

—総説—

先天性サイトメガロウイルス感染症の実態と予防・治療の方向性

井上直樹

要約: サイトメガロウイルス(CMV)は、胎盤を介して胎児に感染(先天性感染)し、胎児の流産・死産や出生児の小頭症・神経学的障害などを引き起こす。我々は先天性 CMV 感染について、①実態調査、②既存薬での治療と新規薬剤開発、③ワクチンの基礎検討を行ってきた。①出生 2-3 週以内の尿中 CMV の検出により先天性感染が診断可能であることを利用して、濾紙を用いた簡便な尿採取・CMV 検査スクリーニング法を確立し、厚生労働科学研究班で 2 万 3 千人の新生児のスクリーニングを実施した。先天性代謝異常よりも多い新生児 300 人に 1 人の頻度で先天性 CMV 感染が発生し、その約 3 割が出生時に症状・異常を呈すること、年長同胞が主な感染源であることを明らかにした。②既存抗 CMV 薬による新生児治療は未承認であるため、研究班で基準を策定し、症候性児に限り治療を行い、ウイルス学的指標を解析した。その結果、6 週間以上の長期投与が時として必要となること、血漿中ウイルス量が臨床症状と一定の相関があることを明らかにした。既存薬には副作用や耐性出現など限界があるため、新規薬剤の開発が求められている。そこで、CMV レポーター細胞を樹立し、約 1 万のランダム化合物から新規抗 CMV 化合物を探索した。同定した化合物の一つ 1-(3,5-dichloro-4-pyridyl)piperidine-4-carboxamide は、感染初期に作用する新規化合物であり、小動物で抗 CMV 活性が確認された。③妊娠モルモットモデルを用いた解析から、糖蛋白 B ベースのワクチンでは胎盤での cell-to-cell でのウイルス増殖を阻害できなかったことから、新たな方法論でのワクチン開発が重要と考えられた。新規薬剤・ワクチンが開発中であるため、当面は妊婦の啓発が対策の鍵となる。

索引用語: サイトメガロウイルス、胎盤感染、核酸検査、ガンシクロビル、ワクチン

Epidemiology, Prevention, and Treatment of Congenital Cytomegalovirus Infection

Naoki INOUE

Abstract: Congenital cytomegalovirus (CMV) infection causes birth and developmental disorders. CMV infection can be diagnosed via urine specimens collected within 2–3 weeks after birth. We studied the epidemiology and treatment of CMV infection as well as anti-CMV drugs and vaccines. First, we developed a rapid and convenient urine collection method and CMV detection assay using filter paper inserted into a diaper. Our study group, supported by funding from MHLW, screened 23,000 newborns using the CMV assay and found that the frequency of congenital CMV infection was 1 in 300 newborns, which is higher than any metabolic genetic defects. Around 30% of the infected infants exhibited clinical abnormalities at birth. Epidemiological analyses indicated that child-to-pregnant mother was the main transmission route. Second, based on the protocol defined by the study group, some symptomatic patients were treated with anti-CMV drugs, and viral loads in these patients were analyzed. We found that treatment lasting >6 weeks was sometimes required and that viral loads in plasma specimens correlated with clinical manifestations. Because side effects and the development of resistance limit the use of available anti-CMV drugs and because there are only a few drugs in clinical trials, there is a need to develop new anti-CMV drugs. We established a CMV reporter cell line, screened 9,600 random compounds, and identified some compounds with anti-CMV activity. One of these compounds, DPPC, inhibited an early step of infection and was effective in an animal model. Third, in the congenital CMV infection model of guinea pigs, we found that the current vaccine strategy based on glycoprotein B cannot block cell-to-cell viral transmission in the placenta. Considering the current situation, the most effective method of CMV prevention may be to educate pregnant mothers to avoid viral exposure.

Key phrases: cytomegalovirus, placental infection, nucleic acid diagnosis, ganciclovir, vaccine

岐阜薬科大学生命薬学大講座感染制御学研究室 (〒501-1196 岐阜市大学西 1 丁目 25-4)

Laboratory of Microbiology and Immunology, Gifu Pharmaceutical University (1-25-4 Daigaku-nishi, Gifu 501-1196, JAPAN)

1. 先天性サイトメガロウイルス感染症とは

サイトメガロウイルス(CMV)は、口唇ヘルペスの原因である単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘や帯状疱疹の原因である水痘帯状疱疹ウイルス(VZV)などと同じヘルペスウイルス科に属するウイルスである。通常は、小児期に無症候性に感染し、生涯、感染者において潜伏感染状態で保持され、疾病を引き起こすことはない。しかし、HIV感染や移植などで免疫抑制条件におかれると再活性化し、肺炎・網膜炎などを始めとした日和見感染症を起こす。妊婦にCMVが初感染、もしくは異なる型の株が再感染すると、胎児に感染が及び、胎児の中枢神経系などに不可逆的な障害が生じ、流産・死産や出生児の精神運動発達遅滞や難聴などの神経学的障害(先天性CMV感染症)を起こす。我々は、臍帯(臍の緒)は胎児由来の組織であり、乾燥臍帯中にCMV DNAが存在すれば先天性感染を後向的に診断可能であることを利用して、3歳までに発症した感音性の高度難聴の15%が、また、原因不明の発達遅滞の25%が、先天性CMV感染が原因であることを明らかにしてきた¹⁾²⁾。また、オーストラリアの研究グループは、死産組織の解析から、先天性CMV感染が死産の15%程度の原因となっていると報告している³⁾。

世界的にみると、全出生児の0.4~2.3%程度がCMV感染の新生児として出生し、そのうちの一部が出生時に症候性である。症候性の新生児は、低出生体重や肝機能障害、血小板減少による紫斑などが出生直後より明らかとなり、先天性CMV感染を疑うことは難しくない。しかし、無症候性児の場合、新生児期には症状が全くなく数ヶ月後に発達や神経学的障害に気づかれることもまれではない。10~20%程度の先天性感染児にこうした障害が生じる一方で、残りの感染児は無症状で経過する。このように同じ先天性CMV感染でありながら、重度の障害を残す例から無症状まで、その臨床像は多岐にわたっている。また、先天性CMV感染に対する治療は、抗CMV薬の副作用とその効果の問題から適応基準や治療終了の目安などが未確立であり、さらにCMV感染に対するワクチンも実用化されていない。

2. 我国での先天性CMV感染の検査と疫学

先天性CMVによる障害は早期診断できれば言語・認識能力形成等の早期介入により一定の機能的回復を図ることができる⁴⁾。また、出生時難聴が診断された感染児に対する抗CMV薬治療により聴覚改善が見られることが、欧米から報告されている⁵⁾。しかし、聴覚障害に限ってみても、先天性CMV感染に伴う難聴の半数以上が遅発性であるため、現行の新生児聴覚検査では検出できない。したがって、先天性CMV感染児を出生時にスクリーニングによ

り同定し、抗CMV薬による早期治療やリスク児としてのフォローアップによる難聴や精神発達遅滞などの後遺症発症時の早期介入を可能にすることが現時点で最善の対策と考えられる。

先天性感染の同定には、出生後2-3週以内に採取した新生児の尿に高力価のCMVが排泄されることを利用して、尿中のCMVをウイルス分離する方法が用いられてきた。しかしながら、これまで大規模なスクリーニングが行われ難かった背景としては、尿の収集・保存、尿からのウイルス分離やPCRなどには膨大な労力と費用が必要であることがあげられる。欧米では、乾燥血、いわゆるガスリー血濾紙、を用いたスクリーニングが試みられているが、血液中のCMV量が極めて少ないためスクリーニングの感度が低い⁶⁾。我々は、簡便迅速かつ安価な先天性CMVのスクリーニング法として、尿を吸収した濾紙片そのものを鋳型としてリアルタイムPCRを行う方法を開発し⁷⁾、この方法を用いて、3年間で全国6地域(北海道、福島、首都圏、愛知、兵庫、長崎)の市中の開業産科から小児集中治療室などを有する拠点病院までを含む25施設で、約2万3千人の新生児について先天性CMV感染の調査を厚生労働科学研究班(代表 藤枝憲二・古谷野伸)により行った。その結果、地域性なく、全国で平均300人の新生児に1人の先天性CMV感染児が出生していること、その3割に明確な臨床症状もしくは石灰化や脳室拡大などの頭部画像異常が見られることを明らかにした⁸⁾。新生児期での死亡例も1例見られている。後述するように、症候性であった児の一部には、抗CMV薬を用いた治療が行われた。感染が確認された児72人のコホートは2年以上経った現在でも維持され、出生時に無症候であった45人中5人で難聴などの遅発性の後遺症が見られている(古谷野ほか、未発表)。先天性CMV感染および感染症の発生頻度は、現在スクリーニングが実施されている先天性代謝異常の発生頻度よりも多い(Table 1)。

Table 1. 先天性代謝異常・CMV感染の頻度

疾患名	頻度
先天性CMV感染	1/300
ダウン症(35歳以上)	1/300
先天性CMV感染-出生時症候性	1/1,000
ダウン症(全体)	1/1,000
クレチン症	1/3,000
先天性副腎過形成	1/15,000
ガラクトース血漿	1/40,000
フェニルケトン尿症	1/80,000
ホモシスチン尿症	1/250,000
メープルシロップ尿症	1/400,000

疫学的解析により、同定した感染児にはスクリーニングで陰性となった新生児に比して、有意に年長児が存在することが明らかとなった。そこで、感染児とその年長兄弟の尿中CMV株について、遺伝子解析を行ったところ86%で同一であり、年長児から妊婦、そして胎児に感染が伝播したことが示された。また、不一致のケースの中にも、母親

が看護婦であったり糖尿病などで定期的に通院していたりといったリスクも見られた。

我々の開発したスクリーニング検査法は長崎大学や神戸大学に技術移転され、すでに両地域では日常的なスクリーニングに生かされている。現在、我々は、この検査法を検査会社で実施できるようにする作業を進めている。なお、スクリーニングで陽性となった児の核酸検査による確定診断は、現段階では研究検査としてなされているが、全新生児を対象としたCMVスクリーニング体制を構築するためには、体外診断用医薬品として承認された核酸検査法を確立する必要がある。その申請に必要な臨床性能試験を目的とした研究が、厚生労働科学研究班（代表 藤井知行東大教授）と検査試薬メーカーとの共同研究として進行中である。

3. 先天性CMV感染症の治療

1) 既存抗CMV薬の効果機序と副作用

米国においてCMV網膜炎への適用が認められているIE2遺伝子に対するアンチセンスRNAであるfomivirsenを除き、現時点で臨床利用可能な抗CMV薬の最終標的は、ウイルスDNAポリメラーゼによるDNA合成阻害である。現在、日本で承認されている抗CMV薬は、ガンシクロビル(GCV、デノシン)、バルガンシクロビル(VGCV、パリキサ)およびフォスカルネット(FOS、ホスカビル)(Fig. 1, 1~3)のみである。

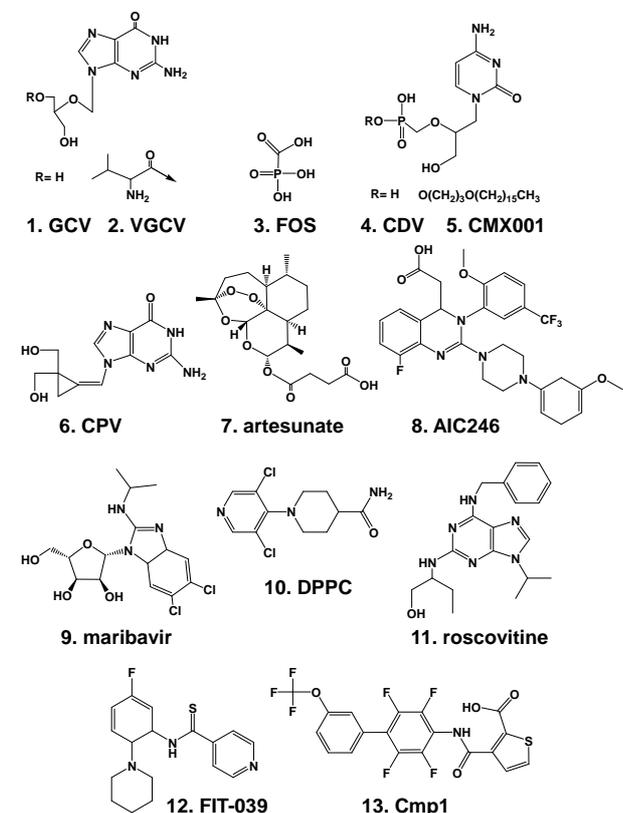


Fig. 1. 抗CMV活性を有する化合物

GCVは、アシクロビル(ACV、ゾピラックス)と類似した薬剤として開発されたデオキシグアノシンのデオキシリボースの2'を削ったもので、DNA複製反応に取り込まれると、次のヌクレオチドとの結合ができなくなり、複製反応が途切れるDNA鎖伸長阻害薬(chain terminator)として作用する。経口GCVの生体内利用率はわずか6~9%であり、成人の標準的投与量(1g, 1日3回)に対して12カプセル/日を要する。このためにバリンエステル化されたプロドラッグとして開発されたのがVGCVであり、450mg錠剤2錠, 1日1回または1日2回が服用される。GCV、VGCVは、CMVがコードするUL97プロテインキナーゼによってリン酸化される。ACV同様に細胞の酵素によって二リン酸、三リン酸化され、ウイルスDNAポリメラーゼを競合的に阻害しウイルスDNA複製を阻害する。FOSは無機ピロリン酸の有機類似物質であり、特異的にウイルスのDNAポリメラーゼのピロリン酸結合部位に直接作用し、その活性を抑制して抗ウイルス効果を示す。

こうした薬剤は、移植やHIV感染に伴うCMV感染症の治療に有効であることが実証されているが、先天性CMV感染症への適用は日本を含め世界的に未承認である。その理由のひとつには、GCVおよびVGCVにおいては骨髄抑制(特に好中球減少)や催奇形性、精子形成の低下、発ガン性など、FOSにおいては強い腎毒性などの副作用の懸念がある。なお、GCVやVGCVによる重度の好中球減少(500/ μ L未満)の場合は、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を使った骨髄刺激か、または薬物投与の中止が必要となる。比較的可成な有害作用としては、発疹、発熱、窒素血症、肝機能障害、悪心および嘔吐がある。現在の抗CMV薬は、長期使用により薬剤耐性株が出現することが知られており、第1選択薬剤であるGCV・VGCV耐性となった場合、FOSが用いられるが、これに耐性が出現した場合、治療に用いることが可能な薬剤がない。

2) 既存抗CMV薬を用いた治療

先天性CMV感染症に対する既存抗CMV薬を用いた治療は承認されていないため、参画した厚生労働科学研究班では、治療プロトコル案を策定し、治療対象や投与薬剤量を厳しく制限し、親権者の要望、担当医による丁寧な説明と親権者の同意を前提に治療を行った。対象は、原則生後30日以内、開始時1,200g以上、修正在胎32週以上で明確な症候性を呈する感染児とし、除外基準としてVGCV(GCV)投与による消化管障害の存在・既往、クレアチニン>1.5mg/mL(またはCCr<10mL/min/1.73m²)、抗ウイルス薬治療が困難な他の重症疾患とした。臨床サイドでは、症状、血算、肝・腎臓機能を指標として治療を進める一方、基礎サイドの我々は尿中や血中のCMV量をウイルス学的指標として定期的に測定した。これまでに、20例以

上の治療をサポートしたが、症例により薬物治療効果には大きな差があった。実際の治療例のウイルス量変動を Fig. 2 に示した。この症例は、点状出血、肝脾腫、脳室拡大が見られる重症例で、GCV 投与により血中、特に血漿中のウイルス量が当初低下したが、同時に副作用として好中球減少が生じたため、投与を中止し、G-CSF 投与により好中球数の増加を図り、GCV の再投与が行われ、最終的に症状の安定化が図られた。

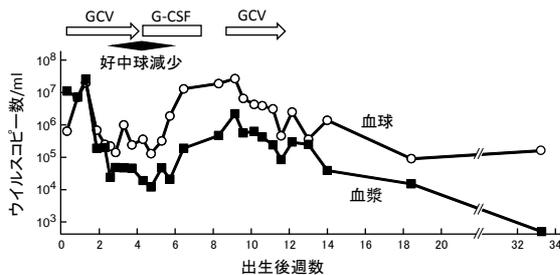


Fig. 2. 先天性 CMV 感染症の GCV 治療例

これまで国内外では6週間の GCV 投与を基本としてきたが、相当数の症例で6週間後に血中ウイルス量のリバウンドが見られ、網膜炎などの臨床症状が再燃したケースもあり⁹⁾、長期投与が望ましいという印象がある。すでに、海外では、6週間の GCV 投与に対して長期(6カ月)VGCV 投与の効果と安全性を検討する第3相臨床試験(NCT00466817)が実施され、重篤な副作用は発生しておらず、その治療効果も良好であるということが国際学会などで報告されている。現時点では、治療は出生後早期に実施することを前提としているが、遅発性障害が発生した後に使用して効果があるかに対するエビデンスは少なく、難聴発症にともない生後5ヶ月に治療開始し聴覚改善を認めた例¹⁰⁾などがあるのみである。なお、血球中にウイルス DNA が検出されても、そのことはウイルスが増殖していることを意味しないが、血漿中にウイルスが存在することは、血中のウイルス増殖を示すことが移植患者などでは知られており、先天性感染児でも移植患者と同様に、臨床的症状と血漿中のウイルス量の間には一定の相関が見られた。

一方、薬剤治療の対象とならなかった先天性感染児も後遺症発症がないかをモニターするために長期に CMV 量を測定した。その結果をまとめたものが Fig. 3 である。ここから言えることは、尿中のウイルス量は長期に高値であり、2年以上経っても CMV が尿に排出されていること、時として血中にウイルスが出現していることである。尿中の継続的ウイルス排出は、先天性感染児に限ったことではなく、健常児が後天的に感染した場合においても2~4年間尿中にはウイルスが排出され続けていると考えられている。実際、1~5歳児108人からランダムに尿を採取し、CMV DNA が1mlの尿中に1万コピー以上あるかを見てみると、27%が陽性であった(井上、未発表)。また、先天性感染児の

年長児の尿中では、37人中28人(76%)が陽性であった。健常児の無症候性感染でも、時として血液中に検出可能なウイルスが出現するかは不明である。

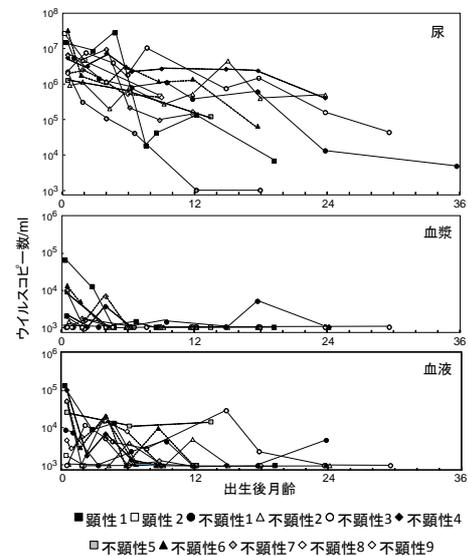


Fig. 3. 抗 CMV 薬治療を伴わない先天性感染児（症候性2例、無症候性9例）のウイルス学的指標変動

3) 薬剤耐性

HSV 感染に対する ACV 耐性出現率に比して、CMV 感染症に対する GCV 耐性出現率は低い。GCV の一リン酸化に必要な UL97 が CMV の増殖に必須であるため、耐性であるが増殖性に影響を与えないような変異は限られるためである。しかし、GCV 耐性 CMV 株の出現率は、宿主の免疫の状態によって異なり、心臓や肝臓移植で1.5~2%、肺移植で5~9%である。適用例が少数であることから、先天性感染では不明である。CMV に対する GCV の効き方は、HSV に対する ACV の効き方に比べ緩やかであり、時として、効果が遅いことから耐性株が出現した可能性があると思われるが、検査を実施してきた多数の症例を見てみると、投与後2週間もすれば次第に効果が明確になる場合が多く、耐性の出現によるものであることは、ほぼない。CMV の場合、ウイルス分離に2~3週程度を要する場合も多く、生物学的方法で GCV 耐性か感受性かを決めるのは、相当の手間と時間がかかり、臨床的対応が困難となる。このため、耐性変異が知られる UL97 およびポリメラーゼ遺伝子の特定の領域を解析するのが現実的である。決定した塩基配列中に既知耐性変異が存在するかどうかは、www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/hcmv/で解析できる。既知変異が見つからない場合、生物学的方法での検討が必要となる。

4) 新規抗 CMV 薬の開発

Fig. 1(4~11)に代表的な新規抗 CMV 化合物の構造、Table 2 にその標的と開発段階、Fig. 4 に CMV 増殖ステップをまとめた。

Table 2. 新規抗 CMV 化合物の標的・開発状況

増殖過程	標的	通称 略称等	Fig 1	動物	臨床試験		文献
					段階 (対象)	NCT番号	
① 侵入～ 前初期過程	不明	DPPC	10	△			
② 前初期過程 ～DNA複製	cdk (細胞)	roscovitine FIT-039	11 12	△			6
	不明	artesunate	7	○	III(HST) 効果なし	00284687	8
③ DNA複製	pyrimidine 合成(細胞)	Cmp1	13	○			
	DNA polymerase	CMX001	5	○	II(他剤治療不能) II(HST)	01143181 00942305	3
		CPV	6	○	I(健康成人)	01433835	4
④ カプシド 形成	terminase	AIC246	8	○	II III進行中	01063829 02137772	
	UL97 kinase	maribavir	9	○	III(肝臓移植) III(HST) 効果なし	00497796 00411645	13 14

動物モデルでの検討：○あり △部分的 HST：造血幹細胞移植
NCT番号：ClinicalTrials.govで検索可能な臨床試験番号

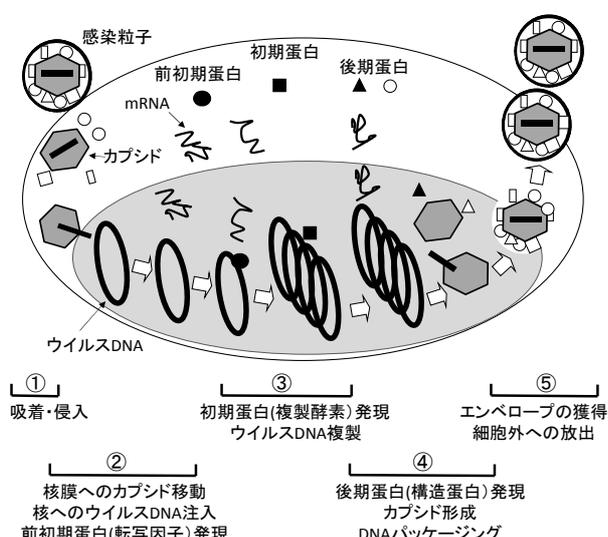


Fig. 4. CMV の細胞内増殖ステップ模式図

a. DNA 複製を阻害する核酸アナログ

シドフォビル(CDV)は、長時間作用性のヌクレオチド類似物質で、ヘルペスウイルス科のみならず、アデノウイルス、ヒトパピローマウイルス、ヒトポリオーマウイルスなどの DNA ウイルスの複製を阻害する。CDV は、ACV や GCV 耐性株に対しても有効である。我国において、未承認である CDV は、GCV 耐性出現に際して FOS が使用できない場合に有用と考えられている。副作用としては、腎障害、代謝性アシドーシス、好中球減少などがある。

CDV は経口吸収率が低く腎毒性等の問題があった。このため膜透過性が向上した誘導体 CMX001 が開発された。他薬剤で治療不能な重篤症例に対する多施設非盲検試験、および幹細胞移植での CMV 感染症予防の第 2 相臨床試験において 100 mg 週 2 回投与で副作用なく薬効が見られたが、200 mg 週 2 回投与では下痢が頻発することが報告された¹¹⁾。CDV の methylenecyclopropane 修飾体 cyclopropavir (CPV) は、動物モデルで著効し¹²⁾、第 1 相臨床試験も最近終了した。

b. 新規標的プロセスに対する薬剤開発の状況

現時点で、薬効や副作用について第 2 相以上の臨床試験で検討された DNA 複製以外を標的とする抗 CMV 薬は、三つのみである。

抗マラリア薬として用いられている artesunate に抗 CMV 活性があることがわかり、動物モデルでの効果が実証された後、6 例の造血幹細胞移植患者での CMV 感染症に対する先制攻撃治療の臨床試験に用いられたが、設定された投与量ではウイルス学指標から見て、改善した患者と不十分な患者が出る結果となり、投与量などを再検討する必要があることが明らかとなった¹³⁾。また、ウガンダの小児において抗マラリア薬 artesunate と sulfadoxine-pyrimethamine に投与群を分け、血中 CMV の陽性率を比較することで、artesunate の抗 CMV 効果を検証しようとしたが、3 日の薬剤投与では効果がなかった¹⁴⁾。Artesunate の 2 量体誘導体が、より高い抗 CMV 活性を示すことから¹⁵⁾、その臨床応用のための検討が開始されている。Artesunate の作用点は不明であるが感染初期の阻害と考えられている。しかし、その誘導体は artesunate と異なる作用点を有するとする報告もある。

カプシドにウイルス DNA を注入するために、糸巻きのように連続的に合成されたウイルス DNA をゲノムサイズに切断する酵素 terminase を標的とした benzimidazole ribonucleoside 誘導体 BDCRB が開発されたが、生体内での代謝が早く、速やかに不活化されることから実用化は断念された¹⁶⁾。同様の薬剤として AIC246 (N-[5-(aminosulfonyl)-4-methyl-1,3-thiazol-2-yl]-N-methyl-2-[4-(2-pyridinyl)phenyl]acetamide)が開発され、造血幹細胞移植での CMV 感染症予防の第 2 相臨床試験が実施され、良好な結果が得られている¹⁷⁾。また、HIV integrase と CMV terminase には、構造活性に類似点があり、HIV integrase 阻害薬 raltegravir が抗 CMV 活性を有するため¹⁸⁾、その類似化合物からより高い活性化化合物の検索が行われている。

Maribavir は BDCRB 類似化合物だが、terminase ではなく CMV UL97 が標的である。UL97 は、DNA 複製に必須な polymerase-associated protein UL44 のリン酸化やカプシドの核から細胞質への放出に関与するなど多機能な蛋白質であり、その機能を maribavir は阻害する。第 1-2 相試験での良好な成績をもとに、肝移植および造血幹細胞移植での CMV 感染症予防を指標とした第 3 相試験が行われたが、薬効不十分という結果に終わった^{19),20)}。

基礎研究レベルで同定され開発が継続されている新規抗 CMV 化合物も一握りにすぎない。

我々は、CMV が感染するとルシフェラーゼ発現が誘導されるレポーター細胞を樹立し、この細胞株を用いて 9600 種類のランダム化合物から抗 CMV 活性を示す化合物をスクリーニングした。その一つが、1-(3,5-dichloro-4-pyridyl) piperidine-4-carboxamide (DPPC)であり、CMV の細胞への

Table 3. CMVワクチン開発の現状

ワクチンの種類	接種内容	ワクチン名	開発メーカー等	免疫原となる蛋白	アジュバント等	臨床試験	
						段階	NCT番号
弱毒生	精製ウイルス	Towne	Wistar	ウイルス全蛋白		2相	
		Towne-Toledoキメラ	Aviron/MedImmune	ウイルス全蛋白		1相	01195571
サブユニット	蛋白 +アジュバント	gB/MF59	Chiron/Sanofi	gB	MF59	2相	00133497 00125502
		GSK1492903	GlaxoSmithKline	gB	AS01	1相	00435396
	蛋白発現DNA +アジュバント	Trans Vax (ASP0113)	Vical/アステラス	gB, pp65	CRL1005 poloxamer + benzalkonium chloride (BAK)	3相中	01877655 02103426 01974206
		CyMVectin	Vical/アステラス	gB, pp65	Vaxfectin lipid	前臨床	
	蛋白発現 ウイルスベクター	AVX601	Alphavax/Novartis	gB, pp65, IE1		1相	00439803

侵入から前初期蛋白の発現までの感染初期に作用することを明らかにした²¹⁾。さらに、*in vivo imaging* を用いた解析から、マウス CMV に対しても一定の効果があることを示した²²⁾。現在、DPPC 以外の同定した抗 CMV 化合物数種についての解析も進めている。また、VZV に対するレポーター細胞も樹立し、CMV と同様な解析を進めている。その中で、ヘルペスウイルス科で構造が類似しているカプシドの主要構成成分である主要カプシド蛋白を標的とする新規化合物を同定し²³⁾、詳細な作用機序や類似化合物を検討することにより、CMV を含めた全てのヘルペスウイルス科ウイルスに作用する化合物を同定することを試みている。

CMV 感染は、宿主因子を修飾し、より増殖しやすい細胞環境を誘導する。こうした宿主因子の阻害薬は、細胞毒性を有する可能性もあるが、ウイルス選択性が高い薬剤もあり、その場合、薬剤耐性が生じないという利点がある。多様な cyclin-dependent kinase (cdk) を阻害する roscovitine は、CMV を含めヘルペスウイルス科ウイルスの増殖を阻害する²⁴⁾。VZV については、すでにヒト組織を移植した重症複合免疫不全マウスモデルでその *in vivo* での効果は示されているが²⁵⁾、CMV については動物での結果は得られていない。我々もいくつかの cdk 阻害薬の抗 CMV 活性を検討したが、感染させる細胞によっては毒性が強く、選択性は発表されているほどは良くなかった(井上、未発表)。多くの種類の cdk を阻害する薬剤では細胞毒性もおのずと強くなるため、cdk7 や cdk9 のみを阻害する薬剤(例えば FIT-039)を用いることで、選択性が改善されたという報告もある²⁶⁾。

核酸合成前駆体となる pyrimidine リボ核酸合成で重要な細胞酵素 dihydroorotate dehydrogenase に対する阻害活性を有するリウマチ治療薬 leflunomide が抗 CMV 活性を示すことから、この酵素の阻害薬がスクリーニングされ、同定された化合物 Cmp1 が、CMV を含めたヘルペスウイルス科、ワクシニア、アデノウイルスなど様々なウイルスに対して強い抗ウイルス活性を持つこと、マウスモデルで抗

CMV 活性を示すことが証明されている²⁷⁾。

4. CMV ワクチン開発の現状と我々の取組み

CMV 感染症は、HIV 感染や移植に伴う日和見感染症と先天性 CMV 感染症に大別される。ワクチン開発にあたっては、前者では主に細胞性免疫、後者では液性免疫の誘導が重視されてきた。日和見感染症の場合には、すでに潜伏感染している状況下で、細胞性免疫の低下に伴って、再活性化が起こると考えられているためである。一方、先天性感染では、妊婦の初感染で重症化することが知られているためである。もちろん、再活性化が先天性 CMV 感染に寄与した症例もある²⁸⁾。先天性感染のリスクが年長児の存在にあること、血清学的にみて少なくとも 6 割以上が妊婦の初感染、型が異なるウイルス株による再感染が 1 割程度と考えられることから²⁹⁾、液性免疫に加えて細胞性免疫がワクチンにより誘導されることは望ましいが、一義的には、特異的抗体誘導により、ウイルス血漿を阻止し、臓器への感染、特に胎盤への感染を防ぐことが先天性 CMV 感染に対するワクチンとしては重要と考えられる。その目的のために、弱毒生ワクチンと中和抗体の標的である糖蛋白 B(gB) に対するサブユニットワクチンの大きく 2 つの流れで開発が進められてきた。主なワクチン候補とその開発状況を Table 3 にまとめた。

1) 弱毒生ワクチンと細胞指向性

CMV は、各宿主の CMV は似ているものの、ヒト CMV (HCMV) はヒトに、マウス CMV はマウスだけに感染する、即ち、宿主域が極めて限定されるという特徴を持っている。このため、ヒトに対して各ウイルス株の病原性を知る方法は、「人体実験」しかなく、実際米国で 70 年代に行われたことは、新鮮分離株で病原性が強いと思われる Toledo 株と実験室で長期培養されて病原性が弱くなったと思われる Towne 株を囚人に接種して、血清学的指標で感染を確認し、臨床症状、リンパ球・血小板数や肝機能などの検査

値での異常を測定することで、Towne 株が弱毒であることを示すとともに、Towne 株接種者に後から Toledo 株を感染させ、既感染者と比較して、感染防御が可能かを検討したのである。その結果、Towne 株は病原性がない点では安全なワクチンとなりえるが、曝露される強毒株の量が増えると感染を防御するには不十分であることがわかった³⁰⁾。そのため、弱毒株 Towne を大きく 4 領域に分けて、それぞれの領域のみを強毒株 Toledo のゲノムと置き換えた交雑ウイルス (キメラ) 4 株が構築された。このキメラウイルス 4 株を CMV 既感染者に接種する第 1 相臨床試験が行なわれ、いずれの株でも副反応は起こらなかった³¹⁾。残念ながら、キメラウイルスを開発したベンチャー企業は資金繰りのために、その後の開発を中断している。

CMV は 200kb を越える大型のウイルスであるために、1989 年に実験室株 AD169 の全塩基配列が報告されて以来、塩基配列決定技術が革新的に飛躍したこの 10 年間になって、やっと Towne 株や新鮮分離株の多くの全塩基配列が決定されることになった。そうした解析から、線維芽細胞を用いて長期培養された実験室株には、比較的長い欠失変異領域があること、新鮮分離株も一定期間培養すると特定の領域に塩基配列の変化が見られることが明らかになった³²⁾。さらに、遺伝子領域としての安定性を欠く領域にコードされる UL128、UL130、UL131A 遺伝子に欠失や点変異が存在することと各 CMV 株の内皮細胞・上皮細胞指向性の喪失の間に相関があることが明らかにされた³³⁾。これらの 3 蛋白質は、それぞれが内皮・上皮細胞への指向性に必須であるとともに、CMV の細胞への感染に必須である gH および gL と複合体 (ペンタマー) を形成していることが明らかにされた³⁴⁾。ここで重要な報告は、Towne 株弱毒生ワクチン接種者から得られた血清と自然感染で既感染となっている者の血清を比較すると、線維芽細胞に CMV 感染を成立させることを阻止する (中和する) 抗体価は同程度であるにもかかわらず、Towne ワクチン接種者の血清には、内皮細胞への感染を中和する抗体価が、既感染者よりも格段に低いというものである³⁵⁾。言いかえると、Towne 生ワクチン株では、内皮細胞への感染を阻止できる抗体が誘導されないということであり、その原因は、内皮細胞への感染に関与するペンタマー構成 3 蛋白質がコードされていないためである。従って、ペンタマーに対する免疫誘導が可能なワクチンの開発が重要であるとされ、現在そのための基礎研究が進行している。

我々は、小動物で唯一先天性感染を起こすモルモット CMV (GPCMV) を用いた研究を行ってきたが、その過程で ATCC より購入したウイルスストックが 2 種類の株からなっていることに気がつき、それらを分離して両株の性質を解析したところ、両株ともに線維芽細胞では同じように増殖できるが、モルモットにそれぞれ接種したところ、一方の株が他方に比して、各臓器への伝播が有意に低下してい

ることを見出した。さらに、個体での増殖性が低下した株には約 240kb のゲノム中に約 1.6kb の欠失があること、この領域が HCMV の UL128、UL130 に対応する蛋白質をコードしていることを明らかにした³⁶⁾。詳細な検討の結果、GPCMV の UL128、UL130、UL131A に対応する蛋白質がペンタマーを形成し、いずれの蛋白質も GPCMV がマクロファージに感染するために必須であることを見出した³⁷⁾。

細胞レベルの増殖には不必要で、個体での増殖には必須の遺伝子が UL128-131A 領域も含め、多数あると考えられ、こうした遺伝子群の中で病原性に関与するものをノックアウトするが免疫誘導は低下しないような弱毒株の作製により新たな弱毒生ワクチンが開発されることが期待される。そのためには、GPCMV の感染動物モデルは有用であり、我々は現在、個体、特に胎盤での増殖に関与する遺伝子群の解析と個体での感染防御に関わる遺伝子群を検討している。

2) gB をベースにしたワクチン

一方、ヒト血清中の抗体の解析から、ウイルス粒子上に存在する gB、gH、gM/gN 複合体の 3 種類の抗原に対する抗体が、CMV の線維芽細胞への感染を中和することが、以前から明らかになっており、他のヘルペスウイルスとの類似性から、gB がその主要な中和の標的と考えられ、gB に対する抗体を誘導することを目的としたワクチンの開発が行なわれてきた。gB のデリバリーの観点から、精製蛋白質サブユニットワクチン、DNA ワクチン、そしてウイルスベクターワクチンの 3 種類が開発中である。

サブユニットワクチンとしては、膜貫通領域を除いた gB を CHO 細胞にて発現し、精製蛋白質にアジュバントを添加したものを用いて、臨床試験が行われている。出産 1 年以内で、もう 1 人子供を持ちたいと考えており、かつ CMV の感染歴がない 14~40 歳の女性を接種対象として、CMV 感染と感染フローの期間がエンドポイントとしてワクチンの効果が検討された³⁸⁾。このワクチンを 3 回筋肉内接種後 1 年以上のフォローアップ期間において、プラセボ群 216 人中 31 人に感染が起ったのに対して、gB ワクチン接種群では 225 人中 18 人に感染が見られ、100 年人単位の感染率計算から、gB ワクチンの感染防御効果は 50% であることが明らかになった。一定の防御が示されたことは画期的であるが、実用的ワクチンとして求められる防御効果には達しておらず、その後の解析から、予想以上に早く免疫減弱が起こるため、接種スケジュールの再検討やアジュバントの変更が必要と思われる。

Vical 社は、マウスモデルでの感染防御効果の成績を背景に、gB に加え、細胞性免疫を誘導する細胞質抗原である pp65 を発現させる DNA ワクチンを開発し、アジュバントを変えて移植を対象にした製剤と先天性感染を対象にしたものを作製している。前者については、造血幹細胞

移植患者を対象にした第2相試験で、CMV感染症の指標となるウイルス血漿の頻度と程度が、ワクチンにより有意に減少するという結果が得られている。しかし、現実的には、CMV感染症が1回でもあった患者の割合が、62%から32%に減少しているが、劇的にCMV感染症が抑制されているわけではない³⁹⁾。なお、ワクチン接種によりGVHDやその他の感染症の頻度などを含め副反応が増加することはなかった。後者のDNAワクチンについては、マウスとウサギを用いて、gB抗体の上昇とpp65に対するIFN γ 産生細胞数を測定し、免疫が誘導されたことを示している⁴⁰⁾。なお、Vical社は少し前からアステラス製薬の傘下となっている。

第3の方法として、アルファウイルス科のベネズエラ脳炎ウイルスの組換えベクターを用いて、gBおよびpp65を発現させるAVX601が開発され、第1相臨床試験において、CMV未感染者への接種により中和抗体と細胞性免疫が誘導されることが示されている⁴¹⁾。このライセンスは、ベンチャー企業AlphavaxからNovartisに売却されている。

サブユニット、DNAワクチン、ウイルスベクターワクチンのいずれを見ても、gBに対する抗体の誘導のみでは、ワクチンとして不十分な効果しか得られないのではないかと考えられる。その原因を検討すべく、我々はGPCMV感染妊娠モルモットモデルにおいて、gB発現アデノウイルスベクターを用いて免疫した後、GPCMVを感染させ、感染防御を検討したところ、確かに、gB免疫により胎児への感染が抑制された。しかし、一旦、胎盤を介して胎児に感染が及ぶと、胎児のほとんどの臓器に感染が拡大してしまっていた。胎盤の免疫病理染色による解析で、gB免疫により母体血と接触する胎盤辺縁でのウイルス増殖が抑制されているのに対して、胎盤内部ではコントロール群とウイルス増殖において差がみられないこと、そして胎盤内ではウイルスがcell-to-cellの様式で増殖していることが明らかになった⁴²⁾。従って、gBによる免疫では、一旦組織内（少なくとも胎盤内）に入り込みcell-to-cellで増殖するウイルスを制御することは不可能であり、新たな抗原や免疫法の開発が必要になっていると思われる。

5. 今できること

ワクチンもない、感染妊婦や出生時に無症状・軽症の感染新生児を治療できる抗CMV薬もないという状況下において、研究開発以外に今できることは、血清学検査の体外診断用医薬品化、妊婦に対する啓発、医師の判断のための相談窓口の設置、感染児のレジストリーの充実などである。

1) 血清学検査と啓発

現時点では、妊婦のCMV感染を治療する方法がないために、CMV感染歴がなく妊娠中の感染リスクがある妊婦

を同定するための血清学検査は、ほとんど普及していない。米国における研究では、血清学検査により過去に感染歴がない、即ち、未感染であることから妊娠中に初感染のリスクがあるとわかった場合、妊婦は手洗いなどの予防策を徹底するなど行動様式を変化させ、結果として先天性感染の頻度が約半分に低下することが明らかにされた⁴³⁾。つまり、風疹の抗体検査同様に妊娠検査にCMV抗体検査を含めるとCMV感染率が低下する。未感染妊婦に対する啓発が感染率を半減させることは最近のフランスのグループの研究でも実証されている⁴⁴⁾。

啓発の主な内容は、感染源が自身の子供であることから、オムツ交換後の手洗いの励行、子供の食べ残しをたべないなど、平易な内容で行うことが重要とされている。残念ながら、先天性CMV感染症に関する妊婦の認知度は低く、さらに、医療関係者においても十分な知識がない現状がある。患者会が組織され、メディアに取り上げられるように最近はなってきたが、7-8年前に新生児のCMVスクリーニング調査を開始した頃は、調査目的を説明するために100人程度と話しても、看護婦など医療関係者以外の妊婦全員がサイトメガロウイルスという単語すら知らないというのが実情であった。

風疹や水痘など明確な臨床症状を呈する疾患では、IgG抗体が陽性であれば、胎児に影響が出るような直近の感染歴がないことが保証される。しかし、CMVの妊婦初感染では、臨床症状はせいぜいが発熱程度であるため、IgG抗体が陽性であっても、感染が1ヶ月前に起こったのか10年前なのかを判定することが難しい。その仕分けをできる方法が、IgG avidity検査と言われるもので、抗原刺激が継続すると再構成された抗体遺伝子の抗原認識部位に体細胞変異が起こり、より抗原に対する親和性の強い抗体の割合が多くなっていくことを利用して、尿素などを抗原抗体反応に添加した場合と無添加の場合を比較することで、親和性の強い抗体の割合を測定し、その割合が低い場合に比較的直近での感染があったと判定することができる。この検査法試薬は、体外診断用医薬品となっていないため、現在、CMV未感染妊婦を対象にした前向き研究を行い、検査法の臨床有用性を厚生労働科学研究班で検討している。

2) レジストリー

先天性CMV感染児をスクリーニングする体制の構築とともに、感染の実態や治療状況を常時モニタリングできる仕組みが必要であり、その第一歩として感染症法第5類対象疾患（小児科定点対象疾患）として、発生動向のサーベイランスがなされるべきである。ワクチンで予防可能な疾患であるがゆえに、先天性風疹症候群は感染症法にもとづき、全数把握がなされているが、先天性CMV感染症にはワクチンがないという本末顛倒の議論で対象疾患から外されるべきではない。全数把握がなされていない現状では、

Table 4. 先天性CMV感染の対策の方向性

対策目的	行政的対策 (厚労省、都道府県)	短期的対策 (主に臨床)	長期的対策 (主に研究)
陽性児への対応・治療	情報集約 感染症法対象疾患化	既存薬の適用承認申請 治療基準策定 相談・治療拠点の構築	新規薬剤の開発
陽性リスク児の早期発見	検査費用補助	全新生児スクリーニング 核酸検査の体外診断用医薬品化	発症リスク因子の同定
陽性胎児の早期発見・治療	検査費用補助	IgG avidity検査の体外診断用医薬品化 妊婦の抗体検査の推進	抗体治療法の確立
感染・発症予防	保健所などによる教育・啓発	産科での妊婦教育・啓発	ワクチン開発

小児科を中心に感染患児を登録し、予後予想のためのリスク因子の疫学的解析や、治療が行われた場合の転機を解析するエビデンスの集積を図る必要があると考えられる。

6. 総括

先天性 CMV 感染症は、単一病原体による感染症であっても、300 人に 1 人の子供の人生を困難へと変えてしまうものであり、対策としてどの局面で何ができるかが多様である。本稿では、薬剤やワクチン開発の現状を紹介することで、研究サイドから見た対策を中心に記載したが、Table 4 に示すように、有機的にさまざまな対策がなされることが求められている。

7. 謝辞

先天性 CMV 感染児のスクリーニング調査ならびに治療に関する研究は、20-26 年度厚生労働科学研究費補助金成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業（代表者：藤枝憲二・古谷野伸、山田秀人、藤井知行）により、多くの医療関係者の協力のもとに実施された。抗 CMV 化合物に関する研究は、25-26 年度科学研究費補助金基盤研究 C（代表者：井上直樹）および 18-23 年度厚生労働科学研究費補助金新興再興感染症研究事業（代表者：森康子、西條政幸）により、ワクチンに関する研究は、22-24 年度創薬基盤推進研究事業（代表者：井上直樹）により実施された。

8. 引用文献

- 1) Ogawa H., Suzutani T., Baba Y., Koyano S., Nozawa N., Ishibashi K., Fujieda K., Inoue N., Omori K., *J.Infect.Dis.*, **195**, 782-788 (2007).
- 2) Koyano S., Inoue N., Nagamori T., Yan H., Asanuma H., Yagyu K., Osaki M., Seiwa C., Fujieda K., *Clin.Infect.Dis.*, **48**, e93-e95 (2009).
- 3) Iwasenko J.M., Howard J., Arbuckle S., Graf N., Hall B., Craig M.E., Rawlinson W.D., *J.Infect.Dis.*, **203**, 1526-1533 (2011).

- 4) Yoshinaga-Itano C., *J.Deaf Stud.Deaf Educ.*, **19**, 143-175 (2014).
- 5) Kimberlin D.W., Lin C.Y., Sanchez P.J., Demmler G.J., Dankner W., Shelton M., Jacobs R.F., Vaudry W., Pass R.F., Kiell J.M., Soong S.J., Whitley R.J., *J Pediatr.*, **143**, 16-25 (2003).
- 6) Inoue N., Koyano S., *Pediatr.Infect.Dis.J.*, **27**, 182-184 (2008).
- 7) Nozawa N., Koyano S., Yamamoto Y., Inami Y., Kurane I., Inoue N., *J.Clin.Microbiol.*, **45**, 1305-1307 (2007).
- 8) Koyano S., Inoue N., Oka A., Moriuchi H., Asano K., Ito Y., Yamada H., Yoshikawa T., Suzutani T., for the Japanese Congenital Cytomegalovirus Study Group, *BMJ Open*, **1**, e000118- (2011).
- 9) Shoji K., Ito N., Ito Y., Inoue N., Adachi S., Fujimaru T., Nakamura T., Nishina S., Azuma N., Saitoh A., *J Pediatr.*, **157**, 331-333 (2010).
- 10) Imamura T., Suzutani T., Ogawa H., Asano K., Nomoto M., Matsui T., Momoi N., Ikuta K., Inoue N., Hosoya M., *Pediatr.Int.*, **53**, 249-252 (2011).
- 11) Marty F.M., Winston D.J., Rowley S.D., Vance E., Papanicolaou G.A., Mullane K.M., Brundage T.M., Robertson A.T., Godkin S., Mommeja-Marin H., Boeckh M., *N.Engl.J.Med.*, **369**, 1227-1236 (2013).
- 12) Kern E.R., Bidanset D.J., Hartline C.B., Yan Z., Zemlicka J., Quenelle D.C., *Antimicrob.Agents Chemother.*, **48**, 4745-4753 (2004).
- 13) Wolf D.G., Shimoni A., Resnick I.B., Stamminger T., Neumann A.U., Chou S., Efferth T., Caplan O., Rose J., Nagler A., Marschall M., *Antiviral Res.*, **90**, 183-186 (2011).
- 14) Gantt S., Huang M.L., Magaret A., Bunts L., Selke S., Wald A., Rosenthal P.J., Dorsey G., Casper C., *J.Clin.Virol.*, **58**, 276-278 (2013).
- 15) He R., Mott B.T., Rosenthal A.S., Genna D.T., Posner G.H., Arav-Boger R., *PLoS.One.*, **6**, e24334- (2011).
- 16) Visalli R.J., van Z.M., *Antiviral Res.*, **59**, 73-87 (2003).
- 17) Chemaly R.F., Ullmann A.J., Stoelben S., Richard M.P., Bornhauser M., Groth C., Einsele H., Silverman M., Mullane K.M., Brown J., Nowak H., Kolling K., Stobernack H.P., Lischka P., Zimmermann H., Rubsamenschaeff H., Champlin R.E., Ehninger G., *N.Engl.J.Med.*,

- 370, 1781-1789 (2014).
- 18) Nadal M., Mas P.J., Blanco A.G., Arnan C., Sola M., Hart D.J., Coll M., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **107**, 16078-16083 (2010).
 - 19) Drew W.L., Ives D., Lalezari J.P., Crumpacker C., Follansbee S.E., Spector S.A., Benson C.A., Friedberg D.N., Hubbard L., Stempien M.J., *N.Engl.J Med.*, **333**, 615-620 (1995).
 - 20) Winston D.J., Saliba F., Blumberg E., Abouljoud M., Garcia-Diaz J.B., Goss J.A., Clough L., Avery R., Limaye A.P., Ericzon B.G., Navasa M., Troisi R.I., Chen H., Villano S.A., Uknis M.E., *Am.J.Transplant.*, **12**, 3021-3030 (2012).
 - 21) Fukui Y., Shindoh K., Yamamoto Y., Koyano S., Kosugi I., Yamaguchi T., Kurane I., Inoue N., *Antimicrob.Agents Chemother.*, **52**, 2420-2427 (2008).
 - 22) Yamada S., Kosugi I., Katano H., Fukui Y., Kawasaki H., Arai Y., Kurane I., Inoue N., *Antiviral Res.*, **88**, 45-52 (2010).
 - 23) Inoue N., Matsushita M., Fukui Y., Yamada S., Tsuda M., Higashi C., Kaneko K., Hasegawa H., Yamaguchi T., *J Virol.*, **86**, 12198-12207 (2012).
 - 24) Schang L.M., *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.*, **5**, 29-37 (2005).
 - 25) Rowe J., Greenblatt R.J., Liu D., Moffat J.F., *Antiviral Res.*, **86**, 276-285 (2010).
 - 26) Yamamoto M., Onogi H., Kii I., Yoshida S., Iida K., Sakai H., Abe M., Tsubota T., Ito N., Hosoya T., Hagiwara M., *J.Clin.Invest.*, **124**, 3479-3488 (2014).
 - 27) Marschall M., Niemann I., Kosulin K., Bootz A., Wagner S., Dobner T., Herz T., Kramer B., Leban J., Vitt D., Stamminger T., Hutterer C., Strobl S., *Antiviral Res.*, **100**, 640-648 (2013).
 - 28) Nagamori T., Koyano S., Inoue N., Yamada H., Oshima M., Minematsu T., Fujieda K., *J Clin.Virol.*, **49**, 134-136 (2010).
 - 29) Ikuta K., Minematsu T., Inoue N., Kubo T., Asano K., Ishibashi K., Imamura T., Nakai H., Yoshikawa T., Moriuchi H., Fujiwara S., Koyano S., Suzutani T., *J Clin.Virol.*, **58**, 474-478 (2013).
 - 30) Plotkin S.A., Starr S.E., Friedman H.M., Gonczol E., Brayman K., *Rev.Infect.Dis.*, **12 Suppl 7**, S827-S838 (1990).
 - 31) Heineman T.C., Schleiss M., Bernstein D.I., Spaete R.R., Yan L., Duke G., Prichard M., Wang Z., Yan Q., Sharp M.A., Klein N., Arvin A.M., Kemble G., *J.Infect.Dis.*, **193**, 1350-1360 (2006).
 - 32) Murphy E., Yu D., Grimwood J., Schmutz J., Dickson M., Jarvis M.A., Hahn G., Nelson J.A., Myers R.M., Shenk T.E., *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **100**, 14976-14981 (2003).
 - 33) Hahn G., Revello M.G., Patrone M., Percivalle E., Campanini G., Sarasini A., Wagner M., Gallina A., Milanese G., Koszinowski U., Baldanti F., Gerna G., *J Virol.*, **78**, 10023-10033 (2004).
 - 34) Ryckman B.J., Rainish B.L., Chase M.C., Borton J.A., Nelson J.A., Jarvis M.A., Johnson D.C., *J Virol.*, **82**, 60-70 (2008).
 - 35) Cui X., Meza B.P., Adler S.P., McVoy M.A., *Vaccine*, **26**, 5760-5766 (2008).
 - 36) Nozawa N., Yamamoto Y., Fukui Y., Katano H., Tsutsui Y., Sato Y., Yamada S., Inami Y., Nakamura K., Yokoi M., Kurane I., Inoue N., *Virology*, **379**, 45-54 (2008).
 - 37) Yamada S., Fukuchi S., Hashimoto K., Fukui Y., Tsuda M., Kataoka M., Katano H., Inoue N., *J.Gen.Virol.*, **95**, 1376-1382 (2014).
 - 38) Pass R.F., Zhang C., Evans A., Simpson T., Andrews W., Huang M.L., Corey L., Hill J., Davis E., Flanigan C., Cloud G., *N.Engl.J Med.*, **360**, 1191-1199 (2009).
 - 39) Kharfan-Dabaja M.A., Boeckh M., Wilck M.B., Langston A.A., Chu A.H., Wloch M.K., Guterwill D.F., Smith L.R., Rolland A.P., Kenney R.T., *Lancet Infect.Dis.*, **12**, 290-299 (2012).
 - 40) Hartikka J., Bozoukova V., Morrow J., Rusalov D., Shlapobersky M., Wei Q., Boutsaboualoy S., Ye M., Wloch M.K., Doukas J., Sullivan S., Rolland A., Smith L.R., *Hum.Vaccin.Immunother.*, **8**, 1595-1606 (2012).
 - 41) Bernstein D.I., Reap E.A., Katen K., Watson A., Smith K., Norberg P., Olmsted R.A., Hoepfer A., Morris J., Negri S., Maughan M.F., Chulay J.D., *Vaccine*, **28**, 484-493 (2009).
 - 42) Hashimoto K., Yamada S., Katano H., Fukuchi S., Sato Y., Kato M., Yamaguchi T., Moriishi K., Inoue N., *Vaccine*, **31**, 3199-3205 (2013).
 - 43) Adler S.P., Finney J.W., Manganello A.M., Best A.M., *Pediatr.Infect.Dis.J.*, **15**, 240-246 (1996).
 - 44) Vauloup-Fellous C., Picone O., Cordier A.G., Parent-du-Chatelet I., Senat M.V., Frydman R., Grangeot-Keros L., *J.Clin.Virol.*, **46 Suppl 4**, S49-S53 (2009).