

厚生労働科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の
実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 大森 孝一

平成 19 (2007) 年 3 月

班 員 名 簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	大森 孝一	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	教授
分担研究者	藤枝 憲二	旭川医科大学小児科	教授
	錫谷 達夫	福島県立医科大学医学部微生物学	教授
	筒井 祥博	浜松医科大学病理学第二	教授
	竹腰 正隆	東海大学医学部基礎医学系分子生命科学	講師
	井上 直樹	国立感染症研究所ウイルス1部	室長
	片野 晴隆	国立感染症研究所感染病理部	室長
研究協力者	小川 洋	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	助教授
	馬場 陽子	福島県総合療育センター	部長
		福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	兼務講師
	古谷野 伸	旭川医科大学小児科	助手
	小杉伊三夫	浜松医科大学病理学第二	助教授
	李 立	浜松医科大学病理学第二	大学院生
	野澤 直樹	国立感染症研究所ウイルス1部	研究官
	倉田 毅	国立感染症研究所	名誉所員
	佐多徹太郎	国立感染症研究所感染病理部	部長
	佐藤 由子	国立感染症研究所感染病理部	研究官
	岡野 渉	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	大学院生
佐藤 聡	福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	大学院生	

目 次

班 員 名 簿

I. 総括研究報告	
先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究	大森 孝一 …………… 1
II. 分担研究報告	
1. 難聴の原因となる先天性サイトメガロウイルス感染症の保存臍帯による診断法の確立 — 標的遺伝子の違いによる検出率の差 —	藤枝 憲二 …………… 6
2. 聴覚障害児における先天性サイトメガロウイルス感染の頻度	錫谷 達夫 …………… 8
3. 福島県における新生児聴覚検査事業の現状	大森 孝一 …………… 11
4. 先天性サイトメガロウイルス感染による障害発症機構の解析に関する研究	井上 直樹 …………… 13
5. 抗体療法の開発に関する研究	竹腰 正隆 …………… 16
6. 先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴発生機序の動物実験モデルによる研究	筒井 祥博 …………… 19
7. モルモットサイトメガロウイルス関連聴覚障害の病理	片野 晴隆 …………… 23
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	…………… 27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	…………… 29

先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究

主任研究者 大森 孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

胎児期のサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus; CMV）感染（先天性 CMV 感染症）は全出生児250～300人に1人起こる頻度の高い感染症であり、不顕性感染者の約8%は、生後も持続するウイルス増殖により幼児期に進行性の聴覚障害を発症することが欧米の研究により解ってきた。これらのデータから推計すると全出生児の3,000～4,000人に1人は先天性 CMV 感染症による聴覚障害が発症すると考えられる。従って、1,000～2,000の出生に1人いるといわれる新生児・幼児の聴覚障害の約30%が先天性 CMV 感染症によるものと予想される。本研究では、「新生児・幼児の聴覚障害者を約30%減少させる」ことを最終目標に、まず本邦における先天性 CMV 感染による聴覚障害の実態を調査し、先天性 CMV 感染がどの様に聴覚障害を起こすかという基礎的な研究から、幼児に適応可能な抗 CMV 抗体療法の開発などを共同研究によって総合的に進めてきた。

研究最終年度である本年度は1) 臍帯に感染している CMV を PCR 法で検出することで、先天性 CMV 感染症を retrospective に確定診断する方法により、聴覚障害をもつ患児67名の臍帯において10名（14.9%）の CMV 感染症を確認した。2歳以下発症の患児でみると47名中10名（21.3%）であり、頻度が高いことが判明した。さらにこれら67名において先天性難聴においてもっとも頻度が高いとされている GJB2 難聴遺伝子について検討した。遺伝子変異は16名に認められ、これら16名には CMV 陽性例は認められなかった。2) 新生児聴覚スクリーニングにおいて13,709人に自動 ABR 検査を行い、要精検となった乳児に対し ABR、ASSR、COR による精密聴力検査の結果、要精密検査となった23例のうち3例は正常聴力、6例が両側難聴、13例が片側難聴と診断された。3) マウスの動物実験系で、CMV 血行感染モデルを作製し、内耳におけるマウス CMV の存在部位を明らかにした。モルモットの動物実験系で垂直モデルによる感染モデルを作製し、内耳におけるモルモット CMV の存在部位を明らかにした。マウス、モルモットいずれの実験モデルにおいても内耳ラセン神経節、鼓室階、前庭階に同様の CMV 感染を証明することができ、マウスの実験系においても先天感染モデルと同様の聴覚障害を来すると推測された。これらの動物モデルは CMV による聴覚障害の発症機序の解明に寄与するものと考えられた。4) 抗ヒト CMV 中和ヒト抗体を、多様な CMV に対して対応できる遺伝子工学技術を確立した。我々のグループではモルモット垂直感染モデル、マウス腹腔内投与モデルで蝸牛外リンパ腔領域、ラセン神経節に CMV の局在を証明したが、聴覚障害の発症機序を解明するには至っていない。今後、CMV 感染モデルを作製し、ウイルス量と聴覚障害の関係やウイルス感染部位の解析を行い、聴覚障害の発症病理を明らかにする必要がある。

基礎部門と臨床部門を統合した研究開発推進により、先天性 CMV 感染による聴覚障害の軽減や重症化防止、予後判定、治療法が確立され、障害者の Quality of Life 向上が期待される。

A. 研究目的

（目的と必要性）

胎児期のサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus; CMV）感染（先天性 CMV 感染症）は全出生児250～300人に1人起こる頻度の高い感染症である。その約5%は奇形など重篤な症状を示すが、残り約95%は不顕性感染のため疾患との関連が不明確であった。ところが最近の欧米での研究から、不顕性感染者の約8%は、生後も持続するウイルス増殖により幼児期に進行性の聴覚障害（感音性難聴）を発症することが解ってきた。これらのデータから計算すると3,000～40,000人に1人は先天性 CMV 感染による聴覚障害が発症していると推計される。

従って、1,000～2,000の出生に1人いるといわれる新生児・幼児の聴覚障害の約30%は先天性 CMV 感染症が原因と予想することができる。この頻度は本邦で実施されている新生児マス・スクリーニングのうち、発見率が最も高いクレチン症の4,600人に1人という割合に匹敵するものである。

先天性 CMV 感染症による聴覚障害者の多くは出生時には異常がなく、現行の新生児聴覚検査では発見できず、聴覚障害がある程度進行してから発見される可能性が高い。したがって、現行の新生児聴覚スクリーニングに加えて先天性 CMV 感染症による聴覚障害を視野にいたスクリーニング法を検討する必要がある。さらに聴覚障害が進行する前に先天性 CMV 感染症による聴覚

障害発症の可能性の高い症例を発見することができれば、聴覚障害の重篤化が阻止できる可能性がある。

本研究の目的は先天性CMV感染症による聴覚障害の疫学、発症病理、発症予防に繋がる治療法やマス・スクリーニング法の開発などを総合的に研究し、先天性CMV感染症による聴覚障害に対する予防対策を立案することにある。また、聴覚障害の原因が遺伝性疾患ではなく感染症によることを早期に明らかにすることは、ハビリテーションの方向性決定や患者両親の精神的苦痛に対する適切な援助に必要である。

B. 研究方法

I. 聴覚障害の実態調査

1 聴覚障害患者の臨床的な解析：福島県内で聴覚障害を指摘された新生児・幼児患者は、ほぼ全例福島医大耳鼻科とその関連病院を受診している。聴性行動反応検査(BOA)と条件詮索反射聴力検査(COR)にて聴力閾値を測定し、他覚的聴力検査である聴性脳幹反応検査(ABR)と聴性定常状態誘発反応(ASSR)検査にて周波数ごとの聴力閾値を測定する。さらに側頭骨CTなどの画像検査を積極的に行う。このうち、保護者のインフォームドコンセントを得られた患児につき、

① 臍帯をPCR法で調べ、先天性CMV感染を確定診断する。

② 既に先天性CMV感染症の診断がなされている症例で、聴力像とその経時的变化を解析する。聴覚障害に進展する先天性CMV感染症の危険因子を明らかにする。

③ 先天性難聴のうちもっとも頻度が高いとされるGJB2遺伝子変異の有無を検討する。

④ CMV株の遺伝子型の検討をおこない難聴を引き起こしやすい遺伝子型の有無について検討する。

2 新生児聴覚スクリーニング及び精密聴力検査：平成16年より福島県新生児聴覚検査事業が始まり、産科施設にて自動ABRを用いた新生児の聴覚スクリーニングが行われるようになった。要精密検査となった乳児につき、精密聴力検査を行う。

II. 発症病理の解明

CMV感染による聴覚障害発生機序の解明：マウスおよびモルモットの実験系を用い、先天性CMV感染症の聴覚障害機序を解析する(浜松医大・病理、感染研・ウイルス1部、感染病理、福島医大・微生物、耳鼻科)。

III. 抗体療法の開発に関する研究

ヒト型抗CMVモノクローナル抗体の樹立：CMVに中和活性を示すヒト型モノクローナル抗体を解析するとともに、さらに多数の抗体を作製し、全てのCMV株に対応できる抗体を樹立する(東海大医学部・基礎医学系)。

(倫理面の配慮)

臍帯を用いる研究においては福島医大、旭川医大倫理委員会の承認の上、ヘルシンキ宣言に則り人権擁護上の配慮を行い、対象者に対する不利益、危険性の排除に対する十分な配慮をはかり、研究計画に対する説明と同意

を得られた上で研究を実施する。

動物実験に関しては浜松医科大学、国立感染症研究所、福島県立医科大学にて承認の上、各施設の動物実験ガイドラインに沿って行う。

C. 研究結果

I. 臨床研究

1) 聴覚障害患者の臨床的な解析：先天性CMV感染の有無について臍帯に感染しているCMVをPCR法で検出することで、先天性CMV感染症をretrospectiveに確定診断する方法を確立した(Koyano et al. *Pediatric Infect. Dis. J.* 23: 481-2, 2004)。本法の精度をさらに高め、福島県立医科大学並びに旭川医科大学の倫理委員会から承認を受け、保存臍帯からCMV-DNAを検出する方法を用いて、聴覚障害児のCMV感染の有無と臨床経過の調査を開始した。この3年間に福島県総合療育センターおよび福島医大耳鼻咽喉科外来を受診した聴覚障害児67名の臍帯を検査し、10名(14.9%)のCMV感染が確認された。2歳以下発症の患児でみると47名中10名(21%)であった。GJB2遺伝子変異は16名に認められた。

症候性CMV感染症症例におけるCMVと聴覚障害のみを呈したCMVにおいて遺伝子型の差による違いは認められなかった。

2) 新生児の聴覚スクリーニング：平成19年1月までの3年1ヶ月間に13,709人に自動ABR検査を行い、要精密検査となった乳児に対しABR、ASSR、CORによる精密聴力検査の結果、要精密検査となった23例のうち3例は正常聴力、6例が両側難聴、13例が片側難聴と診断された。(福島医大)。

II. 発症病理の解明

1) マウスの動物実験系で、腹腔内へマウスCMVを感染させ、脳、及び内耳へ血行性に感染させるモデルを作製した(浜松医大)。

2) モルモットにおいてモルモットCMVの水平および垂直感染モデルを作製し、モルモットの内耳におけるモルモットCMVの局在を明らかにした(感染研)。マウス、モルモットいずれの実験モデルにおいても内耳鼓室階、前庭階、血管条などの外リンパ液領域および神経節においてCMV感染細胞が確認された。

III. 抗体療法の開発に関する研究

ヒト型抗CMVモノクローナル抗体の作製：中和活性を有するヒト型抗CMVモノクローナル抗体を数株樹立し、完全型の抗体として植物を用いて産生するための抗体産生ベクターの構築に成功した(東海大医学部・基礎医学系)。

D. 考察

先天性CMV感染症による聴覚障害は1,000~2,000の出生に1人いるといわれる新生児・幼児の聴覚障害の約30%と予想される。新生児・幼児の聴覚障害は早期に発見し、療育を開始することが必要で本邦では新生児聴覚スクリーニングが早期発見のために施行されるように

なってきた。しかしながら、先天性 CMV 感染による聴覚障害の多くは進行性の聴覚障害であり、新生児聴覚スクリーニングでは異常がなく、障害が進行してから発見される可能性が高いとされている。従って、先天性 CMV 感染症そのものを診断するスクリーニング法の開発と早期発見ができれば、早期の抗ウイルス療法や早期の療育を行うことが可能となることから、聴覚障害および言語障害の重篤化を阻止できるものと考えられる。

本研究における先天性 CMV 感染による聴覚障害の実態調査から、聴覚障害児の少なくとも15%~20%の割合で先天性 CMV 感染が関与していることが明らかとなった。先天性難聴の50%程度が遺伝子の関与する難聴ではないかと言われおり、この中でも GJB2 遺伝子変異がおよそ20%を占めるとされてきた。われわれが対象とした症例においても、GJB2 遺伝子変異に続いて CMV 感染症例の頻度が高かった。この頻度を考えても先天性 CMV 感染の難聴への関与が相当な頻度であることが判明した。今後も、先天性 CMV 感染による聴覚障害の実態調査を広く行っていくことが重要である。

本研究における血清型別抗 CMV 抗体測定用 ELISA 系の開発およびヒト型抗モノクローナル抗体の開発により、ウイルスの血清型に応じて先天性 CMV 感染症による聴覚障害を予防できる可能性がある。また、先天性 CMV 感染により聴覚障害を起こす動物実験系を確立できれば、聴覚障害のメカニズムを明らかにできるとともに、各種予防法・治療法の有効性を評価できる。

以上のように本研究により、先天性 CMV 感染による聴覚障害の疫学、発症病理、発症予防につながる治療法やマス・スクリーニング法の開発などを総合的に研究することにより、先天性 CMV 感染による聴覚障害の予防対策を立案することが可能になるものと考えられる。

E. 結 論

本研究では、「新生児・幼児の聴覚障害者を約30%減少させる」ことを最終目標に、先天性 CMV 感染がどのように聴覚障害を起こすかという基礎的な研究から、多数の臨床症例の解析、幼児に適応可能な抗 CMV 抗体療法の開発などを共同研究によって総合的に進めてきた。研究最終年度である平成18年度は1) 臍帯に感染している CMV を PCR 法で検出することで、先天性 CMV 感染症を retrospective に確定診断する方法により聴覚障害児67名の臍帯を検査したところ10名の CMV 感染が確認された。2歳以下発症の患児では47名中10名であった。2) 新生児聴覚スクリーニングにおいて13,709人に自動 ABR 検査を行い、要精検となった乳児に対し ABR、ASSR、COR による精密聴力検査の結果、要精密検査となった23例のうち3例は正常聴力、6例が両側難聴、13例が片側難聴と診断された。3) マウス、モルモットの動物実験系で、CMV 感染細胞の内耳における局在を明らかにした。4) 中和活性を有するヒト型抗 CMV モノクローナル抗体を完全型の抗体として産生し、植物を用いて大量生産するためのホール抗体産生ベクターの構築に成功した。

今までの成果から先天性 CMV 感染による聴覚障害の疫学や臨床像が明らかとなり、厚生労働行政に役立つ基礎データを提供できるものと期待できる。さらに基礎研究として迅速なウイルス検出法の開発、日本人から分離された CMV 血清型の解析、ヒト型抗 CMV モノクローナル抗体の作製を行い、さらに CMV 内耳感染モデルを用い、他覚的聴力検査である聴性脳幹反応を解析し、聴覚障害をきたす動物実験系を確立する。今後は、これらの研究成果を一つ一つ積み重ねていくことで、先天性 CMV 感染症による聴覚障害の発症病理を解明し、予防対策を立案することが可能になると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N, Ishibashi K, Fujieda K, Inoue N, Omori K: Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J Infect Dis* 195(3):782-788, 2007
- 2) Kumar N, McLean K, Inoue N, Moles DR, Scully C, Porter SR, Teo CG: Human herpesvirus 8 genoprevalence in populations at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J Med Virol* 79:52-59, 2007
- 3) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T: Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect* 9:183-191, 2007
- 4) Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukusihma E, Omori K: Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope* 116(11):1991-1994, 2006
- 5) Ueno T, Eizuru Y, Katano H, Kurata T, Sata T, Irie S, Ogawa-Goto K: Novel real-time monitoring system for human cytomegalovirus-infected cells in vitro that uses a green fluorescent protein-PML-expressing cell line. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2806-2813, 2006
- 6) Ishiwata M, Baba S, Kawashima M, Kosugi I, Kawasaki H, Kaneta M, Tsuchida T, Kozuma S, Tsutsui Y: Differential expression of the immediate-early 2 and 3 proteins in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Arch Virol* 151(11):2181-2196, 2006
- 7) Akira Y, Takekoshi M, Morita E, Imai S, Nisizawa T, Hanada N: Production of the Fab fragment corresponding to surface protein antigen of *Streptococcus mutans* serotype c-derived peptide by *Escherichia coli* and cultured tobacco cells. *Journal of Bioscience and*

- Bioengineering 101 (3): 251-256, 2006
- 8) Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, Kuwahata N, Ogawa H, Suzuki Y, Ito J, Omori K: Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae. *Laryngoscope*, 116(10), 1846~1850, 2006
 - 9) 小杉伊三夫, 筒井祥博: 脳発達障害のウイルス感染モデル. *細胞工学*26(1):35-39, 2007
 - 10) 筒井祥博: 個体の発生と脳形成におけるサイトメガロウイルス感受性. *日本周産期・新生児医学会雑誌*42(4):724-732, 2006
 - 11) 筒井祥博: β ヘルペスウイルスの中枢神経系感染. *日本臨牀* 64(増刊3):440-445, 2006
 - 12) 河崎秀陽, Mocarski E S, 筒井祥博: 神経幹細胞におけるシクロスポリンのサイトメガロウイルス感染抑制効果. 免疫の進化—シクロスポリン20年の軌跡 (シクロスポリン学術国際シンポジウム編) 医薬ジャーナル社 pp.215-220, 2006
 - 13) 竹腰正隆, 前田史子: ヒト型モノクローナル抗体の開発 *日本臨牀* 64(増刊3):512-517, 2006
 - 14) 竹腰正隆, 前田史子: 抗体医薬によるウイルス感染症の予防と治療 *PHARMSTAGE* 6(5):30-35, 2006
 - 15) 馬場陽子, 山田奈保子, 大森孝一: 新生児聴覚スクリーニング後に当科を受診した症例の経過. *Audiology Japan* 49(5):425-426, 2006
 - 16) 山田奈保子, 馬場陽子, 小川 洋, 大森孝一: ムンプス両側聾に対し早期人工内耳手術を施行した1例. *Audiology Japan* 49(5):719-720, 2006
2. 学会発表
- 1) Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Koyano S, Omori K: Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. 109th The Triological Society(2006. 5. 19-22, Chicago)
 - 2) Tsutsui Y: Differential susceptibility to cytomegalovirus between mouse embryonic stem cells and neural stem cells. The 6th China Japan International Conference of Virology (2006.6.22-24, Shanghai)
 - 3) Inoue N, Suzutani T, Ogawa H, Koyano S, Baba Y, Yan H, Ishibashi K, Yamamoto Y, Inami Y, Nozawa N, Omori K, Fujieda K, Kurane I: Epidemiology of congenital CMV infection in pediatric patients with severe sensorineural hearing loss: prevalence, viral loads, and genotypes. The 31st International Herpesvirus Workshop (2006.7, Seattle)
 - 4) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nomura Y, Kurata T: Pathogenesis of guinea pig cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. The 31st International Herpesvirus Workshop (2006.7, Seattle)
 - 5) Ueno T, Eizuru Y, Katano H, Kurata T, Sata T, Irie S, Ogawa-Goto K: Establishment of a novel drug susceptibility test using a GFP-PML imaging assay. The 31st International Herpesvirus Workshop (2006.7, Seattle)
 - 6) Ueno T, Katano H, Eizuru Y, Kurata T, Sata T, Irie S, Ogawa-Goto K: A novel real-time monitoring system for HCMV-infected cells in vitro using a GFP-PML-expressing cell line. The 31st International Herpesvirus Workshop (2006.7, Seattle)
 - 7) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: Experimental cytomegalovirus infection of mouse inner ear. 第96回日本病理学会総会 (2007.3.13-15, 大阪)
 - 8) 土田 孝, 金田正昭, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 筒井祥博: サイトメガロウイルス肺炎における上皮—間葉転換 (EMT) の検討. 第96回日本病理学会総会 (2007.3.13-15, 大阪)
 - 9) 小杉伊三夫, 李 立, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: 発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス感染と脳障害発症機構の解析. 第96回日本病理学会総会 (2007.3.13-15, 大阪)
 - 10) 馬場陽子, 大森孝一: 新生児聴覚スクリーニングで発見された中等度難聴児の言語発達について. 第51回音声言語医学会 (2006.10.27, 京都)
 - 11) 大森孝一: 先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究. 平成18年度厚生労働科学研究 感覚器障害研究成果発表会 (研究者向け) (2007.2.7, 東京)
 - 12) 大森孝一: はじめに. 厚生労働科学研究・研究成果等啓発事業による成果発表会 一般公開講座「難聴とウイルス」(2007.3.11, 福島)
 - 13) 大森孝一: きこえの仕組み. 厚生労働科学研究・研究成果等啓発事業による成果発表会 一般公開講座「難聴とウイルス」(2007.3.11, 福島)
 - 14) 錫谷達夫: ウイルスと難聴. 厚生労働科学研究・研究成果等啓発事業による成果発表会 一般公開講座「難聴とウイルス」(2007.3.11, 福島)
 - 15) 小川 洋: 難聴児の手術的治療. 厚生労働科学研究・研究成果等啓発事業による成果発表会 一般公開講座「難聴とウイルス」(2007.3.11, 福島)
 - 16) 馬場陽子: 難聴児とことばの訓練. 厚生労働科学研究・研究成果等啓発事業による成果発表会 一般公開講座「難聴とウイルス」(2007.3.11, 福島)
 - 17) 小川 洋: [教育講演] 先天性サイトメガロウイルス感染と聴覚障害. 福島県生涯教育講座学術講演会 (2007.1.15, 福島)
 - 18) 小川 洋: [特別講演] 先天性サイトメガロウイルス感染と聴覚障害. 信州耳鼻疾患懇話会 (2007.3.15, 松本)
 - 19) 馬場陽子, 山田奈保子, 大森孝一: 新生児聴覚スクリーニング後に当科を受診した症例の経過. 第51回日本聴覚医学会 (2006.9.28-29, 山形)
 - 20) 小川 洋, 馬場陽子, 岡野 渉, 佐藤尚恵,

- 鈴木雪恵, 大森孝一: 聴覚障害児における先天性サイトメガロウイルス感染の関与. 第107回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2006.5.11-13, 東京)
- 21) 小川 洋, 岡野 渉, 佐藤尚恵, 鈴木雪恵, 大森孝一, 馬場陽子: 先天性サイトメガロウイルス感染による聴覚障害. 第55回日耳鼻東北連合学会 (2006.7.22-23, 弘前)
- 22) 大友希和, 山田奈保子, 馬場陽子, 大森孝一: 新生児聴覚スクリーニングで発見された中等度難聴児の言語発達について. 第51回日本音声言語医学会 (2006.10.26-27, 京都)
- 23) 小川 洋, 馬場陽子, 岡野 渉, 鈴木雪恵, 佐藤尚恵, 大森孝一: 聴覚障害児における先天性サイトメガロウイルスおよびGJB2遺伝子変異の関与. 第16回日本耳科学会 (2006.10.19-21, 青森)
- 24) 岡野 渉: 先天性サイトメガロ感染症の動物モデルについて. 平成18年度福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科学教室講演会 (2006.12.9, 福島)
- 25) 大森孝一: 先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究. 感覚器障害研究成果発表会 (研究者向け) (2006.2.16, 東京)
- 26) 大森孝一: [記念講演] 聞こえと話しをつかさどる機能・病気・治療の現状と未来. 福島県中途失聴・難聴者協会設立20周年記念 平成18年度全難聴・全要研東北ブロック大会 (2006.9.9-10, 福島)
- 27) 大森孝一: [ワークショップ セッション2: 耳鼻科領域の研究] 先天性サイトメガロウイルス感染症による聴覚障害の実態調査並びに発症予防を目指した基礎的研究. 第2回感覚器ワークショップ (2006.5.26, 東京)
- 28) 福島永子, 竹腰正隆, 前田史子, 石橋 啓, 錫谷達夫: ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) がコードする Fc リセプターの性状. 第54回日本ウイルス学会 (2006.11.20, 名古屋)
- 29) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 筒井祥博: Experimental cytomegalovirus infection of mouse inner ear: the suppressed expression of cytokines during the enhancement of infection by LPS. 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006.11.20, 名古屋)
- 30) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 李 立, 韓 桂萍, 筒井祥博: [ワークショップ] マウスサイトメガロウイルスの脳神経細胞への感染指向性を決定する要因の解明: 組換えウイルスを用いた早期遺伝子 (m112/113) プロモーター活性の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006.11.19, 名古屋)
- 31) 筒井祥博: [教育講演] 個体の発生と脳形成におけるサイトメガロウイルス感受性. 第42回日本産科・新生児医学会総会および学術集会 (2006.7.9, 宮崎)
- 32) 筒井祥博: [シンポジウム「発達障害の脳科学 Recent Advances in Neurodevelopmental Disorders」]
- サイトメガロウイルス感染による脳発達障害の発生機序 Neuropathogenesis of developmental brain disorders by cytomegalovirus infection. 第29回日本神経科学大会 (2006.7.19, 京都)
- 33) 李 立, 小杉伊三夫, 韓 桂萍, 河崎秀陽, 筒井祥博: 発育期マウスを用いた先天性サイトメガロウイルス内耳感染モデル. 第46回日本先天異常学会学術集会 (2006.6.29, 山形)
- 34) 筒井祥博, 石渡瑞穂, 小杉伊三夫, 河崎秀陽: サイトメガロウイルス前初期抗原 IE2及び IE3の感染培養細胞および発育期脳における発現様式の相違. 第10回日本神経ウイルス研究会学術集会 (2006.6.9, 金沢)
- 35) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 李 立, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: 発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス持続感染と脳障害発症機構の解析. 第95回日本病理学会総会 (2006.5.2, 東京)
- 36) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 筒井祥博: Establishment of experimental cytomegalovirus infection of the developing mouse inner brain. 第95回日本病理学会総会 (2006.5.1, 東京)
- 37) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 李 立, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: サイトメガロウイルス感染におけるシクロフィリンの役割— siRNA を用いた解析. 第95回日本病理学会総会 (2006.5.1, 東京)
- 38) 片野晴隆, 佐藤由子, 筒井祥博, 佐多徹太郎, 前田明彦, 野沢直樹, 井上直樹, 倉田 毅: モルモットサイトメガロウイルスを用いた実験的ウイルス性内耳障害. 第54回日本ウイルス学会学術集会 (2006.11.19, 名古屋)
- 39) 片野晴隆, 佐藤由子, 筒井祥博, 佐多徹太郎, 前田明彦, 野沢直樹, 井上直樹, 倉田 毅: モルモットサイトメガロウイルスを用いた実験的ウイルス性内耳障害. 第54回日本ウイルス学会総会 (2006.11.20, 名古屋)
- 40) 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 入江伸吉, 後藤希代子. GFP-PML 発現細胞株を用いた HCMV モニタリング法. 第54回日本ウイルス学会総会 (2006.11.20, 名古屋)
3. 報道
- 1) 大森孝一: 〈耳の日〉子供と高齢者の難聴について, 難聴とウイルス. 福島民報新聞, 3月3日, 2007.
- 2) 大森孝一: 〈耳の日〉子供と高齢者の難聴について, 難聴とウイルス. 福島民友新聞, 3月3日, 2007.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

難聴の原因となる先天性サイトメガロウイルス感染症の 保存臍帯による診断法の確立 — 標的遺伝子の違いによる検出率の差 —

分担研究者 藤枝 憲二（旭川医科大学小児科）

研究協力者 古谷野 伸（旭川医科大学小児科）

研究要旨

難聴の原因となる先天性サイトメガロウイルス感染症の後方視的診断を可能にするために、保存臍帯を用いた、より精度、信頼度の高い診断法を確立するため、標的遺伝子の違いによる検出率の差を検討した。標的遺伝子はサイトメガロウイルスのエピトープとして重要な glycoprotein B (gB) 遺伝子とウイルスによる変異が少ないと推定される immediate early (IE) 遺伝子である。現在まで臍の緒から IE 遺伝子が検出された例は71例中10例であった。そのうち gB 遺伝子を検出できたのは半数の5例であった。gB 遺伝子は各ウイルス間でそのバリエーションが存在し、ウイルスサブタイプの分類に使われている。gB 遺伝子の検出には、このバリエーションが影響している可能性があり、検出感度のみを考えた場合の標的遺伝子としては IE 遺伝子のほうが gB 遺伝子よりも優れていると考えられた。

A. 研究目的

先天性サイトメガロウイルス感染症は胎児がサイトメガロウイルスに子宮内感染し、精神運動発達遅滞、難聴、血小板減少、肝機能障害などの異常をきたす疾患である。診断は生後3週間以内に新生児にサイトメガロウイルスが感染している事を証明しなければならず、それ以降は診断が不可能であった。そこで我々は日本では日常的に産科病院から贈られる臍帯を利用し、後方視的に子どもが何歳になっても本感染症の診断が可能な検査法を確立した。生後3週間以上経過しても保存臍帯よりサイトメガロウイルス遺伝子が検出されれば先天感染を診断できる事になったのである。しかしながら検出されなかった場合には、検出感度の問題から先天性サイトメガロウイルス感染症を完全に否定する事は出来ない。そこで実際に標的とする遺伝子で検出率に差が出るか否かを検討し、より診断率の高い検査法を確立するため本研究を行った。

B. 研究方法

1. 検体の収集

原因不明の精神運動発達遅滞、難聴の患者、すでに新生児期に先天性サイトメガロウイルス感染症の診断がついている患者、また陰性コントロールのための健康小児のうち、ご家族から臍の緒のご提供にご承諾をいただけた方71名を対象とした。ご提供頂いた臍帯は紫外線で処理したはさみを用い25mg程度を切断・分割し、残りをご家族にお返しした。

2. 臍帯からの DNA の抽出

臍帯約25mgから DNA 抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN) 用いて DNA を抽出、保存する。抽出方法はキットのプロトコールにしたがう。

3. サイトメガロウイルス遺伝子の同定

臍帯から得られた DNA (500ng) をテンプレートとして、PCR 法を用いてサイトメガロウイルス遺伝子の検出を試みる。検出遺伝子は、サイトメガロウイルス遺伝子のうち immediate early (IE) 遺伝子およびウイルス間で変異が報告されている glycoprotein B (gB) 遺伝子を選択した。

用いるプライマーは以下の通りである。

[gB] (gB 遺伝子の増幅は nested PCR)

1st-round :

5'-ATCGCGGATCCATGGAATCCAGGATCTGGT-3'

5'-TTTCCTCGAGGTTACAGACGTTCTCTT-3'

2nd-round :

5'-GGAAACGTGTCCGTCTT-3',

5'-GAAACGCGCGCAATCGG-3'

[IE]

5'-GCTGCGGCATAGAATCAAGGAGCA-3'

5'-GGTTGGTGGTCTTAGGGAAGGCTGAG-3'

また反応条件は

[gB]

1st-round : 94℃ - 30秒、63℃ - 30秒、72℃ - 1分を30サイクル。

2nd-round : 94℃ - 30秒、58℃ - 30秒、72℃ - 30秒を30サイクル。

[IE]

94℃ - 30秒、72℃ - 2分を45サイクル

で行った。

得られたPCR産物はアガロースゲルを用いた電気泳動でバンドを確認後、その塩基配列を蛍光キャピラリーシーケンサーで解析し、サイトメガロウイルス遺伝子であることを確認する。

(倫理面への配慮)

本実験は臍帯よりDNAを抽出するが、ヒトの遺伝子を扱うものではない。しかしながら臍帯という貴重な記念品を一部ではあるが提供して頂く点を考慮し、実際の臍帯提供者の治療には直接結びつかないなどを明記した臍帯提供の同意書を作成し、提供者から同意を得る。尚、臍帯を用いた本研究は旭川医科大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

臍帯を調べることが出来た対象者71名のうち、10名からCMV DNAが検出された。そのうちIE遺伝子が検出されずにgB遺伝子が検出された例はなく、対照的にIE遺伝子が検出されてもgB遺伝子が検出されない例は5例あった。臍帯からの陽性例10名のうち新生児期に診断がついていた患者4名は全例IE遺伝子が検出できたがgB遺伝子は1例検出できなかった。(表1)。

D. 考察

先天性サイトメガロウイルス感染症の診断は生後3週間以内の新生児にサイトメガロウイルスが感染していることを証明する必要があった。しかし保存されている臍帯を利用すれば生後何年を経過していようが、後方視的に診断可能なことが判明し診断に利用されている。しかし臍帯中にサイトメガロウイルス遺伝子が存在すればその診断は確定するが、陰性だった場合はその検査感度の問題から100%、サイトメガロウイルスの先天感染を否定することは出来ない。そこでその検査感度を高め、より信頼度の高い診断法の確立を目指して、標的遺伝子の違いで検出感度に差が出るか否かの検討を行った。

標的遺伝子は、免疫反応のエピトープとして重要なgB遺伝子とウイルス増殖に必要で、各ウイルス間で変異が少ないと推定されるIE遺伝子を選択した。以前の基礎的な研究からIE遺伝子を標的としたPCRでは遺伝子コピー数が10 copy、gB遺伝子は20 copyあれば検出可能なことが判明している。今回の結果はIE遺伝子の検出率は100%で、gB遺伝子は半数の50%しか検出できなかった。この検出率の差は、検出限界感度の差が反映されているとも考えられるが、gB遺伝子の変異によりPCRで検出出来ない可能性が十分考えられる。

したがって臍の緒に限らず臨床検体を用いて、サイトメガロウイルスの存在をPCRによって同定しようとする場合、その標的遺伝子を慎重に選択しないと、結果が大きく変わってくることになる。今回の研究から、臍帯よりサイトメガロウイルスを検出するためにはgBと比較しIE遺伝子が標的遺伝子として優れているというこ

とが出来る。

E. 結論

臨床検体からサイトメガロウイルスの検出のみを目的とする検査系ではgB遺伝子ではなくIE遺伝子を標的遺伝子とすべきである。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(表1)

検体番号	検出遺伝子	
	gB	IE
1	+	+
12*	+	+
15*	+	+
16*	-	+
19	+	+
53	-	+
59	-	+
64	-	+
68	-	+
70*	+	+
合計陽性数	5	10

* 新生児期に診断がついていた例

+ 陽性 - 陰性

聴覚障害児における先天性サイトメガロウイルス感染の頻度

分担研究者 錫谷 達夫（福島県立医科大学医学部微生物）
主任研究者 大森 孝一（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
分担研究者 井上 直樹（国立感染症研究所）
藤枝 憲二（旭川医科大学小児科）
研究協力者 古谷野 伸（旭川医科大学小児科）
小川 洋（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
馬場 陽子（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

聴覚障害児における先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の関与について保存臍帯中の CMV DNA を調査することにより本邦における先天性 CMV 感染による聴覚障害の頻度を明らかにする。平成18年度までに臍帯検査を行った聴覚障害児は67名でそのうち10名においてサイトメガロウイルス DNA が確認された。2歳以下発症の患児について検討すると47名中10名（21.3%）という結果であった。さらにこれら67名に GJB2難聴遺伝子について検査を行った結果、CMV DNA が検出された症例において GJB2遺伝子変異は認められず、合併していた症例はなかった。GJB2遺伝子変異は16名において確認された。CMV 感染に伴う聴覚障害は先天性難聴においてもっとも頻度が高いとされる GJB2遺伝子変異について頻度が高い結果となった。

A. 研究目的

調査によれば出生1,000人から2,000人に1人の割合で高度難聴児が生まれてくるとされている。これは先天性代謝疾患などの他の先天性疾患に比較すると頻度が高く、聴覚障害はすべての先天性疾患のうちでも最も多い疾患の一つである。現在、新生児聴覚スクリーニングが施行されるようになり、多くの難聴児が早期に発見されるようになってきている。先天性難聴は様々な要因で引き起こされるが、先天性難聴の50%は遺伝子の関与によるものという推測がなされている。一方で先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症は胎児が CMV に子宮内感染し、精神運動発達遅滞、難聴、血小板減少、肝機能障害などの異常をきたす疾患であり、感覚器領域では先天性 CMV 感染による聴覚障害が重要な問題となっている。先天性 CMV 感染症は300人に1人の割合で出生し、その5%は顕性感染であり、その40%に難聴が、不顕性感染の10%に難聴が認められることを考え合わせると乳幼児の難聴のおよそ30%が、先天性 CMV 感染症にともなうものであると推測される。すなわち従来原因不明とされてきた新生児、乳幼児の難聴の50%が遺伝子の関与する難聴であり、30%が CMV 感染の関与する難聴であるという推測がなされる。さらに、CMV 感染による難聴は、新生児難聴スクリーニングでは発見されずその後難聴が進行する症例の報告がなされている。先天性 CMV 感染症は、出生直後より何らかの症状がある場合の診断は比較的容易であるが、出生直後に全く症状が無

く、生後3週間を経過してしまった場合は、その後に本疾患を疑っても後天感染との区別が付かない。特に不顕性感染の10%に難聴が存在することを考えると、難聴が発見された時点で出生前の感染であったのか、出生後での感染であったのか従来の検査方法では判別することは不可能であった。われわれのグループにおいて、日本特有の風習として出産の記念に両親が保存している臍帯から PCR 法を用いることにより、CMV 遺伝子を検出する方法1)が開発され、先天性感染の有無について明らかにすることが可能となった。この方法さらに精度の高いものに改良し、本邦において、聴覚障害児における先天性 CMV 感染症の関与に関して臍帯中に存在するサイトメガロウイルス DNA の検出およびウイルスコピー数の計測を行うことにより、その頻度の調査をおこなった。

B. 方法

福島県総合療育センター耳鼻咽喉科、及び福島県立医科大学医学部付属病院において、聴覚障害が確認されており、臍帯検査に同意を得られた患児において、各家庭で保存されていた患児の臍帯をメスで約200mg、5mm程度を切り取り提供していただき、福島医大微生物学教室、および国立感染症研究所において PCR 法により CMV DNA の存在の有無また、CMV の DNA が存在した場合にそのウイルスのコピー数を調べた。

1. 臍帯からの DNA の抽出

臍帯約25mgから DNA 抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN）を用いて DNA を抽出、保存した。抽出方

法はキットのプロトコールにしたがって行った。

2. サイトメガロウイルス遺伝子の同定

A) nested PCR 法

臍帯から得られた DNA (500ng) をテンプレートとして、nested PCR 法を用いてサイトメガロウイルス遺伝子 (糖タンパク H) の検出を試みた。

使用したプライマー

outer primers

5'-TCTAAACAGAATCAGCAACATCTC-3',

5'-CCTTGCGTGTGTCGTATTCTA-3',

inner primers

5'-CAAGAACTCTACCTCATGGG-3',

5'-ATGATGAGGCTCTGGCCTAC-3'.

1st-round : 95°C - 2分の初期ステップ、95°C - 20秒、53°C - 1分、72°C - 40秒を40サイクル、2nd-round : 95°C - 2分の初期ステップ、引き続き95°C - 20秒、48°C - 1分、72°C - 40秒を40サイクル、72°C - 10分の最終ステップの条件で行った。

検出限界は CMV ゲノム10コピーである。

得られた PCR 産物はアガロースゲルを用いた電気泳動でバンドを確認後、その塩基配列を蛍光キャピラリーシーケンサーで解析し、サイトメガロウイルス遺伝子であることを確認した。

陽性、陰性コントロール :

旭川医科大学において本法により、17名の健常小児臍帯における CMV DNA の検討を行いすべての症例において CMV DNA を認めず、4名の顕性 CMV 感染症例の臍帯において4名すべてに CMV DNA が確認された。

B) Real-time PCR 法

IE2もしくは UL83遺伝子を標的としたプライマー (0.2 μM) を用い、95°C 10分の初期ステップ、95°C 30秒及び60°C 1分の増幅ステップを50サイクルまで測定した。定量の標準として、IE2をコードする cDNA を含む発現プラスミド、及び UL83遺伝子全長を PfuI ポリメラーゼを用いて PCR 増幅し pcDNA3にクローニングすることにより構築したプラスミドを使用した。

3. GJB2遺伝子の同定

PCR 法を用いて GJB2遺伝子変異の同定をおこなった。

Primer は

5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC および

5'-GGGCAATGCGTTAAACTGGC、または、

5'-TCCAGAGCAAACCGCCAGAGTAG さらに

5'-TTGCCTCATCCCTCTCATGCTGTC とした。

PCR 産物はアガロースゲルを用いた電気泳動でバンドを確認後、その塩基配列を蛍光キャピラリーシーケンサーで解析した。

BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems).

(聴力評価) 標準純音聴力検査が施行できなかった患児においては他覚的聴力検査法である聴性脳幹反応 auditory brainstem response (ABR)、聴性定常反応 auditory steady-state response (ASSR)、および、より標準純音聴力検査

に近い検査を得ることができる遊戯聴力検査 play audiometry、条件詮索反応聴力検査 conditioned orientation response audiometry (COR) のうち少なくとも2つ以上の検査を組み合わせおこなった。

(倫理面の配慮)

本研究は、福島県立医科大学、旭川医科大学、国立感染症研究所の倫理委員会の承認を受け、検体の提供者もしくはその保護者の書面での同意に基づき行われた。

C. 研究結果

平成16年11月から平成18年12月までに臍帯の提供をうけた聴覚障害児67例の臍帯のうち16例の GJB2遺伝子変異、10例 (15.4%) の臍帯においてサイトメガロウイルス DNA 陽性の結果が得られた。難聴の発症時期を2歳以下で検討すると47例中10例 (21.3%) となりその頻度が上昇した。10例のうち2例は出生時に先天性 CMV 感染症が強く疑われ、出生時の尿、血液検査により先天性 CMV 感染症の診断が得られた、いわゆる顕性感染の症例であった。2例に頭部 CT において脳内石灰化といった先天性 CMV 感染症に認められる画像所見を示した。10例中9例は両側高度の感音難聴を示していたが、1例において、右は ABR, ASSR, COR において高度の感音難聴を示したものの、左は25dB の聴力を示し、一側性の高度感音難聴であった。ウイルスのコピー数を陽性コントロールとした症候性サイトメガロウイルス群と無症候性で今回の臍帯検査でサイトメガロウイルスが同定された群を比較すると、症候性サイトメガロウイルス群のウイルスコピー数が高かった。

D. 考 察

乳幼児期の聴覚障害は発育過程において、言語発達の遅れを引き起こすのみで無く、総合的な発育障害を引き起こすことになり、聴覚障害児の早期発見、早期療育は世界的な規模で重要な課題となっている。欧米や日本においても新生児聴覚スクリーニングの方法が確立され、新生児聴覚スクリーニングが行われ、聴覚障害児の早期発見に力が注がれている。欧米において、先天性 CMV 感染症は頻度が高い感染症であり、聴覚障害の頻度が高いにもかかわらず、特に不顕性感染の場合、現状の新生児聴覚スクリーニングでは発見できない例が存在することがわかってきた。そこで米国においては、アラバマ大学のグループにより、出生時における大規模な先天性 CMV 感染スクリーニングが開始されており、出生時に特に異常所見を認めず、将来聴覚障害の危険性が高いとされる患児の長期的な観察がなされており、先天性 CMV 感染による聴力障害像が明らかにされつつある。

本研究では、本邦において聴覚障害患者における先天性 CMV 感染の関与を示し、従来推測されていた原因不明の聴覚障害の患児における CMV 感染の関与がおおよそ30%であるという推論を支持する結果を示さなかったが、聴覚障害児において少なくとも15%の割合で先天性

CMV 感染が関与していることが明らかとなった。米国において CMV 感染症による難聴は感染したウイルス量が多い場合には聴力障害が高度となり、ウイルス量が少ない場合には聴力障害の程度が少ないという報告がなされている。さらに、先天性 CMV 感染による聴力障害は進行性であったり、変動したりする場合があるという報告や、聴力障害の進行が抗ウイルス剤の投与により改善されたという報告がなされている。CMV 感染による聴覚障害は、遺伝子の関与する難聴と異なり、その発症を予防、あるいは、難聴の進行を阻止できる可能性を持つ聴覚障害である。保存された臍帯を用いて CMV 感染の関与を明らかにすることができれば、症例の蓄積により、先天性 CMV 感染症の頻度や臨床的特徴の調査を進め、先天性 CMV 感染による聴力障害のメカニズムを明らかにし、先天性 CMV 感染による聴力障害の発症予防まで発展させることが可能になるとと思われる。

E. まとめ

聴覚障害児における CMV 感染の関与について保存臍帯の提供をうけた67名について臍帯中の CMV DNA を PCR 法で検査したところ10名において CMV DNA 陽性の結果を得た。この結果は遺伝性難聴でもっとも頻度が高いとされる GJB2 遺伝子変異16名に次いで多い結果となった。2歳以下で聴覚障害を発症した症例で検討すると47名中10名(21.3%)という結果であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Omori K. Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope* 116: 1991–1994, 2006.
- 2) Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N, Ishibashi K, Fujieda K, Inoue N, Omori K. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J. Infect. Dis.* 195: 782–788, 2007.
- 3) 小川 洋, 馬場陽子, 岡野 渉, 佐藤尚恵, 鈴木雪恵, 大森孝一. 聴覚障害児におけるサイトメガロウイルスの関与. 第107回日本耳鼻咽喉科学会総会, 学術講演会 (2006.5.11-13, 東京)
- 4) 小川 洋, 馬場陽子, 岡野 渉, 佐藤尚恵, 鈴木雪恵, 大森孝一. 先天性サイトメガロウイルスによる聴覚障害. 第54回日本耳鼻咽喉科学会東北地方部会連合学術講演会 (2006.7.23-24, 仙台)
- 5) 小川 洋, 馬場陽子, 岡野 渉, 鈴木雪恵, 佐藤尚恵, 大森孝一. 聴覚障害児における先天性サイトメガロウイルスおよび GJB2 遺伝子変異の関与. 第16回日本耳科学会総会学術講演会. (2006.10.19-21, 青森)

2. 学会発表

- 1) Inoue N, Suzutani T, Ogawa H, Koyano S, Baba Y, Yan H, Ishibashi K, Yamamoto Y, Inami Y, Nozawa N, Omori K, Fujieda K, Kurane I. Epidemiology of congenital CMV infection in pediatric patients with severe sensorineural hearing loss: prevalence, viral loads, and genotypes. The 31st International Herpesvirus Workshop (Seattle, 2006)
- 2) Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Koyano S, Omori K. Congenital Cytomegalovirus Infection Diagnosed by Polymerase Chain Reaction With the Use of Preserved Umbilical Cord in Sensorineural Hearing Loss Children. 109th Triological Society Annual meeting (Chicago, 2006.5.19-22)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

福島県における新生児聴覚検査事業の現状

主任研究者 大森 孝一（福島県立医科大学 医学部耳鼻咽喉科）

研究協力者 馬場 陽子（福島県総合療育センター・福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）

研究要旨

福島県は平成16年1月から県中地区の11産科医療機関にて新生児聴覚スクリーニングを開始した。スクリーニングは3年目に入り、県中、県南、会津地区だけでなく、平成19年3月からいわき市地域も加わった。平成19年1月までの3年1ヶ月間に13,709人がAABR（自動聴性脳幹反応検査）によるスクリーニングを受けた。その結果初回（1回目）スクリーニングでrefer（要検査）となったものは162人（1.19%）、確認検査（2回目）でreferとなったものは65人（0.48%）、生後1ヶ月時に行った再確認検査（3回目）でreferとなったものは23人（0.17%）であった。要精密検査となった23例のうち3例は正常聴力、6例が両側難聴、13例が片側難聴と診断された。

A. 研究目的

福島県の新生児聴覚スクリーニングは難聴児の早期発見早期療育を目的に平成16年1月から開始された。昨年までの報告では、7,939人中両側難聴5名、片側難聴8名が確定診断された。平成18年2月から19年1月までにさらに5,770人が受けたので、その結果を報告する。

B. 研究方法

本スクリーニングは十分な説明の元に保護者の同意を得られた新生児に対して行った。検査にはすべて自動聴性脳幹反応検査（AABR）を用いた。初回検査は原則として生後2～5日目に出生した医療機関で実施し、初回検査でreferの場合は日を改めて退院前に確認検査を実施する。確認検査でreferの場合は、1ヶ月健康診査時に再確認検査を行う。低体重出生児や早産などで入院治療を行った場合はその治療が終了した段階で初回検査を実施するものとし、その場合、新生児期を経過していても検査対象とする。再確認検査がreferの場合は精密検査機関に紹介され、耳鼻咽喉科的診察、聴性行動反応検査（BOA）、条件付け聴索反応検査（COR）、精密ABR、聴性定常反応検査（ASSR）などを受け、聴力が確定するまで経過観察される。難聴と診断された場合にはすぐに療育を開始する。

C. 研究結果（表1参照）

平成15年度（平成16年1月から3月）の受検者総数は433名、初回検査pass426名（93.38%）、両側refer2名（0.46%）、片側refer5名（1.15%）であった。確認検査を7名が受検しpass3名（0.69%）、両側refer1名（0.23%）、片側refer3名（0.69%）であった。再確認検査は3名が受検しpass2名（0.46%）、両側refer1名（0.23%）であった。同様に平成16年度は3,170名が受検

し、初回検査pass3,137名（98.96%）、両側refer17名（0.54%）、片側refer19名（0.60%）であった。再確認検査を25名が受検し、pass10名（0.32%）、両側refer9名（0.28%）、片側refer6名（0.19%）であった。再確認検査は23名が受検し、pass14名（0.44%）、両側refer4名（0.13%）、片側refer5名（0.16%）であった。平成17年度は5,275名が受検し初回検査pass5,204名（99.56%）、両側refer20名（0.38%）、片側refer51名（0.98%）であった。確認検査を62名が受検しpass49名（0.94%）、両側refer4名（0.08%）、片側refer9名（0.17%）であった。再確認検査は22名が受検し、pass14名（0.27%）、両側refer3名（0.06%）、片側refer5名（0.10%）であった。平成18年度（H18.4月からH19.1月）は4,831名が受検し、初回検査pass4,751名（98.43%）、両側refer19名（0.39%）、片側refer61名（1.26%）であった。確認検査は68名が受検し、pass53名（1.10%）、両側refer5名（0.10%）、片側refer10名（0.21%）であった。再確認検査は17名が受検し、pass13名（0.27%）、両側refer1名（0.02%）、片側refer3名（0.06%）であった。平成16年1月から平成19年1月までの3年1ヶ月間に13,709人がスクリーニング検査を受け、要精密検査となった23名のうち、精密検査の結果、両側難聴6名（0.04%）、片側難聴13名（0.09%）の診断が確定した。

D. 考 察

平成16年1月から県中地区の8産科医療機関にて新生児聴覚スクリーニングが開始され、平成17年度から県南地区、会津地区でも開始されたため、平成18年度は21医療機関でAABRによる新生児聴覚スクリーニングが施行された。（いわき市地域は平成19年3月からの施行開始であるため現在のところ実績はない。）開始から平成19年1月までの3年1ヶ月間に13,709人がスクリーニング検査を受け、両側難聴6名（0.04%）、片側難聴13名

(0.09%)が診断された。昨年度までの報告と同様両側先天性難聴の発症率0.15%を下回る結果であった。

平成16年度の新生児聴覚スクリーニングで要精密検査となり3ヶ月で両側高度感音難聴の診断が確定した症例は、生後4ヶ月から補聴器の装用を開始し、その装用効果が不十分であったため2歳1ヶ月で人工内耳埋め込みを受けることができた。同年度に診断が確定した別の2例についても近日中に人工内耳手術を予定しており、1歳代で言葉の遅れを主訴に受診した高度難聴児の人工内耳埋め込みが2歳後半から3歳前半になってしまっていることから、新生児聴覚スクリーニングは先天性難聴の早期診断・療育に役立っていると思われる。

E. まとめ

平成16年1月から試行的に開始された福島県新生児聴覚検査事業について報告した。

13,709人が受検し、両側聴覚障害者は6人、片側聴覚障害者は13人であった。平成16年度から療育が開始された症例は生後4から6ヶ月で補聴器装用が開始され、補聴器の装用効果が不良である場合には2歳前半で人工内耳手術が可能となった。当科では新生児聴覚スクリーニングが開始される前に比べ半年から1年人工内耳の装用時期が早まった。

今後、県内ではまだスクリーニングが開始されていない県北、相双地域のスクリーニング開始を平成19年度中に予定している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 馬場陽子, 山田奈保子, 大森孝一: 新生児聴覚スクリーニング後に当科を受診した症例の経過. *Audiology Japan* 49(5):425-426, 2006

2. 学会発表

- 1) 馬場陽子: 新生児聴覚スクリーニング後に当科を受診した症例の経過. 第51回日本聴覚医学会 (2006.9.28, 山形)
- 2) 馬場陽子, 大森孝一: 新生児聴覚スクリーニングで発見された中等度難聴児の言語発達について. 第51回音声言語医学会 (2006.10.27, 京都)
- 3) 馬場陽子: 難聴児と言葉の訓練. 厚生労働科学研究・研究成果等普及啓発事業による成果発表会 (2007.3.11, 福島)
- 4) 馬場陽子: 乳幼児期における聴覚がいの早期発見と対応について. 新生児聴覚検査事業行政事務担当者研修会 (2007.3.15, いわき)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. 福島県における新生児聴覚検査事業

	平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度
事業対象地域	県中地域 (平成16年1月～実施)	県中地域 県南地域 (平成16年4月～実施)	県中地域 県南地域 会津地域 (平成15年5月～実施)	県中地域 県南地域 会津地域 いわき市地域 (平成19年3月～実施予定)
委託医療機関	8	12	21	21
検査実績	* H16. 1～3月分 初回検査 433件 確認検査 7件 (1.62%) 再確認検査 3件 (0.69%) 要精密検査 1件 (0.23%) (結果 正常1)	3,170件 25件 (0.79%) 23件 (0.73%) 9件 (0.28%) (正常1 両側3 片側5)	5,275件 62件 (1.18%) 22件 (0.42%) 8件 (0.15%) (正常1 両側2 片側4)	* H19. 1月まで 4,831件 68件 (1.41%) 17件 (0.36%) 5件 (0.11%) (両側1 片側4)

先天性サイトメガロウイルス感染による 障害発症機構の解析に関する研究

分担研究者 井上 直樹（国立感染症研究所ウイルス1部）

研究要旨

高度難聴における先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染の役割を我々は明確にしてきた。本年度は、すべての先天性感染児が難聴を発症するわけではないことや発症時期が異なることから、特定の性質をもつ CMV 株が先天性感染後の高度難聴発症に関与する可能性について検討した。そのために、難聴患児の臍帯 DNA 中の CMV 株の遺伝子型を3つの遺伝子領域について、後天的に CMV 感染をうけた児の尿中の CMV 株のものと比較した。その結果、3領域ともに難聴患児に顕著な遺伝子型はなく、また、3領域の遺伝子型間にリンクがなかった。このことから、多少の遺伝子的背景の異なる CMV 株であっても、先天性感染により難聴を引き起こすことが明らかになった。

A. 研究目的

1) 高度感音難聴を2才までに発症した乳・幼児の約2割が先天性 CMV 感染によること、2) その頻度は最も頻度の高い遺伝的要因として知られる GJB2 遺伝子変異と同程度であること、3) 先天性 CMV 感染による難聴発症が遅延性・進行性であること、さらに、4) 遅延性の難聴児に感染した CMV 量は出生時に顕性であった場合と比べ少ないことを、我々は明らかにしてきた（詳細は、錫谷らの項参照）。しかしながら、すべての先天性感染児が難聴を発症するわけではないことや発症時期が異なることから、特定の性質をもつ CMV 株が先天性感染後の高度難聴発症に関与する可能性がある。そこで、CMV 株の遺伝子型（ゲノムタイプ）について、先天性感染による難聴症例と後天性感染例間での比較検討を行った。

B. 研究方法

1) 臨床材料 DNA

高度難聴児67例中 CMV 感染を同定した10症例の乾燥臍帯 DNA、出生後自然感染（後天性感染）を受けたと思われる健常小児（6例）、骨髄移植患児（1例）、未熟児（1例）、その他（2例）の尿より精製した DNA を材料として CMV の遺伝子型の比較を行なった。尿からの DNA の精製には、QIAamp Viral RNA kit（QIAGEN）を用いた。

2) リアルタイム PCR 法

CMV DNA の定量には、IE2もしくは UL83 遺伝子を標的としたプライマー（0.2 μM）を用い、95℃10分の初期ステップ、95℃30秒及び60℃1分の増幅ステップを50サイクルまで測定した。定量の標準として、IE2をコードする cDNA を含む発現プラスミド、及び UL83 遺伝子全

長を PfuI ポリメラーゼを用いて PCR 増幅し pcDNA3 にクローニングすることにより構築したプラスミドを使用した。

3) CMV 遺伝子型の解析

リアルタイム PCR により求めたコピー数をもとに、各反応10-100コピーの CMV DNA が存在する条件で PCR により目的領域を増幅した。UL144 遺伝子増幅の第1ラウンドは、5'-TCTCGTA TTACAAACCGCGGAGAGGATG と5'-ACTCAGA CACGGTTCCGTAAAGTGCTTC、第2ラウンドは、5'-TTCCGGTAGGAGGCATGAAG と5'-GTGACTT CATCGTACCGTGA のプライマーセットを用いた。第1ラウンドの条件は、96℃5分の初期ステップ、94℃45秒、55℃45秒及び72℃2分の40サイクル、72℃10分の最終ステップ、第2ラウンドでは94℃3分の初期ステップ、94℃45秒、55℃45秒及び72℃80秒の45サイクル、72℃10分の最終ステップを用いて最終的に577bp 断片を増幅した。gB 遺伝子については、第1ラウンドは、5'-GCAGCA CCTGGCTCTATCG-3' と5'-GCACCTTGACGCTG GTTTGG-3'、第2ラウンドは、5'-GGAAAYTSGA ACGTTTGGC-3' (Y=C/T, S=C/G) と5'-GAAACGC GCGGCAATCGG-3' のプライマーセットを用いた。第1ラウンドは、55℃のところを65℃にした以外は UL144 と同じ条件で行なった。また、第2ラウンドは、94℃2分の初期ステップ、94℃45秒、60℃45秒及び72℃1分の45サイクル、72℃10分の最終ステップで行なった。gH 遺伝子の第1ラウンドは、5'-CCTTCTCTCGGGTGTAACGC-3' と5'-GTAGGTGTTAAGTCTCTG-3、第2ラウンドは、5'-CCACCTGGATCACGCCGCTG-3' と5'-TGT GTTTTCACGCAGGAA-3' をそれぞれプライマーとして用いた。第1ラウンドのサイクルには94℃45秒、55℃45秒及び72℃90秒の40サイクルを、第2ラウンドでは gB と同じ条件で増幅を行った。電気泳動後、目的の DNA

断片を QIAEXII (QIAGEN) を用いて精製後、BigDye Terminator cycle sequencing kit (Applied) にて反応し、キャピラリーシーケンサーにて塩基配列を決定した。すでに、発表され Genbank に登録された各遺伝子型の配列をレフェレンス配列として、ClustalW プログラムを用いて各遺伝子型に分類し、TreeView プログラムにて作図した。

(倫理面の配慮)

本研究は、各医療機関及び国立感染症研究所の倫理委員会の承認を受け、検体の提供者もしくはその保護者の書面での同意に基づき行われた。

C. 研究結果

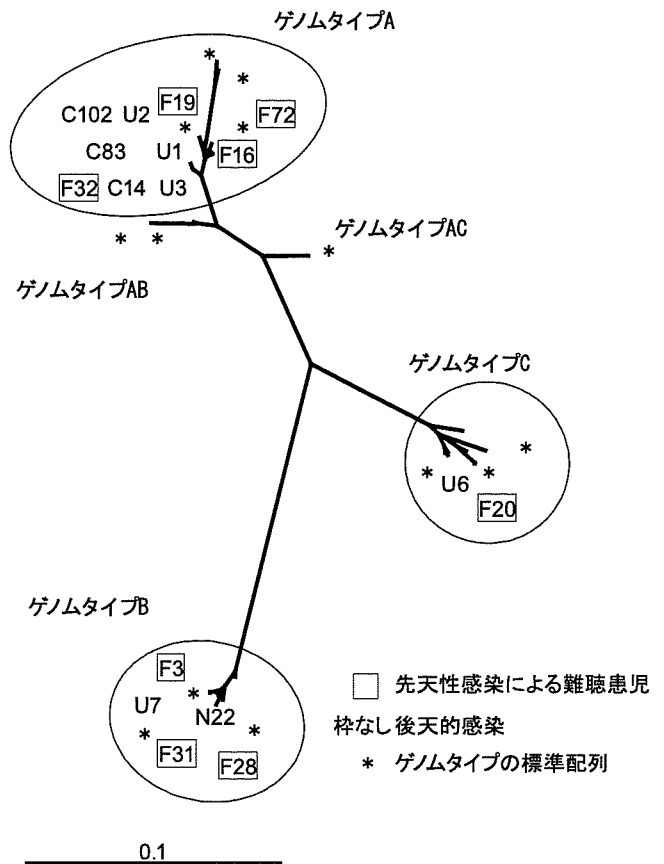
UL144ゲノムタイプの解析ですでに報告されている5つのタイプのうちマイナーな AB、AC は本解析では見られず、A、B、C のいずれかに分類された (図1)。gB 及び gH についても同様の解析を行い、各遺伝子の遺伝子型の分布を明らかにした (表)。その結果、3つの遺伝子領域ともに、後天性感染児と先天性 CMV 感染により難聴を発症した児において、統計学的な有意差は見られなかった。また、最も多様性の大きい UL144 遺伝子の塩基配列はいずれも同一ではなかった。

3つの遺伝子領域の型間には、リンクがなかった。

D. 考 察

いくつかの論文において、CMV 遺伝子型の病原性についての関与が議論され、その有無については賛否両論があったが、本研究では、難聴というこれまで検討されてこなかった「病原性」について検討し、遺伝子型の関与がないという考え方を支持するものとなった。また、CMV を含めヘルペスウイルスの遺伝子配列の保存状況は、RNA ウイルスと比べ極めて高いことから、3 遺伝子領域の遺伝子型間にリンクがなかったことは、遺伝子型のセットとしての特定の株が難聴患者に感染しているわけではないと考察される。従って、今回の結果は、どのような遺伝子的背景を持った株であっても難聴発症の原因に成り得ることを示唆している。ただし、検体数が後天性・先天性ともに限られているために、差が明確にならなかった可能性もあり、今後さらに症例数を増やし検討を行っていく必要があると思われる。

図1 UL144ゲノムタイプピニング



遺伝子領域	遺伝子型	後天性感染 (n = 10)	先天性感染難聴 (n = 10)
UL144	A	6	5
	B	2	3
	C	2	2
gB	1	7	4
	3	3	6
gH	1	5	6
	2	4	4
	解析不可	1	0

E. 研究発表

1. 論文発表

《原 著》

- 1) Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Omori K. Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children. *Laryngoscope* 116: 1991 – 1994. 2006.
- 2) Kumar N, McLean K, Inoue N, D.R. Moles, C. Scully, S.R. Porter, C.G. Teo. Herpesvirus 8 genoprevalence in people at disparate risks of Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 79: 52 – 59. 2007.
- 3) Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N,

Ishibashi K, Fujieda K, Inoue N, Omori K. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J. Infect. Dis.* 195: 782 – 788. 2007.

- 4) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect.* 9: 183 – 191. 2007.

《レビュー》

- 1) L.T. Krug LT, C.G. Teo, Tanaka-Taya K, Inoue N. Newly identified human herpesviruses. pp.197 – 276. *In: (Eds) IW Fong, K Alibek Emerging Infectious Diseases of the 21st Century.* Springer, NY. 2006.

2. 学会発表

- 1) Inoue N, Suzutani T, Ogawa H, Koyano S, Baba Y, Yan H, Ishibashi K, Yamamoto Y, Inami Y, Nozawa N, Omori K, Fujieda K, Kurane I. Epidemiology of congenital CMV infection in pediatric patients with severe sensorineural hearing loss: prevalence, viral loads, and genotypes. *The 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, 2006.*

《レビュー》

- 1) 井上直樹, 野澤直樹 (2006) HCMV のゲノム構造と遺伝子機能. *日本臨床64巻増刊号3* : 377 – 385.
2) 野澤直樹, 井上直樹 (2006) CMV の先天性感染機構. *日本臨床64巻増刊号3* : 446 – 450.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

抗体療法の開発に関する研究

分担研究者 竹腰 正隆（東海大学医学部基礎医学系分子生命科学）

研究要旨

HCMV 感染症の予防と治療用のヒト中和抗体作りをめざしている。主要中和抗原を担う gB と gH に対する抗体作りを主として大腸菌の系を用いて得られた Fab 抗体をホール化して植物で産生する系を昨年度再構築した。今年度はさらに抗体塩基配列を産生するタバコのコードン使用頻度に従って最適化を行い、新しい塩基配列に基づいてヌクレオチドの合成を行った。これらについて植物細胞 BY-1 に導入を行い抗体産生タバコ細胞を得た。

A. 研究目的

現在、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染症の予防と治療には、アシクロビルやガンシクロビルといった核酸アナログが用いられている。薬剤の活性化にはリン酸化が必要だが HCMV は主要なリン酸化酵素であるチミジンキナーゼ遺伝子を持っていない。このため抗ウイルス剤の効果が他のヘルペスウイルス群に比べて弱い。そこでこれらの薬剤とはまった作用機序の異なる抗ウイルス剤として、ヒト中和抗体を用いることができれば、HCMV 感染症の予防と治療に大きな福音となると考えられる。

これまでのところウイルス中和エピトープを担う抗原としては下記の 3 種が存在すると言われている。

中和抗原	糖鎖有	糖鎖無
gB (gCI) UL55	58k-116k	102k
gH (gCIII) UL	75 86k	84k
gN (gCII) UL73	50~60k	15k

本研究では主として主要中和抗原である gB と gH に対する中和抗体の取得を目指した。一方、中和抗原ではないが液性免疫かく乱系として IgG の Fc 領域に結合することによって抗体を排除する Fcγ レセプター遺伝子が近年になって同定された。それは下記の 2 種である。

Fcγ レセプター	糖鎖有	糖鎖無
TRL11	34k	24k
UL119-8	68k	33k

同じヘルペスウイルスグループに属する HSV での研究から、これら Fcγ レセプターに対する中和抗体が存在すると、本来のウイルス中和抗体の効果が増大することが知られている。このため本研究では TRL11 と UL119-8 に対するヒト中和抗体の産生も目指した。

治療用抗体の研究は世界的に盛んに行われている。しかしウイルスに対する抗体の開発はあまり活発とはいえず、実用化されたものは呼吸器感染症の原因となる RSV に対するものだけである。特に HCMV においては中和抗原の多様性が指摘されており、抗体開発には多く

の臨床株のデータが必要と思われる。ヒト抗体で有名なアメリカの抗体開発メーカーの研究者の 1 人は、ウイルスに対する抗体はその知識を保有する大学に責任がある、とまで言う。本研究は HCMV の臨床分離株を多く有する研究者ら（本研究の分担研究者でもある）とのネットワークを活用して、HCMV 感染症の予防と治療に有効なヒト抗体の開発に真摯に取り組むものである。

B. 研究方法

研究法は大きく分けて 2 つからなる。1 つはすでに得られた抗 HCMV 中和ヒト Fab 抗体のホール化である。これは抗体価の高いヒトから得た中和 Fab 抗体をホール抗体 (IgG1) に変換し、植物での大量生産を試みるものである。ホール化することにより、中和抗体価の上昇と血中半減期の増大が期待できる。また生産の場として植物を用いることにより、既存の方法よりも安価にかつ大量に抗体を生産できる利点がある。

もう 1 つの試みは抗原となるタンパク質（中和抗原、Fcγ レセプター）のバキュロウイルスの系を用いた生産である。これら抗原が生産できればヒト抗体産生マウスである KM マウスに免疫することにより、ハイブリドーマ法によってヒト抗体を得ることができる。これら抗原を生産するため大腸菌の系を用いたが、膜タンパク特有の構造の複雑さからか、うまく生産することができなかった。またエレクトロポレーションを用いた DNA 導入で KM マウスを直接免疫したが、抗体価の上昇は認められなかった。このため複雑な折りたたみタンパクの産生が可能なバキュロウイルスの系を用いることにした。

1. ヒト抗体の植物発現ベクターの構築

Fab 中和抗体遺伝子をホール化したクローンについてそれぞれ 2 種類の構築物を作製する。1 種類は抗体遺伝子のみのも、もう 1 種は H 鎖と L 鎖の末端に KDEL という配列を付加した物である。KDEL 配列は産生タンパクの小胞体への輸送を促進し、結果的に産生量の増大は糖鎖の付加を促進すると言われている。KDEL 配列有り無しで抗体の産生量に変化があるかどうかを調べる。

また抗体 1 種類については塩基配列のコドン使用頻度を産生に用いるタバコのそれにあわせて最適化を行い、タバコでの産生量が最大となるように調節する。

KDEL 配列 TCTGAGAAAGATGAGCTCTAG
AGACTCTTTCTACTCGAGATC
SEKDEL*

C. 研究結果

1-1. 植物発現ベクターの構築

抗 HCMV 抗体遺伝子としてクローン13-3と TG252について発現ベクターの構築を行った。KDEL 配列に関してはH鎖とL鎖の3'側に付加した。使用する植物導入用ベクター pTRAcKc-ERH を抗体遺伝子用に改変した pTRAcKc-AN についてもシグナルペプチドに関してはタバコのコドン使用頻度に合わせて改変を行った。

1-2. 抗体遺伝子の改変

クローン13-3については抗体遺伝子をタバコのコドン使用頻度に合わせて改変を行った。下記に実際のL鎖の配列を示す。

《元のL鎖の配列》

GACATCGAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTG
CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGC
AAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGC
AGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGC
TGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTT
AGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCA
TCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTA
CTGTGAGCAGTATGGTAGCTCACCGTGGACGTTCCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAAGTGTGGCT
GCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA
GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGA
GAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA
CAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGA
CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAAC
CATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGTTGA

《改変後のL鎖の配列》

GACATCGAAATGACTCAGTCACCGTCTTCTTTGTCTG
CAAGTGTGGGCGATCGAGTTACAATAACCTGTAGAGC
GAGTCAATCAATTTCTAGCTATCTTAACTGGTACCAGC
AGAAGCCAGGTAAAGCCCCTAAACTCCTGATTTATGC
TGCTAGTTCACGTGCTACAGGGATACCAGATAGGTTCT
CAGGATCCGGGTCCGGTACCGACTTTACATTGACCATT
TCACGTCTTGAGCCAGAAGATTTTCGCTGTTTACTATTG
CCAGCAATACGGAAGTTCCCCTTGGACTTTTGGACAA
GGAAGTAAAGGTGGAAATTAAGGACTGTAGCAGCA
CCTAGTGTTCATCTTTCCACCTAGCGATGAGCAGTT
AAAGAGCGGTAAGTCTCAGTAGTCTGCCTCCTTAAT
AATTTTATCCAAGAGAAGCTAAAGTCCAATGGAAGG
TGGATAATGCATTGCAATCTGGAATTTCTCAGGAGTC

AGTTACTGAACAAGATTCCAAAGATAGTACATACAGCT
TAAGTTCTACCCTTACTTTGTCTAAGGCCGACTATGAG
AAGCACAAAGTGTATGCTTGTGAAGTTACACATCAAG
GTCTGTCTTACCCGTTACAAAGTCCTTTAACAGAGG
CGAGTGTTAA

1-3. タバコ細胞への導入

構築したベクターをアグロバクテリウムを用いてタバコ細胞 BY-2 に導入し、現在抗体産生クローンを選抜中である。HCMV 感染細胞抽出液を用いた ELISA の系において抗体産生クローンが確認されているので、抗体産生株が得られるのは確実である。

2-1. 抗原の作製

中和抗原および Fc γ レセプターの産生に関してこれまでカイコ培養細胞 Sf9 を用いた系での産生を検討してきたが、実験に用いられるような十分な量を得ることが出来なかった。そのため産生量が多いといわれるカイコそのもので産生する系を用いるために、現在ベクターの再構築を行って、まもなくカイコでの生産に入る予定である。

D. 考察

Fab ホール化ベクターおよび植物発現ベクターに関しては、1度は完成したが、制限酵素の設定に不備があり、再度設計をやりなおしたがさらに最適化を目指してクローン13-3については塩基配列の最適化を行った。植物細胞への導入は順調で産生株の分離を行っているところである。産生抗体の活性を確認した。プレリミナリーな結果では KDEL 配列の付加が必ずしも抗体量の増産にはつながっておらず、今後の抗体産生においては KDEL 配列の付加をせずに産生する予定であり、順調に推移している。

抗原タンパクの産生に関しては系を一新してカイコによる生産を試みている。このため分泌シグナルも変更し、発現ベクターの再構築をしている。まもなくカイコでの生産に入るので大量生産は間近である。

E. 結論

植物での抗 HCMV 抗体生産に向けてベクターの改変や抗体遺伝子配列のチューニングを行い、タバコ細胞に最適化させたベクターを構築した。抗体産生細胞株の分離も順調であるので植物による抗体の大量生産はまもなく実現すると思われる。抗原の生産に関してもカイコの系での産生が順調に進んでいるので時間の問題であると思われる。当初の目標をまもなく実現できると思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akira Y, Takekoshi M, Morita E, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Production of the Fab fragment corresponding to surface protein antigen of *Streptococcus mutans* serotype c-derived peptide by *Escherichia coli* and cultured tobacco cells. Journal of Bioscience and