める。

3. 研究の方法

サイトメガロウイルスの型別 ELISA 法、型別ウイルス DNA 測定法 (リアルタイム PCR 法)、特異的 IgG サブクラス (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) 別の抗体検出 ELISA 法を開発する。得られた結果を臨床症状と比較し、顕性感染へのリスクを探る。型別 ELISA 法は CMV 型特異的な遺伝子領域を大腸菌内で発現させた抗原により行う。二次抗体を変える事により、IgM、IgG、さらに IgG においてはサブクラス別の測定を行う。型別リアルタイム PCR 法は同領域において型別 TaqMan プローブを作製することにより行う。

(1) CMV 血清型別 ELISA 法の改良

既に開発済みの CMV 血清型別 ELISA 法をもとに、IgG サブタイプ (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) 別の抗体価の測定系も作製する。作製した系を用いて、健常人、先天性 CMV 感染児で測定を行う。

(2) CMV 血清型別リアルタイム PCR 法の開発

ELISA 法で標的としている遺伝子領域においてリアルタイム PCR を試み、型特異的な TaqMan プローブにより、型別に CMV DNA を定量検出する。

(3) 臨床検体の解析

健常妊婦、先天性 CMV 感染児の例数を積み重ねる。経時的な臨床症状との比較検討を行う。

4. 研究成果

健常妊婦 344 人における CMV 抗体保有率 (市販キットを使用) は 68%であり、我々の ELISA 法で型別抗体保有率を調べた結果、AD169 型が 41%、Towne 型が 18%、重感染が 6%であった (表 1)。二次抗体を変更することにより IgG 抗体のサブタイプ別検出を行った結果、gH に対する抗体は IgG₁ と IgG₃ に偏っており、これ

らはともに胎児に移行抗体として運ばれうるサブタイプであった。胎児における感染防御を担っていることが示唆された (図 1)。

CMV Serostatus n=344	Positive:233 (68%)				Negative:111 (32%)
	AD:96 (41%)	To:42 (18%)	AD+To:13 (6%)	ND:82 (35%)	
IgG					
gH Serotypes n=233					

表 1. 健常妊婦における型別 CMV IgG 抗体の保有率 (J Clin Virol, in submission)

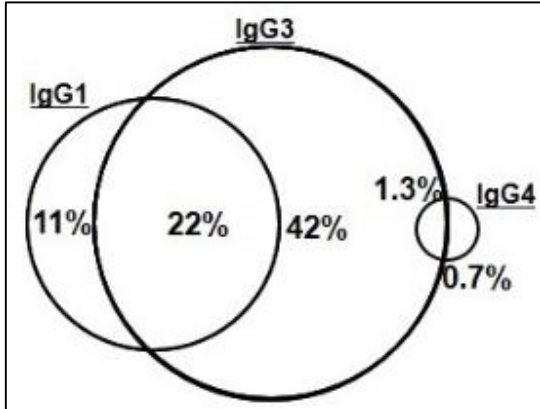


図 1. 健常妊婦における抗 CMV gH IgG のサブタイプ (J Clin Virol, in submission)

先天性 CMV 感染において、顕性感染では移行抗体となりえない IgG サブタイプに偏りがあると仮定して検証を行ったが、顕性感染へのリスク因子として見出すには至らなかった。

また本研究では CMV 型を判別できるリアルタイム PCR 法を開発した (J Clin Microbiol, 2012)。AD169 と Towne の CMV DNA を用い、両者が 100 倍未満のウイルス量比で混在している場合は少数側の CMV 型も定量可能であることを確認した (表 2)。

Expected AD169 copies	Mixed Towne copies		
	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
10 ⁷	1.08(±0.07)x10 ⁷	1.07(±0.01)x10 ⁷	1.23(±0.09)x10 ⁷
10 ⁶	0.95(±0.01)x10 ⁶	1.12(±0.02)x10 ⁶	1.19(±0.15)x10 ⁶
10 ⁵	0.42(±0.01)x10 ⁵	1.34(±0.01)x10 ⁵	0.90(±0.04)x10 ⁵
10 ⁴	undet.	1.13(±0.09)x10 ⁴	1.24(±0.07)x10 ⁴
10 ³	undet.	0.65(±0.13)x10 ³	1.08(±0.12)x10 ³
10 ²	undet.	undet.	1.33(±0.21)x10 ²

Expected Towne copies	Mixed AD169 copies		
	10 ⁷	10 ⁵	10 ³
10 ⁷	0.83(±0.01)x10 ⁷	1.04(±0.04)x10 ⁷	1.00(±0.01)x10 ⁷
10 ⁶	3.73(±0.01)x10 ⁶	1.02(±0.18)x10 ⁶	1.10(±0.21)x10 ⁶
10 ⁵	4.78(±0.61)x10 ⁵	1.08(±0.24)x10 ⁵	0.80(±0.12)x10 ⁵
10 ⁴	undet.	0.58(±0.04)x10 ⁴	0.77(±0.05)x10 ⁴
10 ³	undet.	undet.	0.71(±0.08)x10 ³
10 ²	undet.	undet.	1.27(±0.31)x10 ²

表 2. CMV 型特異的リアルタイム PCR の感度 (J Clin Microbiol, 2012)

厚生労働科学研究 (平成 20-22 年) により

23,757 例の出生児について尿中 CMV スクリーニングが行われ、73 例の先天性 CMV 感染が同定された (うち顕性感染は 17 例)。同意と母児検体の得られた 21 例 (うち顕性感染は 1 例) について検討を行った。血清 CMV IgG 型と尿中 CMV DNA 型を判定した。3 例では血清 CMV IgG 型判定ができなかった。母児ともに AD169 型 IgG であるのは 12 例、Towne 型 IgG は 4 例であり、尿中 CMV 型は血清型と同じであった。これらは妊娠中の初感染または再活性化であると考えられる。片型 CMV に感染している例が大半ななか、両型 CMV に感染している 2 例を見出した。1 例 (ID:22383) は母児ともに両型の血清 CMV IgG 抗体を有しており、他の 1 例 (ID:71306) では母親が両型、児が Towne のみの血清 CMV IgG 型を有していた。開発した CMV 型特異的リアルタイム PCR 法により尿中 CMV 型を定量解析した結果、前者 (ID:22383) が AD169 型のみ、後者 (ID:71306) が Towne 型のみであった (表 3)。PCR 産物をシーケンスしても同じ結果であり、PCR 産物から 50 クローン以上を作成しても、単一の CMV 型しか確認されなかった。血清中に両型 CMV 抗体を有する例においても、尿中 CMV 型は 1 種類であることが分かり、血清学的に重感染であっても体内で増殖している CMV は片型である可能性が示唆された。前者 (ID:22383) では、当初認められていた 2 つの型 (AD169 型と Towne 型) の CMV 抗体のうち一方 (Towne 型) が生後 1 か月以降消失した。尿中ウイルスが 1 種類 (AD169 型) であることから、消失した抗体は移行抗体であったと考えられる (表 4)。

ID		IgG			IgM	CMV in urine
		CMV	AD	To		
13618	Mother	-	-	-	-	
	Neonate	+	+	-	-	AD
19369	Mother	-	-	-	-	
	Neonate	+	+	-	-	AD
20400	Mother	+	+	-	+	
	Neonate	+	+	-	+	AD
31694	Mother	+	+	-	+	
	Neonate	+	+	-	+	AD
20620*	Mother	-	-	-	+/	
	Neonate	+	+	-	+	AD
82715	Mother	-	-	-	+/	
	Neonate	+	+	-	-	AD
83641	Mother	+	+	-	+/	
	Neonate	-	-	-	-	AD
20270	Mother	+	+	-	-	
	Neonate	-	-	-	-	AD
21558	Mother	+	+	-	-	
	Neonate	-	-	-	-	AD
22383	Mother	+	+	+	+/	
	Neonate	+	+	+	-	AD
71306	Mother	+	+	+	+	
	Neonate	+	-	+	-	To
19382	Mother	+	+	+	+/	
	Neonate	+	-	+	+/	To
20117	Mother	+	-	+	-	
	Neonate	-	-	-	-	To
18189	Mother	+	-	+	-	
	Neonate	-	-	-	+/	To
77072	Mother	+	-	+	-	
	Neonate	-	-	-	+	To

表 3. 先天性 CMV 感染児とその母親における CMV 型別 IgG と尿中 CMV 型の検出

(J Clin Virol, in submission)

#22383	Months after birth	Mother		Neonate		
		0	0	1	6	12
IgG	AD gH	+	+	+	+	+
	To gH	+	+	-	-	-

表 4. 先天性 CMV 感染児 (重感染例) における移行抗体の消失

(J Clin Virol, in submission)

本研究では先天性 CMV 感染が顕性感染へと至る明確な危険因子の同定には至らなかったが、CMV の重感染例でも先天性 CMV 感染が起こり、異型の移行抗体では防御できていないことが明らかに出来た。今後は同定された先天性 CMV 感染例の追跡調査に加え、病原性に寄与しうる CMV 型を特定・解析出来る方法の確立に努めたい。

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 11 件)

- ① Ishioka K, Ikuta K, Sato Y, Kaneko H, Sorimachi K, Fukushima E, Saijo M, Suzutani T.
Herpes simplex virus type 1 virion-derived US11 inhibits type 1 interferon-induced protein kinase R phosphorylation.
Microbiol Immunol. 2013 (in press)
査読有
- ② Ikuta K, Mizuta K, Suzutani T.
Anti influenza virus activity of two extracts of the Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) from New Zealand and Poland
Fukushima J Med Sci. 2013 (in press)
査読有
- ③ Yoshida M, Sugino H, Iizuka T, Xiaofang L, Suzuki A, Oshitani H, Suzutani T, Ikuta K.
A case report of a patient in whom antibodies against the 2009 pandemic influenza A/H1N1 virus have been present since June 1999
Hum Vaccin Immunother. 2013 (in press)
査読有
- ④ Sekizawa H, Ikuta K, Mizuta K, Takechi S, Suzutani T.
Relationship between polyphenol content and anti-influenza viral effects in Berries
J Sci Food Agric. 2013 (in press)
査読有

- ⑤ Ikuta K, Hashimoto K, Kaneko H, Mori S, Ohashi K, Suzutani T.
Anti-viral and anti-bacterial activities of an extract of the Blackcurrant (*Ribes nigrum* L.)
Microbiol Immunol. 2012 56(12):805-9.
査読有
- ⑥ Ikuta K, Ishioka K, Sato Y, Imamura T, Asano K, Koyano S, Inoue N, Suzutani T.
A novel real-time PCR method for the determination and quantification of each cytomegalovirus (CMV) gH-subtype in clinical samples
J Clin Microbiol. 2012 50(2):499-501.
査読有
- ⑦ Koyano S, Inoue N, Oka A, Moriuchi H, Asano K, Ito Y, Yamada H, Yoshikawa T, Suzutani T; Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group.
Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study
BMJ Open. 2011 1(1):e000118.
査読有
- ⑧ Ikuta K, Ding M, Zhang F, Sixbey JW, Scott RS.
Epithelial cell retention of transcriptionally active, P3HR-1-derived heterogeneous (het) EBV DNA with concurrent loss of parental virus
J Virol. 2011 85(15):7634-43.
査読有
- ⑨ Imamura T, Suzutani T, Ogawa H, Asano K, Nomoto M, Matsui T, Momoi M, Ikuta K, Inoue N and Hosoya M.
Oral Valganciclovir treatment for congenital Cytomegalovirus infection
Pediatr Int. 2011 53(2):249-52.
査読有
- ⑩ Ishibashi K, Tokumoto T, Shirakawa H, Hashimoto K, Ikuta K, Kushida N, Yanagida T, Shishido K, Aikawa K, Toma H, Inoue N, Yamaguchi O, Tanabe K, Suzutani T.
Lack of antibodies against the AD2 epitope of cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) is associated with CMV disease after renal transplantation in recipients having gH serotypes same as their donors
Transpl Infect Dis. 2011 13(3):318-23.

- 査読有
- ⑪ 錫谷達夫、石橋 啓、生田和史
腎移植の急性拒絶反応とサイトメガロウイルス
今日の移植 2011 第24巻 第4号
369-377
査読無

[学会発表] (計12件)

- ① 生田和史、小川洋、新井義文、小杉伊三夫、大森孝一、錫谷達夫
聴覚障害を引き起こすサイトメガロウイルス感染：モデルマウスを用いた解析
第66回日本細菌学会東北支部会総会 仙台 2012.8.23-24
- ② Kazufumi Ikuta, Ken Ishioka, Takashi Imamura, Kimisato Asano, Tetsushi Yoshikawa, Hiroyuki Moriuchi, Shigeyoshi Fujiwara, Takahiko Kubo, Shin Koyano, Naoki Inoue and Tatsuo Suzutani
A genotypic and serologic study of Cytomegalovirus (CMV) reinfection in mothers and neonates with congenital CMV infection in Japan.
International Union of Microbiological Societies 2011 Congresses
XV, International Congress of Virology
Sapporo 2011.9.11-16
- ③ 生田和史、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抗体価ならびにDNA量の型別解析
第65回日本細菌学会東北支部会総会 山形 2011.8.18-19
- ④ 生田和史、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
リアルタイムPCR法によるサイトメガロウイルスの型別定量判別
第26回 ヘルペスウイルス研究会 大阪 2011.6.2-4
- ⑤ 生田和史、石岡賢、佐藤友香、金子久俊、古谷野伸、井上直樹、錫谷達夫
リアルタイムPCR法を用いたサイトメガロウイルスの型別定量判定法
第58回日本ウイルス学会 徳島 2010.11.7-9
- ⑥ 生田和史、今村孝、浅野仁覚、古谷野伸、藤原成悦、中井英剛、吉川哲史、森内浩幸、井上直樹、錫谷達夫

先天性サイトメガロウイルス感染児の母親のウイルス型別抗体検出法を用いた感染パターンの解析
第25回ヘルペスウイルス研究会 浜松
2010.5.27-29

[図書] (計0件)
無し

[産業財産権]
○出願状況 (計0件)
無し
○取得状況 (計0件)
無し

[その他]
無し

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
生田 和史 (IKUTA KAZUFUMI)
福島県立医科大学・医学部
微生物学講座・助教
研究者番号：60512184
- (2) 研究分担者
無し
- (3) 連携研究者
無し