

学位論文の要旨

学位の種類	博士	氏名	長森 恒久
学位論文題目			
先天性CMV感染新生児パイロットマススクリーニングと陽性患児の臨床像の解析			
北海道医学雑誌 巻			
平成22年 掲載予定			
研究目的			
<p>先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症は、出生時からの症候性先天性CMV感染症に加え、出生時無症候で、数年を経て後遺症を呈する例もある。そこでこの無症候性先天性CMV感染症患児を同定するために、尿濾紙検体からのリアルタイムPCRによるCMV検出系を確立し先天性CMV感染新生児パイロットマススクリーニングを行った。今回CMV感染新生児スクリーニングの成績を示すとともに、その中で症候性先天性CMV感染症同胞例という事例を経験し、その感染様式と母体のリスク因子解析を試みた。</p>			
材料・方法			
1) 先天性CMV感染新生児パイロットマススクリーニング			
<p>旭川医科大学病院，森産婦人科医院，苫小牧市立病院で出生し，両親から承諾をえた新生児を対象とした。CMVの検出は，おむつにはさみ尿をしみ込ませた濾紙を直接リアルタイムPCRの検体とする方法で行なった。スクリーニング陽性例については，2次検査として血中，尿中CMVリアルタイムPCRとウイルス血清学的検査を生後3週間以内に行い先天感染を確認し，症候が無いかを検索した。その後も後発性障害の出現が無いか定期的に経過観察した。</p>			
2) 症候性先天性CMV感染症同胞例の臨床像解析			
i) ウイルス血清学的検査			
<p>CMV-IgGアビディティ測定は尿素変性を加えたELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法を用いてアビディティ係数(avidity index:AI)を求めて解析した。</p>			
ii) 分子生物学的解析			
<p>症候性先天性CMV感染症同胞例患児の尿，および中絶児の腹水からDNAを抽出し，CMV-DNA遺伝子解析を糖タンパクO(glycoprotein O;gO)，糖タンパクN(glycoprotein N;gN)をコードするCMV-UL74及びUL73と，TNF類似蛋白をコードするUL144の3つの遺伝子の塩基配列をそれぞれ解析した。</p>			
3) 先天性CMV感染症に関する母体リスク因子の解析			
i) CMV特異的免疫機能の解析			
<p>CMV特異的免疫機能は，以下2つのアッセイ法で比較検討した。</p>			
a) CMV特異的CD4 ⁺ /CD8 ⁺ T細胞数			
<p>CMV特異的インターフェロン(interferon:IFN)-γ分泌CD4⁺/CD8⁺T細胞数を細胞内サイトカイン染色法で測定した。</p>			

b) CMV特異的リンパ球増殖試験

[メチル-³H]チミジン取り込み量の測定により評価した。増殖の指標として、細胞分裂係数(Cell division index:CDI)を算定し評価した。尚、CDI>1.5を反応陽性とした。

ii) 分子生物学的解析

母体末梢血単核球から抽出したDNAでCMV感染症との関連が指摘されているTLR2遺伝子のアミノ酸753番のアルギニンからグルタミン酸への変換(R753Q)が無いか、またTLR2の全長で遺伝子変異が無いか検討した。

成 績

1) 先天性CMV感染症新生児パイロットマススクリーニング

2006年6月から2009年9月までの75か月間で、4677名をスクリーニングし、陽性数は14名(0.32%)で、症候性が1名、無症候性が13名であった。スクリーニング陽性児のCMV-DNA量は血漿中より尿中に多く、血漿では7名(50%)が感度以下であった。また血清CMV-IgMは12名中6名(50%)で陰性であった。症候性の1例では、難聴と軽度の先天眼振がみられた。この母体には、本患児に先行する妊娠で胎児期に症候性先天性CMV感染症が判明し、人工中絶に至ったという既往歴が存在し、症候性先天感染が連続して2度起こっていた。

2) 症候性先天性CMV感染症同胞例の臨床像

本患児の母体における妊娠出産歴は3経妊2経産、初回の妊娠及び出産に問題はなく、第一子は健康である。2回目の妊娠は胎児期に先天性CMV感染症の診断がつき、人工中絶されている。中絶から32か月後に出生したのが本患児である。

i) 症候性先天性CMV感染症同胞例における感染経路の判定

- a) 患児と中絶児から検出されたCMV-gO, gN, UL144の塩基配列は完全に一致していた。
- b) 中絶時の母体CMV-IgM陽性、AIは37%から3か月で67%に上昇しており、母体初感染は中絶児の妊娠中であった。
- c) 母体の保存血で中絶から出産前後の血清CMV-DNAは全て感度以下で、母体で潜伏感染は成立していたものと思われる。

以上より本患児は母体に一旦潜伏感染したCMVが、再活性化を起こして経胎盤的に垂直感染したと考えられた。

3) 先天性CMV感染症に関する母体リスク因子の解析

i) 母体CMV特異的T細胞性免疫機能評価

母体におけるCMV特異的CD4⁺及びCD8⁺T細胞はそれぞれ5.31%, 3.1%で、CMV陽性の健常成人19名における平均値と同等の値であった。

CMV特異的リンパ球増殖試験では母体のCDIは2.30で、反応陽性であった。以上より、この母体においてCMV特異的T細胞性免疫機能に異常は認められなかった。

ii)母体TLR2遺伝子解析

母体のTLR2アミノ酸753番はアルギニン/アルギニンで、R753Qの多型は認めなかった。また他の領域においてもアミノ酸変異を起こす変異は見当たらず、CMVの認識機構に遺伝子上の機能低下を示唆する所見は得られなかった。

考 案

新生児スクリーニングにおける陽性率は3.2%で、尿からのCMV分離でスクリーニングした報告と同等の発生率であった。さらに先天性CMV感染新生児血漿中CMV-DNAは半数が陰性で、ウイルスは血中よりも尿中に大量に存在する事が明らかとなった。従って、尿を検体とし、DNA抽出を必要としない方法は高い感度と全新生児を対象にしたマススクリーニングに耐え得る簡便性を持っていると考えられた。無症候性先天性CMV感染症患児の発見率が高いことが明らかとなったが、このような児からどのぐらいの割合で生後に難聴や精神運動発達遅滞を発症するのか、またその発症を予見しうる所見は何かを同定することは重要であり、定期的なフォローシステムを構築することが必須である。

CMVは未感染母体の初感染のみならず、既感染母体の反復感染でも経胎盤的に先天感染を起こしうる。反復感染には2つの感染経路があり、潜伏感染したCMVとは別株のCMVが新たに感染する再感染と潜伏感染株の再活性化である。既感染母体からの先天性CMV感染では再感染が原因となりうる事が証明されているが、再活性化が先天感染を起こしうるかは明らかに証明された事は無かった。

また過去に先天性CMV感染同胞例の報告は2報あるが感染様式に関する検討はなされていない。今回、先天性CMV感染症同胞例で、その感染経路を明らかにし、更に再活性化が先天感染を起こした事を初めて証明し得た。

CMV特異的免疫は、エピトープの構造が異なる再感染よりも、再活性化に対してより効果的に働くものと考えられ、再活性化は最も先天性CMV感染症を起こしにくい感染様式であると思われる。今回経験した事例は頻度の低い稀なものと考えられるが、原因を探るために母体のリスク因子を評価した。先天性CMV感染症におけるリスク因子は初感染以外にもいくつかの指摘がある。CMV特異的免疫のうちリンパ球増殖の低い事、初感染から間隔の短い次の分娩がリスクとなり得る。またTLR2の遺伝子多型がCMV感染症のリスクとして挙げられる。しかし今回の検討から母体に既知の特異的なCMV先天感染リスク因子は認めなかった。

本事例は新生児スクリーニングを行なう事で初めて先天性CMV感染症を診断することができた。しかし、再活性化が先天感染を起こしうる事が証明できた意義は大きいですが、先天性CMV感染における再活性化によるものの割合がどの程度あるのか、またその臨床像などを知り得るものではない。今後、CMV再活性化に係る因子は何か、あるいは妊婦におけるCMV再活性化の頻度はどれほどあるのかなどについても明らかにしていく必要があると考えられた。

結 論



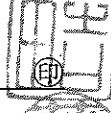

先天性CMV感染新生児パイロットマススクリーニングを行い、臨床像を解析した。4677名中1名の症候

性、13名の無症候性、計14名を同定した。陽性率は0.32%であった。その中で経験した症候性先天性CMV感染症同胞例における母体の感染様式を同定し、再活性化による先天感染を初めて証明した。CMV特異的免疫機能などの母体のリスク因子を解析したが、明らかなものは認めなかった。

引用文献

- [1] Inoue N, Koyano S. Evaluation of screening tests for congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:182-4
- [2] Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, et al. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J Infect Dis* 2007;195:782-8
- [3] Lilleri D, Fornara C, Furione M, Zavattoni M, Revello MG and Gerna G. Development of human cytomegalovirus-specific T cell immunity during primary infection of pregnant women and its correlation with virus transmission to the fetus. *J Infect Dis* 2007;195:1062-70

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士 (医学)	氏 名	長森 恒久
<p>審査委員長 若宮 伸隆 </p> <p>審査委員 松田 光悦 </p> <p>審査委員 吉田 貴彦 </p> <p>審査委員 藤 枝 寛 二 </p>			
学 位 論 文 題 目			
先天性 CMV 感染新生児パイロットマスキングと陽性患児の臨床像の解析			
<p>新生児においては、種々の微生物により、先天性感染をおこし新生児に異常をもたらすことが明らかになっている。そのなかで先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染症は、重要な疾患であるが本邦においてはほとんど疫学的考察のみで感染を分子生物学的検討まで踏み込んだ報告は少ない。</p> <p>本研究では、本邦における先天性CMV感染症の症候性疾患と無症候性感染を同定するために、尿濾紙検体からのリアルタイムPCRによるCMV検出系を確立し、先天性CMV感染症パイロットマスキングを行い、本邦における先天性CMV感染症の現状の評価を行った。</p> <p>方法としては、インフォームドコンセントが得られた、新生児を対象として、尿を濾紙にしみこませたサンプルをもとに、リアルタイムPCRでCMV感染陽性を1次同定し、2次検査として尿中CMVリアルタイムPCRとウイルス血清学的検査を生後3週以内に行った。さらに臨床的に症候がないかどうかのフォローアップを定期的に行い経過観察した。さらに母体のリスク因子としてCMV特異免疫機能の解析をCD4+/CD8+T細胞数とCMV特異リンパ球増殖試験、TLR2遺伝子の変異について検討を行った。</p>			

その結果として、先天性CMV感染症の新生児パイロットマススクリーニングでは、4677名をスクリーニングし、陽性例14名（0.32%）で、症候性1名で、無症候性が13名であった。陽性患者では、ウイルスは血漿よりも尿に多く、血漿では7名（50%）が感度以下の値を示した。また血清CMV-IgMは12名中6名（50%）で陰性であった。症候例では、症状として難聴と軽度の先天性眼振が認められた。本例は2度目の症候性先天性CMV感染であった。この症候性先天性CMV感染症新生児における検討では、同胞との比較で種々の検査結果により潜伏感染による先天性CMV感染である可能性が考えられた。また、母体におけるリスク因子解析では、特に有意のある検査結果は認められなかった。

本研究は、簡便な尿濾紙を用いた先天性CMV感染新生児パイロットマススクリーニングを行い、その有効性を明らかにしたものである。さらに症候性先天性CMV感染症同胞例からの検討で、再活性化によるCMVの先天感染を初めて同定した。得られた知見は今後、先天性CMV感染症の新しいマススクリーニングの開発や先天性CMV感染症の予防に役立つ可能性があり、臨床的にも意義深いと考えられた。

また、論文提出者に対する試問審査においても、適切かつ論理的回答がなされ、関連分野に関する十分な知識を有していることが認められた。

以上の内容から、本審査委員会は本論文が医学博士の学位論文として値するものであると判定した。