

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 16 年度～平成 18 年度 総合研究報告書

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
	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 福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科	部長 兼務講師
研究協力者	古谷野 伸	旭川医科大学小児科学講座	助手
	石橋 啓	福島県立医科大学医学部微生物学	助手
	福島 永子	福島県立医科大学医学部微生物学	博士研究員
	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	所長
	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 涉	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. 総合研究報告

I. 総括研究報告書

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. 分担研究報告書

1. 臍帯を利用した先天性サイトメガロウイルス感染症診断

藤枝 憲二 …………… 9

2. サイトメガロウイルス分子診断法の確立

錫谷 達夫 …………… 13

3. 聴覚障害児における臍帯を用いた診断法による先天性サイトメガロウイルス感染の実態

小川 洋 …………… 17

4. 保存臍帯より先天性 CMV 感染症が診断された難聴乳幼児の聴力像

馬場 陽子 …………… 21

5. 福島県における新生児聴覚検査事業の現状

馬場 陽子 …………… 24

6. 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 …………… 26

7. 抗体療法の開発に関する研究

竹腰 正隆 …………… 30

8. 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 …………… 33

9. 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

片野 晴隆 …………… 37

10. 動物実験モデルにおける聴覚評価、組織評価方法の確立

小川 洋 …………… 40

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 42

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 47

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 感染がどのよう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。

3年間の研究期間において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（15.4%）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しうると推測された。これらの動物モデルは CMV による聴覚障害の発症機転の解明に寄与するものと考えられた。4) 抗ヒト CMV 中和抗体を、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

胎児期のサイトメガロウイルス（Cytomegalovirus; CMV）感染（先天性 CMV 感染）は全出生児250～300人に1人起こる頻度の高い感染で、その約95%は不顕性感染であるため診断されることなく見過ごされてきた。ところが最近の欧米での研究から、不顕性感染者の約8%は幼児期に進行性の聴覚障害を発症することが解り、新生児・幼児の聴覚障害の約30%は先天性 CMV 感染が原因と推測される。この頻度は、新生児マス・スクリーニングで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。わが国では乳幼児の聴覚障害のうち、先天性 CMV 感染の頻度については調査され

ていない。

先天性 CMV 感染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ない可能性が高い。したがって、新生児聴覚スクリーニングに加え、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開発し、早期発見による聴覚障害重篤化の阻止が望まれる。

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・スクリーニング法を開発を総合的に研究し、聴覚障害予防対策を立案することにある。

B. 研究方法

- (1) 先天性 CMV 感染の診断：先天性 CMV 感染を retrospective に同定する方法として、聴覚障害児の臍帯を nested-PCR 法 real-time PCR 法で調べる。real-time PCR 法ではウイルス量を定量する。
- (2) 新生児聴覚スクリーニング及び精密聴力検査：福島県新生児聴覚検査事業にて、産科施設での自動 ABR を用いた新生児聴覚スクリーニングにより要精密検査となった乳児の精密聴力検査を行う。聴性行動反応検査と条件聴索反射聴力検査にて聴力閾値を測定し、聴性脳幹反応検査と聴性定常状態誘発反応検査にて周波数ごとの聴力閾値を測定する。
- (3) ヒト型抗 CMV モノクローナル抗体の樹立：CMV を中和するヒト型モノクローナル抗体を樹立する。
- (4) CMV 感染による聴覚障害発症機序の解明：マウスやモルモットの実験系を用い、先天性 CMV 感染による聴覚障害発症機序を解析する。

(倫理面への配慮)

各施設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、研究計画に対する説明と同意を得た上で研究を実施する。動物実験は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

- (1) 福島県の聴覚障害児67名の乾燥臍帯を解析した。2歳以下で発症した47名中10名(21%)が先天性 CMV 感染者であった(図1)。(福島医大・耳鼻科、微生物、感染研・ウイルス1部、旭川医大・小児科)
- (2) 福島県で新生児聴覚スクリーニング体制を整備し、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。福島医大・耳鼻科)
- (3) 中和活性を有するヒト型抗 CMV モノクローナル抗体を樹立した。植物でヒト抗体を産生することにも成功した。(東海大医学部・基礎医学系)
- (4) 先天性 CMV 感染による聴覚障害発症機序の解明：モルモット垂直感染モデル、マウス血行感染モデルで蝸牛外リンパ腔領域、らせん神経節に CMV の局在を証明した(図2)。(感染研・病理、浜松医大・病理)

D. 考察

乾燥臍帯を各家庭で大切に保存していることは日本特有の風習であるが、この保存臍帯を用いることで、先天性 CMV 感染を retrospective に診断する独創的な方法により、従来診断することが不可能であった先天性 CMV 感染の診断を可能にし、実態調査を行い、その成果を一流国際誌(J Infec Dis, Laryngoscope)などに発表できたことは、学術的な価値が高いものと思われる。この方法

を用い、聴覚障害者の病因を retrospective に調べ、2歳以下で聴覚障害を発症した患者の21%が先天性 CMV 感染者であることを明らかにした。この頻度は遺伝性疾患である GJB2 による聴覚障害に次ぐもので、先天性 CMV 感染が聴覚障害の病因として重要であることを明らかにできた点は画期的であり大変意義が深い。

わが国における妊婦の抗 CMV 抗体保有率の急激な低下、妊婦が CMV と接触する可能性の高い保育託児施設の普及などにより、欧米同様、CMV 初感染による重症 CMV 感染の増加が懸念されている。

今回の疫学調査で、わが国でも先天性 CMV 感染による聴覚障害は、全ての先天性聴覚障害の中で大きな比重を占めることを明らかにし、行政として聴覚障害対策を立てる必要性が高いことが判明したことから、本研究は大変意義深い。また、遺伝性疾患ではなく感染症であることから、発症予防や重症化防止が可能な疾患であり、早期に聴覚障害対策が実現化しうる。

先天性 CMV 感染による聴覚障害は、全ての先天性聴覚障害の中で大きな比重を占めることが判明したが、聴覚障害への対策はほとんど行われていないうえ、リハビリテーションや人工内耳による聴覚機能の補助・代替法の適応については全く検討されていない。先天性 CMV 感染による聴覚障害は進行性であり、今後は、厚生労働省班研究として、聴覚障害の予後や人工内耳装用効果、言語発達とウイルス動態の総合的解析が必要である。また、発症を予防できる新たな治療法や発症例に対する新しい治療法としての抗体療法の実用化が望まれる。

さらに、先天性 CMV 感染者には精神発達遅滞をきたす例も多く、新生児 CMV スクリーニングそのものを目的とした小児科・産婦人科領域の研究班を厚生労働省として計画する必要がある。

E. 結論

平成16年から18年の感覚器障害研究として福島県の聴覚障害児の病因を疫学調査し、わが国でも聴覚障害児の約2割が先天性 CMV 感染により聴覚障害をきたしていることを突き止めた。この頻度は先天性聴覚障害の中でもっとも頻度の高い GJB2 遺伝子変異に次いで多いものであった。

病態解明における基礎研究ではサイトメガロ感染動物モデルにおいてウイルスがらせん神経節に感染していることを明らかにすることができた。

今回の臨床、基礎両面から総合的にサイトメガロウイルス感染症による聴覚障害について研究を行ったことにより、新たな課題が明らかとなり今後の研究指針をたてることが可能となり、意義深い研究となった。

F. 研究発表

《平成18年度》

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 D R, 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, 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(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: 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樞神経系感染. *日本臨床*64 (Suppl 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, ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩— *日本臨床* 64:512-517, 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回日本産期・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.
- 《平成17年度》
1. 論文発表
- 1) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magruffov A, Yamashita M, Ito J: Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. *Laryngoscope* 115 (2): 253-258, 2005
- 2) Tsuchiya E, Oki J, Yahara N, Fujieda K: Computerized version of the Wisconsin card sorting test in children with high-functioning autistic disorder or attention-deficit/hyperactivity disorder. *Brain Dev* 27: 233-236, 2005
- 3) Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Fujii N: Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 confers efficient viral replication. *Virology* 338: 173-181, 2005
- 4) Kaneko H, Iida T, Aoki K, Ohno S, Suzutani T: Sensitive and rapid detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus DNA by loop-mediated isothermal amplification. *J Clin Microb* 43: 3290-3296, 2005
- 5) Saijo M, Suzutani T, Morikawa S, Kurane I: Genotypic characterization of the DNA polymerase and sensitivity to antiviral compounds of foscarnet resistant herpes simplex virus type 1 (HSV-1) derived from a foscarnet-sensitive HSV-1 strain. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 606-611, 2005
- 6) Matsukage S, Kosugi I, Kawasaki H, Miura K, Kitani H, Tsutsui Y: Replication and viral gene expression of murine cytomegalovirus in mouse embryonic stem cells during the differentiation. *Birth Defects Research A*, 2005 (in press)
- 7) Kosugi I, Kawasaki H, Tsuchida T, Tsutsui Y: Cytomegalovirus infection inhibits the expression of N-methyl-D-aspartate receptors in the developing mouse hippocampus and primary neuronal cultures. *Acta Neuropathol (Berl)* 109(5): 475-482, 2005
- 8) Tsutsui Y, Kosugi I, Kawasaki H: Neuropathogenesis in cytomegalovirus infection: indication of the mechanisms using mouse models. *Rev Med Virol* 15(5): 327-345, 2005
- 9) Han GP, Miura K, Ide Y, Tsutsui Y: Genetic analysis of JC virus and BK virus from a patient with progressive multifocal leukoencephalopathy with hyper IgM syndrome. *Journal of Medical Virology* 76, 398-405, 2005
- 10) Murayama T, Takekoshi M, Tanuma J, Eizuru Y. Analysis of human cytomegalovirus UL144 variability in low-passage clinical isolates in Japan. *Intervirology* 48: 201-206, 2005.
- 11) Maeda F, Takekoshi M, Nagatsuka Y, Aotsuka S, Tsukahara M, Ohshima A, Kido I, Ono Y, Ihara S: Production and characterization of recombinant human anti-HBs Fab antibodies. *J Virol Methods* 127: 141-147, 2005
- 12) Kitaguchi K, Toda M, Takekoshi M, Maeda F, Muramatsu T, Murai A: Immune deficiency enhances expression of recombinant human antibody in mice after nonviral in vivo gene transfer. *Int J Mol Med* 16: 683-688, 2005
- 13) Wang G, Xu H, Wang Y, Gao X, Zhao Y, He C, Inoue N, Chen HD: Higher prevalence of human herpesvirus 8 DNA sequence and specific IgG antibodies in patients with pemphigus in China. *J Am Acad Dermatol* 52(3): 460-467, 2005
- 14) Katano H, Ito K, Shibuya K, Saji T, Sato Y, Sata T: Lack of human herpesvirus 8 infection in lungs of Japanese patients with primary pulmonary hypertension. *J Infect Dis* 191: 743-745, 2005
- 15) Katano H, Hogaboam CM: Herpesvirus-associated pulmonary hypertension? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172: 1485-1486, 2005
- 16) Asahi-Ozaki Y, Sato Y, Kanno T, Sata T, Katano H: Quantitative analysis of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus(KSHV) in KSHV-associated diseases *The Journal of Infectious Diseases* 193: 773-782, 2006
- 17) Krug LT, Teo CG, Tanaka-Taya K, Inoue N: Newly identified human herpesviruses. In: (Eds) IW Fong, K Alibek *Emerging Infectious Diseases of the 21st*

Century. Springer, NY. (in press)

- 18) 馬場陽子, 小川 洋, 大森孝一: 保存臍帯より先天性サイトメガロウイルス感染症が診断された難聴乳幼児の聴力像. *Audiology Japan* 48 (5): 315-316, 2005
 - 19) 大森孝一, 松塚 崇, 宮崎利子, 蛭田みち子, 佐藤優子: 健康診断における騒音性難聴の実態調査 - 木材産業従事者の聴力障害について -. 福島県労働保健センター 平成16年度事業年報 (3): 63-68, 2005.
 - 20) 矢野 明, 竹腰正隆: 〈特集 植物の力をバイオ産業に〉抗体医薬は植物で. *Bionics* 2: 38-44, 2005
2. 学会発表
- 1) Ogawa H, Baba Y, Suzuki Y, Suzuki T, Sato H, Omori K: Value of Multiplanar Reconstruction (MPR) Images for Cochlea Implant. *The Triological Society* (2005. 5. 13-16, Florida)
 - 2) Fukui Y, Yamamoto Y, Yanagi M, Nozawa N, Kurane I, Inoue N: Establishment of a sensitive reporter cell line for human cytomegalovirus. *30th International Herpesvirus Workshop* (2005. 7. 30-8. 4, Finland)
 - 3) Nozawa N, Katano H, Nakamura K, Fukui Y, Yamamoto Y, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N: Construction and application of a recombinant guinea pig cytomegalovirus expressing green fluorescent protein for analyses of the mechanisms of congenital cytomegalovirus infection. *30th International Herpesvirus Workshop* (2005. 7. 30-8. 4, Finland)
 - 4) Nozawa N, Suzutani T, Omori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N: Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. *12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections* (2005. 10. 6-8, Osaka)
 - 5) Nozawa N, Katano H, Nakamura K, Fukui Y, Yamamoto Y, Tsutsui Y, Kurane I, Inoue N: Molecular and pathological characterization of guinea pig cytomegalovirus infection. *12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus* (2005. 10. 6-8, Osaka)
 - 6) Wang GQ, Yamamoto Y, Fukui Y, Nozawa N, Takayama M, Schmid DS, Kurane I, Inoue N: Characterization of VZV promoters and development of reporter cell lines for VZV. *12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus* (2005. 10. 6-8, Osaka)
 - 7) 小川 洋, 鈴木政博, 大森孝一: 左右異なった耳小骨奇形を示した一症例. 第15回日本頭頸部外科学会 (2005. 1. 21-22, 新潟)
 - 8) 小川 洋, 馬場陽子, 鈴木雪恵, 鈴木輝久, 佐藤尚恵, 小澤喜久子, 國井美羽, 横山秀二, 桑畑直史, 今泉光雅, 大森孝一: CTによる人工内耳埋め込み術後蝸牛内電極の評価. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005. 5. 19-21, 大阪)
 - 9) 小川 洋, 岡野 渉, 馬場陽子, 横山秀二, 河野 淳, 大森孝一: 初回手術から15年後に人工内耳再手術を施行した1例. 第67回耳鼻咽喉科臨床学会 (2005. 7. 8-9, 松山)
 - 10) 石島 健, 佐藤宏昭, 横山哲也, 中里龍彦, 黒田 敬, 大森孝一, 小川 洋, 鈴木輝久: 〈教育講演Ⅲ〉上半規管・後半規管裂隙症候群の検討. 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 (2005. 7. 23-24, 仙台)
 - 11) 石島 健, 佐藤宏昭, 横山哲也, 大森孝一, 小川 洋, 鈴木輝久: 上半規管・後半規管裂隙症候群の検討. 第15回日本耳科学会 (2005. 10. 20-22, 大阪)
 - 12) 小川 洋, 馬場陽子, 岡野 渉, 佐藤尚恵, 鈴木雪恵, 大森孝一: 難聴児臍帯からのサイトメガロウイルスの同定. 第15回日本耳科学会 (2005. 10. 20-22, 大阪)
 - 13) 桑畑直史, 小川 洋, 岡野 渉, 馬場陽子, 横山秀二, 河野 淳, 大森孝一: 人工内耳長期留置後に皮弁壊死により再挿入術を要した1例. 第15回日本耳科学会 (2005. 10. 20-22, 大阪)
 - 14) 山田奈保子, 馬場陽子, 大友希和, 佐場野優一, 鈴木かおる, 大森孝一: 小児難聴の評価における聴性定常反応検査 (ASSR) の有用性について. 第50回日本音声言語医学会 (2005. 10. 27-28, 横浜)
 - 15) 山田奈保子, 馬場陽子, 大友希和, 大森孝一: 小児難聴の評価における聴性定常反応検査 (ASSR) の有用性について. 福島県生涯教育講座学術講演会 (2005. 10. 25, 福島)
 - 16) 筒井祥博, 鈴木弘美, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 韓 桂萍: 〈ワークショップ〉神経幹細胞へのマウスサイトメガロウイルスの潜伏感染の可能性. 第53回日本ウイルス学会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
 - 17) 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: the establishment of infection via the immunomodulation by lipopolysaccharide. 第53回日本ウイルス学会 (2005. 11. 20-22, 横浜)
 - 18) 韓 桂萍, 三浦克敏, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 筒井祥博: Epidermal growth factor (EGF) によるマウス脳内のサイトメガロウイルス感染感受性の亢進. 第53回日本ウイルス学会学術集 (2005. 11. 20-22, 横浜)
 - 19) 松影昭一, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 筒井祥博: ES細胞の分化とサイトメガロウイルス (CMV) 感染感受性の定量的解析. 第45回日本先天異常学会学術集会 (2005. 7. 14-16, 東京)
 - 20) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 土田 孝, Han Gui Ping, 筒井祥博: 発育期脳におけるサイクロフィリン発

- 現とサイトメガロウイルス感染感受性との関連.
第9回日本神経ウイルス研究会研究集会
(2005.6.11, 浜松)
- 21) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 土田 孝, 松影昭一,
韓 桂萍, 筒井祥博: 発育期脳におけるサイトメ
ガロウイルス感染感受性とサイクロフィリン発現と
の関連. 第94回日本病理学会総会 (2005.4.14-15,
横浜)
- 22) 松影昭一, 河崎秀陽, 土田 孝, 小杉伊三夫,
筒井祥博: ES 細胞の分化におけるサイトメガロウ
イルス (CMV) 前初期遺伝子発現と感染感受性の
定量的解析. 第94回日本病理学会総会
(2005.4.14-15, 横浜)
- 23) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 土田 孝, 松影昭一,
筒井祥博: 発育期サイトメガロウイルス感染と脳
障害発症機構の解析 - 感染神経細胞における
NMDA レセプター発現の抑制 -. 第94回日本病
理学会総会 (2005.4.14-15, 横浜)
- 24) 井上直樹, 野澤直樹, 倉根一郎: ヒトサイトメガ
ロウイルス (HCMV) 及び水痘帯状疱疹ウイルス
(VZV) の力価の迅速測定用レポーター細胞の樹立.
第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005.11.20-22,
横浜)
- 25) 野澤直樹, 片野晴隆, 筒井祥博, 倉根一郎,
井上直樹: モルモットサイトメガロウイルス感染
動物モデルを利用するための分子生物学的方法の
構築と緑色蛍光蛋白質を発現する組換えウイルス
の作製. 第53回日本ウイルス学会学術集会
(2005.11.20-22, 横浜)
- 26) 馬場陽子: 〈講演〉先天性難聴の診断と療育につ
いて. 新生児聴覚検査事業説明会 (2005.2.18,
白河)
- 27) 馬場陽子: 〈講演〉新生児聴覚スクリーニングに
ついて. 会津産婦人科懇話会 (2005.2.24, 会津
若松)
- 28) 馬場陽子: 〈講演〉新生児聴覚スクリーニングに
ついて. 会津若松市小児科医研修 (2005.3.2, 会
津若松)
- 29) 馬場陽子: 〈講演〉新生児聴覚スクリーニング検
査の意義と先天性難聴の診断, 療育について. 新
生児聴覚検査事業, 検査事務担当者 (技術者) 研
修会 (2005.4.9, 会津若松)
- 30) 馬場陽子: 〈講演〉聴覚障がい早期発見の方法に
ついて~新生児期から3歳児健康診査まで. 新生
児聴覚検査事業行政事務担当者研修会
(2005.11.24, 郡山)
- 31) 小川 洋: 〈講演〉高度感音難聴に対する人工内耳.
平成17年度第2回福島県医療福祉機器研究会及び
医療福祉現場ニーズ発表会 (2005.11.24, 郡山)
- 32) 小川 洋: 〈講演〉聴覚障害児における先天性サイ
トメガロ感染症の関与. 平成17年度福島県立医科
大学医学部耳鼻咽喉科学教室講演会 (2005.12.10,
福島)
- 33) 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
(2006.2.16, 東京)
3. その他
- 1) 第1回福島県日耳鼻補聴器相談医認定講習会
主催 (2005.11.13, 郡山) 大森孝一: 会長〈講義及
び実習指導〉聴覚検査と補聴器, 補聴効果の診断,
補聴器の種類と機能, フィッティングの調整手段,
最新の補聴器とその価格, 装用指導, 福祉医療と
相談, 関連法規, 補聴器特性測定, 耳型採型
- 2) 平成17年度福島県新生児聴覚検査事業推進会議
大森孝一: 会長
第1回 (2005.9.13, 福島)
第2回 (2006.3.13, 福島)
新生児聴覚検査事業検査事務担当者 (技術者) 研
修会
2005.4.9, 会津若松
2005.12.19, 会津若松
2005.12.22, 郡山
新生児聴覚検査事業行政事務担当者 (保健師) 研
修会
2005.11.24, 郡山
- 3) 感覚器障害研究事業 CMV 聴覚障害研究班
班会議. 研究成果発表 [実態調査, 基礎的研究],
研究成果統括, 今後の共同研究の進め方
(2006.1.23, 東京)
- 4) 大森孝一: 新生児難聴検査事業について
「耳の日」記事 福島民報 (2006.3.3, 日刊)
「耳の日」記事 福島民友 (2006.3.3, 日刊)
- 《平成16年度》
1. 論文発表
- 1) Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim TS, Kita T,
Dong Y, Endo T, Iguchi F, Naito Y, Omori K, Ito J :
Expression of β -catenin in developing auditory
epithelia of mice. Acta Otolaryngol(Stockh) 124,
Suppl 551, 18-21, 2004
- 2) Kim TS, Nakagawa T, Lee JE, Fujino K, Iguchi F,
Endo T, Naito Y, Omori K, Lefebvre PP, Ito J: Induction
of cell proliferation and β -catenin expression in rat
utricle *in vitro*. Acta Otolaryngol(Stockh) 124, Suppl
551, 22-25, 2004
- 3) Fujino K, Kim TS, Nishida AT, Nakagawa T, Omori K,
Naito Y, Ito J: Transplantation of neural stem cells into
explants of rat inner ear. Acta Otolaryngol(Stockh)
124, Suppl 551, 31-33, 2004
- 4) Kim TS, Kojima K, Nishida AT, Tashiro K, Lee JE,
Fujino K, Nakagawa T, Naito Y, Omori K, Lefebvre P,
Ito J : Expression of calretinin by fetal otocyst cells
after transplantation into damaged rat utricle explants.

- Acta Otolaryngol(Stockh) 124, Suppl 551, 34-383, 2004
- 5) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Endo T, Kim TS, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. Acta Otolaryngol(Stockh) 124, Suppl 551, 43-47, 2004
 - 6) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim TS, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. Acta Otolaryngol(Stockh)124, Suppl 551, 65-68, 2004
 - 7) 村上正文, 大森孝一: 福島県新生児聴覚検査事業の試行について. 福島県医師会報66(2), 133-135, 2004
 - 8) 馬場陽子, 佐藤尚恵, 大森孝一: 精神運動発達遅滞を伴った先天性サイトメガロウイルス感染症幼児の聴力像. Audiology Japan 47(5), 375-376, 2004
 - 9) 松井隆道, 大谷 巖, 小川 洋, 鈴木聡明: 13トリソミー症候群の側頭骨病理 - 2症例の報告と文献的考察 -. Otology Japan 14(2), 201-205, 2004
 - 10) 大谷 巖, 馬場陽子, 鈴木聡明, 桑畑直史, 大森孝一: 第18番染色体短腕欠損症候群症例の側頭骨病理. Otology Japan 14(5), 665-667, 2004
 - 11) 小澤喜久子, 小川 洋, 大森孝一: アブミ骨陥入が認められた外リンパ嚢例 - マルチスライス CTの有用性 -. 耳鼻咽喉科臨床97(5), 399-404, 2004
 - 12) Kaneko H, Mori S, Suzuki O, Iida T, Shigeta S, Abe M, Ohno S, Aoki K, Suzutani T: The cotton rat model for adenovirus ocular infection: antiviral activity of cidofovir. Antivir Res 61, 63-66, 2004
 - 13) Yokota S, Yokosawa N, Okabayashi T, Suzutani T, Miura S, Jimbow K, Fujii N: Induction of suppressor of cytokine signaling-3 by herpes simplex virus type 1 contributes to inhibition of the interferon signaling pathway. J Virol 78(12), 6282-6286, 2004
 - 14) Kimura K, Ishioka K, Hashimoto K, Mori S, Suzutani T, Bowlin TL, Shigeta S: Isolation and characterization of NMSO3-resistant mutants of respiratory syncytial virus. Antivir Res 61, 165-171, 2004
 - 15) Hashimoto K, Graham BS, Ho SB, Adler KB, Collins RD, Olson SJ, Zhou W, Suzutani T, Jones PW, Goleniewska K, O'Neal JF, Peebles, Jr RS: Respiratory syncytial virus in allergic lung inflammation increases Muc5ac and Gob-5. Am J Respir Crit Care Med 170, 306-312, 2004
 - 16) Hashimoto K, Graham BS, Geraci MW, FitzGerald GA, Egan K, Zhou W, Goleniewska K, O'Neal JF, Morrow JD, Durbin RK, Wright PF, Collins RD, Suzutani T, Peebles, Jr RS: Signaling through the prostaglandin I² receptor IP protects against respiratory syncytial virus-induced illness. J Virol 78(19), 10303-10309, 2004
 - 17) Koyano S, Araki A, Hirano Y, Fujieda K, Suzutani T, Yagyu K, Muroto K, Inoue N: Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. Pediatr Infect Dis J 23(5), 481-482, 2004
 - 18) Li RY, Kosugi I, Tsutsui Y: Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in mouse brain after transplantation of the neural stem cells. Acta Neuropathol 107, 406-412, 2004
 - 19) 筒井祥博: サイトメガロウイルス感染症における神経病原性の発生機序. 日本病理学会会誌93(2), 59-77, 2004
 - 20) Tachibana H, Takekoshi M, Cheng XJ, Nakata Y, Takeuchi T, Ihara S: Bacterial expression of a human monoclonal antibody-alkaline phosphatase conjugate specific for *Entamoeba histolytica*. Clin Diagn Lab Immunol 11(1), 216-218, 2004
 - 21) Yano A, Maeda F, Takekoshi M: Transgenic tobacco cells producing the human monoclonal antibody to hepatitis B virus surface antigen. J Med Virol 73, 208-215, 2004
 - 22) Yano A, Takekoshi M: Transgenic plant-derived pharmaceuticals - the practical approach? Expert Opin Biol Ther 4(10), 1565-1568, 2004
 - 23) Katano H, Pesnicak L, Cohen JI: Simvastatin induces apoptosis of Epstein-Barr Virus (EBV) -transformed lymphoblastoid cell lines and delays development of EBV lymphomas. Proc Natl Acad Sci USA 101(14), 4960-4965, 2004
 - 24) Katano H, Ali MA, Patera AC, Catalfamo M, Jaffe ES, Kimura H, Dale JK, Straus SE, Cohen JI: Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation. Blood 103(4), 1244-1252, 2004
 - 25) 古谷野 伸: 臍の緒を利用した診断技術. 北海道小児科医会編「こどもクリニック」北海道医師会, 札幌, 148-149, 2004
2. 学会発表
なし
 3. 報 道
 - 1) 先天性聴覚障害発見治療へ研究. 福島民報新聞, 2004. 11. 25日刊
 - 2) 新生児の聴覚検査. 読売新聞福島地域版, 2004. 3. 13日刊
- 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

臍帯を利用した先天性サイトメガロウイルス感染症診断

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臍の緒を用いた後方視的診断法を確立し、健康小児、精神運動発達遅滞患者、難聴患者など合計71名の臍帯を調べた。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) 遺伝子を選択した。71名の検査対象者のうち陽性例は10例で、それらはすべて IE 遺伝子が陽性であった。しかし gB 遺伝子はそのうち5名からしか検出されず、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。

また検出された10名のうち出生後すぐに症状があった例は4例で、残りの6例は無症候性であった。出生時無症候性だった6名は何らかの先天感染が疑われていたものの原因不明の難聴、精神運動発達遅滞とされており、臍帯による後方視的診断の有用性が確認された。

健康小児11名からサイトメガロウイルスが検出された例はなかった。

聾学校生徒23名からは2名の陽性者が確認された。23名のうち兄弟も難聴患者で、遺伝性疾患が強く疑われる生徒が7名おり、その7名を除くと12.5%（16名中2例）が先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴であった。したがって難聴患者の原因として同疾患は社会的に大きなインパクトを持つと考えられた。

以上のように、臍帯による後方視的診断法は、先天性サイトメガロウイルス感染症の実態を把握するにはきわめて有用な検査法と考えられ、この方法を用いた研究によりさらに同感染症の詳細を明らかにし、治療法、予防法の確立に努めていく必要があると思われる。

A. 研究目的

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の子宮内感染により、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。本感染症は生後3週間以内にサイトメガロウイルス感染を証明すれば診断が確定する。しかし出生直後に全く症状がなく生後3週間を経過してしまった場合は、後天感染との区別が付かないため確定診断が不可能である。

そこで我々は先天感染の有無を診断する方法として、日本では出産の記念に日常的に贈られる臍帯に着目し、それを用いた診断法を確立することを目的とした。臍帯は出生時の赤ちゃんの状態をそのまま保存していると考えられ、もし臍帯よりサイトメガロウイルス遺伝子が検出されれば、先天感染の証明になりうる。またこの診断法が確立されれば、今まで原因不明とされた精神運動発達遅滞や難聴患者の中に先天性サイトメガロウイルス感染症によるものを同定でき、さらには先天性サイトメガロウイルス感染症の真の有病率や臨床像などを調べる新たな方法となりうると思われる。

B. 研究方法

1. 検体の収集

臍帯は確定診断された先天性サイトメガロウイルス感染症患者、精神運動発達遅滞患者、聾学校生徒、生来健康な小児などから提供していただいた。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・分割し研究に用いた。残った臍帯はご家族にお返した。

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 を抽出した。抽出方法はキットのプロトコールに従った。

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た。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'-TTTCCTCGAGGTTTCAGACGTTCTCTT-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クエンサーで解析し、サイトメガロウイルス遺伝子であることを確認した。

(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、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

1. 確定診断された先天性サイトメガロウイルス感染症例での検討

2002年3月出生の男児。40週2日で胎児仮死のため緊急帝王切開で出生した。出生体重は2,524g、アプガースコアは8点/1分であった。生後すぐに新生児感染症が疑われ、髄液検査を含む検査が行われた。白血球数の増加、CRP値の上昇があり抗生剤が投与された。その後は順調に経過し退院となっている。

4ヶ月時に体重増加不良と筋緊張の亢進があり頭部CTを撮影したところ左側頭葉の欠損、脳内石灰化を認めたため、先天性サイトメガロウイルス感染症が疑われた。新生児期に採取されていた髄液が保存されていたため、髄液中のサイトメガロウイルス DNA の検出を試みたところ、 2.0×10^2 copy/ml のサイトメガロウイルス DNA が検出された。この結果より先天性サイトメガロウイルス感染症の診断が確定した。

本患児のご両親より同意をいただき、保存臍帯の一部を提供して頂いた。またコントロールとして生来健康な小児、2名よりやはり同意を得た後に臍帯の一部を提供して頂いた。

《PCR 結果》

先天性サイトメガロウイルス感染症患児より提供頂いた臍帯から抽出した DNA から、glycoprotein B (gB) 遺

伝子の検出を試みた。図1のように、375bpのバンドが検出された(レーン5、矢印)。しかし健康小児2名の臍帯からは検出されなかった(レーン3、4)。レーン1はマーカー、レーン2はDNAを入れていない陰性コントロールである。

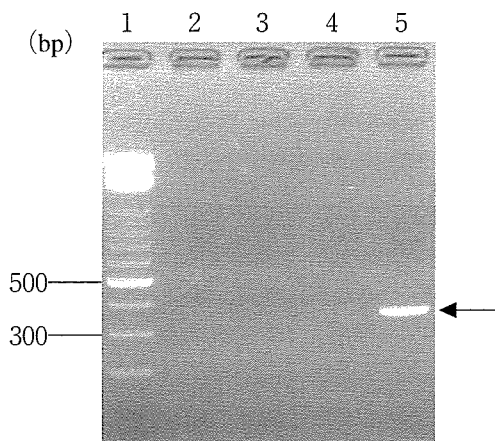


図1

《塩基配列の確認》

検出されたバンドの塩基配列をキャピラリーシークエンサーで解析したところ、バンドがサイトメガロウイルス gB の塩基配列である事を確認した。

2. 保存臍帯による診断法の検出感度の検討

先天性サイトメガロウイルス感染症患者臍帯からのウイルス DNA 検出の精度をあげるため IE 遺伝子を標的とした PCR の系を確立し、gB 遺伝子と比較した。

その結果、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例検出出来なかった。(表1)。

(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

3. 聾学校児童における先天性サイトメガロウイルス感染症の頻度

IE 遺伝子を標的とした PCR 法を用い、先天性サイトメガロウイルス感染症がどのくらいの頻度で検出されるかを検討した。臍帯は北海道内の聾学校3校（合計児童数78名）より、合計23名から集めることが出来た。そのうち兄弟にも難聴患者がいる（遺伝性疾患による難聴が強く疑われる）例が7名いた。

サイトメガロウイルス遺伝子が臍帯より検出された例は2例であった。共に両側性の高度難聴を呈していた。

サイトメガロウイルス陽性例は全体の8.7%であったが、遺伝性の難聴が強く疑われる児童を除くとサイトメガロウイルス遺伝子陽性率は12.5%となり、原因の特定できていない難聴のうちの1割強が本感染症に起因すると推定された。（表2）

（表2）

	検体数 (a)	難聴兄弟例 (b)	(a)-(b)	CMV DNA 陽性例
聾学校A	14	5	9	0
聾学校B	5	0	5	1
聾学校C	4	2	2	1
計	23	7	16	2

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る。現在報告されている本感染症の頻度からすると、1万人の新生児から無症候性を含めて約100人弱の感染が見つかり、症候性感染はそのうちの1割弱となる。残る90名程度の無症候性新生児のうち、後に精神運動発達遅滞や難聴などの障害が顕在化する例が1割程度いると推定されており、今まではこのような患者の診断が不可能であった。

そこで以上の問題点を解決する方法として、多くの日本人が産科病院から出産の記念に贈られている臍の緒を利用することが可能かを検証した。臍帯が利用できればたとえ患者が現在20歳になっていたとしても後方視的に診断が可能となる。したがって疑っていても確定診断が出来なかった患者の診断を付けることで、効率的に先天性サイトメガロウイルス感染症例を集めることが可能となる。

今回、すでに診断の確定している男児の臍帯よりサイトメガロウイルス DNA を検出することに成功した（図1）。また健康小児の臍帯からは検出されなかったことから、原因不明の難聴や精神運動発達遅滞患者の臍帯を検査することで本感染症の診断を後方視的に付けていくことが可能なことを明らかにした。原因不明の難聴や精神運動発達遅滞患者の診断を確定させることで遺伝的因子を否定できる有用性に加え、その臨床像を検討することで、聴力や神経学的予後を左右するのはどのような因

子なのか、治療を積極的に行うべき症例をどのように選択していくべきなのかなどの疑問に解答が得られると考えられる。

しかし研究を進めていくうちに、サイトメガロウイルスの先天感染が証明されている子供の臍帯からウイルス DNA が検出できない例を経験した。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、完全に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須で、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。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。この差は gB 遺伝子のバリエーションにより PCR で検出出来ない可能性が考えられた。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事が明らかとなった。

本法を用いて聾学校児童の難聴原因に先天性サイトメガロウイルス感染症がどれだけの頻度で関与しているかを検討した。

集めることができた検体数は23で、そのうち陽性例は2検体（8.7%）であった。臍帯を提供して頂いた児童の中で兄弟も難聴であるという、何らかの遺伝性疾患による難聴と推定される児童は7名おり、この7名を除くと、聾学校に通う難聴児童のうち12.5%が本感染症による難聴となる。つまり遺伝性疾患を除外した難聴患者の約1割が本感染症による難聴ということになる。全国の聾学校に通う児童・生徒のうち1割程度がサイトメガロウイルス感染症に起因する難聴とすると、本感染症の克服は社会保健上、きわめて重要な事項と考えなければならない。

以上のように臍帯を用いた先天性サイトメガロウイルス感染症の研究は、その真の臨床像を明らかにしていく上で極めて有効な手段と考えられた。

E. 結 論

1. 保存臍帯を用いた先天性サイトメガロウイルス感染症の後方視的診断法を確立した。
2. 検出率を考慮すると標的遺伝子は IE 遺伝子が優れていた。
3. 聾学校生徒の約1割が先天性サイトメガロウイルス感染症による難聴であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyano S, Araki A, Hirano Y, Fujieda K, Suzutani T, Yagyu K, Muro K, Inoue N. Retrospective Diagnosis of Congenital Cytomegalovirus Infection Using Dried Umbilical Cords. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 23: 481-482, 2004
- 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

2. 学会発表

- 1) 古谷野伸, 藤枝憲二「臍帯を用いた後方視的先天性サイトメガロウイルス感染症の診断」第7回北海道ウイルス感染症セミナーの会 (2004.9.11, 札幌)
- 2) 古谷野伸, 藤枝憲二「先天性サイトメガロウイルス感染症の実態把握と早期介入」第7回北海道出生前診断研究会 (2004.11.20, 札幌)
- 3) Nozawa N, Suzutani T, Omori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N. Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. 12th International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, Osaka, October 6-8, 2005.
- 4) 錫谷達夫, 古谷野伸「聴覚障害の主要原因としての先天性サイトメガロ感染症」第80回日本感染症学会 (2006.4.20-21, 東京)
- 5) 顔海念, 古谷野伸, 錫谷達夫, 野沢直樹, 倉根一郎, 牛島廣治, 井上直樹「先天性及び後天性感染においてサイトメガロウイルス遺伝子型に差はあるか?」第54回日本ウイルス学会 (2006.11.19-21, 名古屋)
- 6) 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.

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

サイトメガロウイルス分子診断法の確立

分担研究者 錫谷 達夫（福島県立医科大学医学部微生物学）

研究協力者 福島 永子（福島県立医科大学医学部微生物学）

研究協力者 石橋 啓（福島県立医科大学医学部微生物学）

研究要旨

ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）分子診断のターゲットとして、株間の多形性が少ない糖タンパク H（glycoprotein H）を選択し、検討した。日本人から分離された3株と GenBank に登録されている15株の gH 遺伝子アラインメントから、多形の少ない C 末端側の部位をターゲットに選定した。nested PCR 法、real-time PCR 法、LAMP 法を用いた DNA 検出系を作成したところ、それぞれの感度は 5、10、100 コピーであった。

A. 研究目的

近年、DNA ウイルスであるヘルペスウイルスに、株間でかなり多形性の高い遺伝子が存在すると報告されてきた。ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）遺伝子中にも非常に多形性の高い遺伝子が存在し、たとえば糖タンパク N では 50%、糖タンパク O では 46%、UL144 では 33% のアミノ酸に多形が存在する。本課題の中心となる研究は、聴覚障害児の乾燥臍帯から HCMV のゲノムを検出し、先天性サイトメガロウイルス感染を後方視的に確定診断することであるが、上記の事実は、感度の良い偽陰性の少ない DNA 診断には、多形の少ない部位をターゲットとした分子診断法が重要であることを示唆している。そこで本研究では、日本人から分離された HCMV 株のシーケンスと GenBank に登録されているシーケンスを基に、多形が少ないことが知られている糖タンパク H 遺伝子（glycoprotein H; gH）の中からさらに多形の少ない部位を同定し、そこをターゲットとした分子診断法を確立する。

B. 研究方法

1. ウイルス株とシーケンス：

日本人から分離された HCMV 3 株、GenBank に登録されている 15 株の gH 遺伝子のシーケンスを用いて解析した。

2. gH 遺伝子のクローニング：

検査の感度の決定や定量 PCR の標準として用いる DNA として、AD169 株 gH 遺伝子の一部をクローニングした。nested PCR 用に設計、合成した outer primer set（cmvgH-NP-OF、cmvgH-NP-OR; 図 1）を用い、PCR で gH 遺伝子の一部を増幅後、T-cloning 法によって pGEM-T にクローニング。シーケンスを確認後、プラスミドはキアゲンのカラムを用いて精製し、吸光度から遺伝子の濃度を決定して用いた。

C. 研究結果

1. ターゲット部位の決定とプライマーの設計：

HCMV gH 遺伝子は多形の少ない遺伝子として知られている（多形の存在するアミノ酸は 4.5%）。そこで、合計 18 株の gH 遺伝子のアラインメントを作成した。その結果、多形は N 末端側に多く、C 末端側は比較的構造が保たれていることが明らかとなったので、DNA 診断のターゲットとしてここを選択した（図 1）。この部位に感度の高い nested PCR 法、ゲノム量を定量出来る real-time PCR 法、最近開発された PCR 法より簡便な Loop-mediated isothermal amplification（LAMP）法を用いた DNA 診断法を設計した。なお、real-time PCR のプライマー並びにプローブの設計には ABI 社ホームページ上に、LAMP のプライマーの設計には栄研化学のホームページ上に公開されているソフトを用いた。それぞれのプライマーの位置とシーケンスは図 1、表 1 のとおりである。

nested PCR 用のプライマーは多形の存在する部位をさけて設計することが可能であったが、real-time PCR のプライマー中にはそれぞれ 1 カ所の多形が存在する。特に forward primer（cmvgH-RT-F）は 3' 端に塩基の違いを持つ株が 1 株報告されており、このような株では偽陰性となる危険性があった。ただ、この塩基置換を持つのは 18 株中 1 株だけであり、実用上問題はないと考えた。LAMP 法は合計 8 カ所のプライマー結合部位が必要である。この設計はソフトに頼るしかなく、多形性のある部位をさけることは出来なかった。

2. 感度の決定：

プラスミドにクローニングした AD169 株の gH 遺伝子を用い、それぞれの検査法の条件と感度を決定した。

nested PCR 法の outer primer set だけでは、DNA の検出に約 1000 コピー必要であったが、nested とすることで 5 コピーのゲノムでも検出できた。real-time PCR 法は

DNA の検出に10コピー必要であったが、定量性は優れていた。一方、LAMP 法での検出限界はおよそ100コピーで、簡便性に優れてはいるものの、感度は前2者には及ばなかった。

3. 臨床検体の解析：

それぞれの検査を臨床検体を用いて比較した (表2)。検体は腎移植後の3名の患者血液で、pp65検出による antigenemia 検査を終えたものである。antigenemia 検査

での抗原陽性細胞数と real-time PCR 法によるゲノムコピー数の間には相関が見られ、また、感度は real-time PCR 法の方が高かった。nested PCR 法はもっとも感度が高いため、antigenemia 検査で陰性であった検体からも HCMV ゲノムの検出が出来た。一方、LAMP 法は100コピー以下のところで、陽性、陰性の結果が安定せず、偽陰性がかなりみられた。

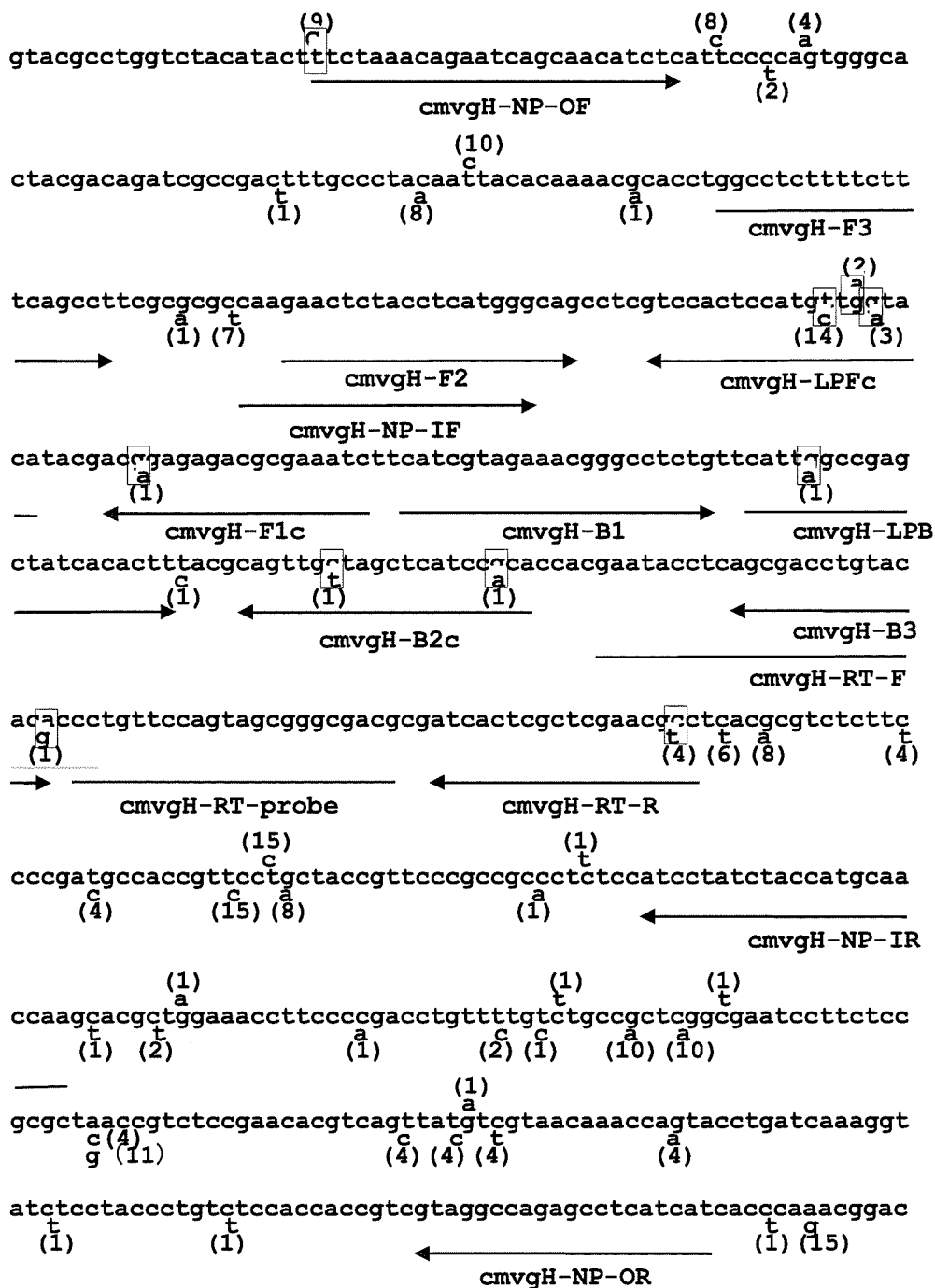


図1. プライマーターゲット部位と株間の多形。AD169株とほかの17株を比較し、違う塩基がある株数を括弧内に示した。さらにプライマー内に存在する多形は枠で囲んだ。

表1 LAMP のプライマーのシーケンス

Name of LAMP primers	Sequence
cmvGH-F1cF2	5'-gatttcgctctctccgctcgt-gaactctacctcatgggcag-3' (F1c-F2)
cmvGH-F3	5'-ggcctcttttctttcagcct-3'
cmvGH-LPFc	5'-tgtaccaacatggagtgac-3'
cmvGH-B1B2c	5'-catcgtagaaacgggcctctg-tgcggatgagctagcaactg-3' (B1-B2c)
cmvGH-B3c	5'-gggtgtgtacaggctcgt-3'
cmvGH-LPB	5'-cattggccgagctatcacactt-3'

表2 腎移植後患者血液の解析

	Date of detection ^a	Antigenemia ^b	Real-Time PCR number of copy	Nested PCR	LAMP
					Turbidity/(DNA electrophoresis) ^c
P1	0629	0	0	-	-/(-)
	0708	0	0	-	-/(-)
	0724	0	0	-	-/(+)
	0730	0	0	-	-/(-)
	0806	0	0	-	-/(-)
	0813	0	0	-	-/(-)
	0820	0	0	+	-/(-)
	0827	300	239	+	+/(+)
	0910	21	24	+	+/(+)
	0918	1	12	+	+/(+)
0913	0	81	+	+/(+)	
P2	0909	0	0	-	-/(-)
	0918	0	0	-	-/(-)
	0925	0	4	+	-/(-)
	1001	0	0	-	-/(-)
	1008	2	107	+	-/(-)
	1016	10	297	+	+/(+)
	1022	70	2551	+	+/(+)
	1029	2	38	+	+/(+)
P3	0725	0	0	-	-/(-)
	0806	0	0	-	-/(-)
	0813	0	0	+	-/(-)
	0827	0	3	-	-/(-)
	0912	0	3	+	-/(-)
	0917	0	0	+	-/(-)
	1001	0	5	+	+/(+)
	1008	1	30	+	+/(+)
	1022	4	13	+	-/(-)
	1029	0	9	+	-/(+)

a 検体採取月日

b pp65陽性細胞数 (1.5×10⁵白血球あたり)

c LAMP の結果を濁度で反対したものを分子に、電気泳動で判定したものを分母に示した。

D. 考 察

現在、我々の施設で行っている乾燥臍帯からの HCMV ゲノムの検出は本研究の nested PCR 法を用いているが、本法は 5 コピーのゲノムを検出できる感度の良い検査であることが証明された。今後、さらに多くの臨床分離株のシーケンスを行い、本検査で偽陰性となるような株が存在しないことを明らかにしたい。

最近開発された LAMP 法は反応温度が一定で、検査の迅速化、簡便化が図れる検査法として注目されている。実際に SARS をはじめ、いくつかの微生物の診断法として臨床応用されている。この検査では 6 ないし 8 個のプライマー結合サイトを用いるため、特異性が高いことが知られている。しかし、プライマーの設計が難しく、ソフトを用いて設計しても必ずしも陽性の結果が得られるとは限らないことを我々は経験している。さらに、これまで報告されてきた微生物診断用 LAMP 法の多くは株間での多形を検討していない。今回の研究から、多形が少ない部位を選んでも、数多い LAMP のプライマーを完全に保存された部位で設計することは不可能であり、常に多形が原因で偽陰性となる株が存在することを念頭に置かなければならないことが明らかとなった。現時点では HCMV の診断に LAMP 法を用いることは適当ではないと判断した。

E. 結 論

本研究で開発した nested PCR 法は感度が優れており、HCMV 診断に適した検査である。また、感度はやや劣るものの、定量 PCR として real-time PCR 法も開発できた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koyano S, Suzutani T, Hirano Y, Araki A, Yagyū K, Murono K, Inoue N, Fujieda K. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection by using dried umbilical cords. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 23:481-482, 2004
- 2) 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
- 3) Kaneko H, Kawana T, Kuremiya E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) against a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods*
- 4) 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

2. 学会発表

- 1) Ishibashi K, Yanagida T, Tokumoto T, Tanabe K, Shirakawa H, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T.

Reinfection of cytomegalovirus with different strain from donors is a major cause of acute rejection in renal transplantation. 100th annual meeting of the American Urological Association, May 25, San Antonio, USA, 2005

- 2) Kaneko H, Kawana T, Suzutani T. Evaluation of mixed infection cases with both herpes simplex virus types 1 and 2. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, October 6-8, Osaka, 2005
 - 3) D.-C. Zhao, Suzutani T, Hashimoto K. HSV replication up-regulates SOCS1 and SOCS3 expression in the FL cells. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, October 6-8, Osaka, 2005
 - 4) Ishibashi K, Tokumoto T, Tanabe K, Yanagida T, Yamaguchi O, Toma H, Suzutani T. Superinfection of cytomegalovirus with different strain from donors is a major cause of acute rejection in renal transplantation. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, October 6-8, Osaka, 2005
 - 5) Nozawa N, Suzutani T, Omori K, Koyano S, Fukui Y, Baba Y, Ogawa H, Yamamoto Y, Yanagi M, Komura H, Kurane I, Inoue N. Development of novel diagnostic assays for human cytomegalovirus (HCMV) infection and their applications. 12th International Conference on Immunology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections, October 6-8, Osaka, 2005
 - 6) 石橋 啓, 橋本浩一, 金子久俊, 錫谷達夫. サイトメガロウイルス AD169株の HUVEC への感染とその影響. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 横浜)
 - 7) 橋本浩一, 錫谷達夫, 石橋 啓, 金子久俊, 細矢光亮. RSV に対する siRNA の in vitro, in vivo における検討. 第53回日本ウイルス学会学術集会 (2005. 横浜)
- ### 3. 特別講演
- 1) 錫谷達夫. 水痘と帯状疱疹. 第5回福島感染コントロール研究会 2005年7月16日 郡山市
 - 2) 錫谷達夫. サイトメガロウイルス感染症の話 第4回みちのくウイルス塾 (2005.7.17, 仙台)
 - 3) 錫谷達夫. 単純ヘルペスウイルスの免疫回避機能と潜伏感染 (2005.11.7, 大阪)

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

聴覚障害児における臍帯を用いた診断法による 先天性サイトメガロウイルス感染の実態

分担研究者 小川 洋（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
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 馬場 陽子（福島県立医科大学医学部耳鼻咽喉科）
分担研究者 錫谷 達夫（福島県立医科大学医学部微生物学）
分担研究者 井上 直樹（国立感染症研究所ウイルス1部）
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

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16年から平成18年の三年間で保存臍帯におけるCMV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CMV-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名についてGJB2難聴遺伝子について検査を行った結果、GJB2遺伝子変異は16名において確認された。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。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せ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では、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に注目し、この保存臍帯からPCR法を用いることにより、CMV遺伝子を検出する方法を開発した。本方法を用いることにより、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。この方法をさらに精度の高いものに改良し、本邦における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。さらに、その他の聴覚障害をきたす要因についての調査を行った。

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