

にそのウイルスのコピー数を調べた。さらに先天性難聴においてもっとも頻度が高いとされる GJB2 遺伝子変異に関しての検索を行った。

#### 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

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'-TCTAACAGAATCAGCAACATCTC-3',

5'-CCTTGCGTGCCTCGTATTCTA-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。

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。

Primer は

5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC および

5'-GGGCAATGCGTTAAACTGGC, または、

5'-TCCAGAGCAAACCGCCAGAGTAG さらに

5'-TTGCTCATCCCTCTCATGCTGTC 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クエンサーで解析した。

BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystems)。

#### 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。

(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。

(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、条件探索反応聴力検査 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でおこなった。

(画像検査)

側頭骨 CT、MRI については必要と考えられ、同意をえられた患者に対して施行した。

#### 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受けた聴覚障害児 67 例の臍帯のうち 16 例に GJB2 遺伝子変異、10 例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。その他の原因として低出生体重児 4 名、ダウン症 2 名、高ビリルビン血症 2 名、サーファクタントの使用 2 名、モンジニ型内耳奇形 2 名、中耳内耳奇形 1 名、半規管奇形 1 名が考えられた。(図 1) 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。(図 2)

#### 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, 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*. 116:1991-1994, 2006
- 2) Kumar N, McLean K, Inoue N, Moles D.R, Scully C, Porter S.R, Teo C.G: 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. Infec. Dis.* 195 :782-788, 2007

### 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
- 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)

## G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

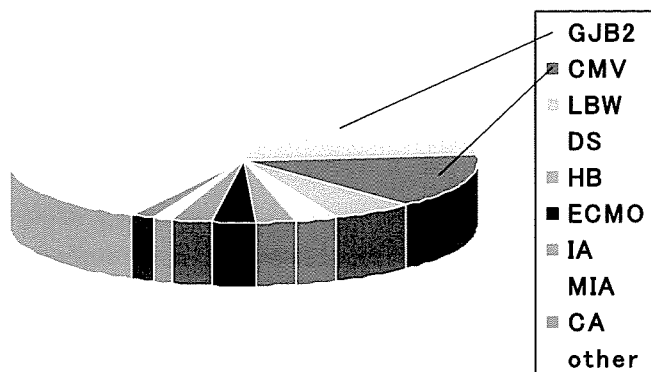


図1 聴覚障害児67名の内訳

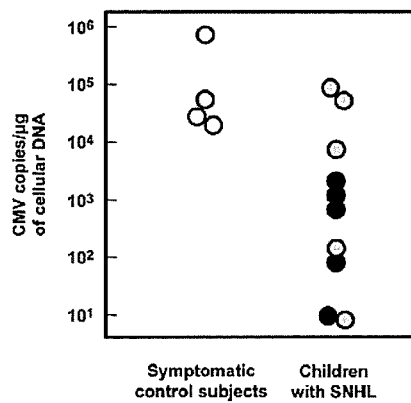


図2 聴覚障害児におけるウイルス量 (コピー数)

## 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

分担研究者 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大耳鼻咽喉科）

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 小川 洋（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）

### 研究要旨

福島県総合療育センターに通院中の難聴児88例の臍帯を調べたところそのうちの11例にPCR法によってサイトメガロウイルス（CMV）が証明できた。11例中10例は両側の高度難聴（70dB以上）で1例のみ片側の高度難聴（片側は軽度難聴）であった。11例中5例は現病歴で新生児の時期から生後6ヶ月ないしは1歳6ヶ月頃までは音に対する反応があったとされ、先天性ではなく進行性難聴と考えられた。

### A. 研究目的

日本での聴覚障害に占める先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症による難聴の割合は検討されていないため、旭川医科大学小児科、福島県立医科大学微生物学のグループによって開発された、保存臍帯からPCR法でCMV遺伝子を検出する方法を用い、福島県総合療育センターにて経過観察中の難聴児の保存臍帯から先天性CMV感染の有無について検査を行い、先天性CMV感染症が原因と考えられる難聴児の割合をRetrospectiveに調査し、陽性例の聴力像について解析した。

### B. 研究方法

平成16年11月から平成18年12月までの2年1ヶ月間に当センター通院中の難聴児88症例につき臍帯提供の同意を得られた。88例の保存臍帯をPCR法にて検索したところ11例にCMVのDNAが検出されたため、現病歴や検査成績、聴力の経過についてまとめた。

### C. 研究結果（表1）

#### 《症例1》

平成12年3月8日生、7歳0ヶ月 女  
診断：右感音難聴、精神発達遅滞（軽度）  
経過：38週 2,040g、自然分娩にて出生。子宮内胎児発育不全を認めており、出生時に精査を受け先天性CMV感染症と診断された。生後6ヶ月で聴性脳幹反応検査（ABR）をうけ右は無反応（左は正常閾値）であったため右高度難聴が疑われていた。2歳10ヶ月当センター初診。右難聴と軽度の精神発達遅滞として経過観察開始された。3歳4ヶ月での津守稲毛式発達検査で発達指数（DQ）62、田中ビネー式知能検査で知能指数（IQ）75であった。聴力は5歳0ヶ月に行った標準純音聴力検査で平均聴力レベル（4分法）右90dB、左25dBであっ

た。同時期に行ったABRのV波閾値は右90dB、左25dB、聴性定常反応検査（ASSR）での推定聴力右120dB以上、左25dBであり、標準純音聴力検査の結果と矛盾しなかった。平成17年4月普通小学校に入学し、現在は右高度感音難聴として経過観察中である。

#### 《症例2》

平成13年9月10日生、5歳6ヶ月 女  
診断：両感音難聴、脳性麻痺、精神発達遅滞（最重度）、てんかん、両視神経萎縮  
経過：38週、2,940g、自然分娩にて出生。哺乳力不足、呼吸不全があり、精査の結果、先天性CMV感染症と診断され精査加療を受けた。11ヶ月時にABRを受け、右無反応、左V波閾値80dBであったため両側高度難聴と診断されていた。1歳11ヶ月当センター初診。津守式発達検査でDQ4～9と最重度の精神運動発達遅滞を認めた。条件詮索反応検査（COR）で60dBの聴力であった。2歳8ヶ月でABRとASSR施行。右無反応、左V波閾値105dB、ASSRによる推定聴力右95dB、左120dB以上。2歳9ヶ月より補聴器装用開始。装用効果確認された。ヘッドフォンを用い左右別にCOR検査を行ったところ3歳0ヶ月では右86.0dB、左62.5dB、4歳1ヶ月：右76dB、左64dBであり、ASSRの結果とは一致しなかった。現在も定期的に経過観察中であるが聴力の変化は認めていない。

#### 《症例3》

平成11年9月27日生、6歳5ヶ月 女  
診断：両感音難聴、脳性麻痺、精神発達遅滞  
経過：40週2,344g吸引分娩にて出生。保育器に5日間収容された。運動発達の遅れのため9ヶ月で当センターを始めて受診し、理学療法を受けながら経過観察されていた。1歳9ヶ月ごろから発語がなくなり2歳2ヶ月でABR検査を受け両側100dB無反応であったため難聴疑われ2歳3ヶ月当科初診。ASSRによる推定聴力は両耳

とも120dB以上。COR100dB以上。5歳6ヶ月時に発達検査では、津守稲毛式発達検査でDQ24、新版K式でDQ33と重度の精神発達遅滞があり、現在は補聴器の装用指導を当科で行いながら養護学校に通学している。当科受診してからは聴力の変化はない。

#### 《症例4》

平成12年8月2日生、6歳7ヶ月 女  
診断：両感音難聴、精神発達遅滞（中等度）  
経過：37週、1,816gにて出生。子宮内胎児発育不全あり。運動発達の遅れのため1歳1ヶ月当センター初診。1歳2ヶ月時の津守稲毛式発達検査では発達指数（DQ）は55である。聴力については3歳時に初めてABR検査が行われ、左V波閾値100dB、右110dB無反応であったため難聴と診断された。ASSRによる推定聴力は左90dB、右100dB以上であった。4歳9ヶ月時の遊聴力検査の結果は平均聴力レベル（4分法）で右110dB、左100dBである。補聴器を3歳10ヶ月から使用し、現在は聾学校幼稚園部で療育を受けている。  
5歳6ヶ月時の聴力は右110dB、左90dBで難聴の進行は認めていない。

#### 《症例5》

平成14年3月21日生、5歳0ヶ月 男  
診断：両感音難聴、精神発達遅滞（中等度）  
経過：38週3,006g自然分娩にて出生。出生時の自動聴性脳幹反応検査（AABR）にて70dB両側REFERであった。5ヶ月で未定額であったため当センター小児科受診。頭部CT、MRIにて軽度の脳萎縮を認め、津守稲毛式発達検査でDQ42であり精神運動発達遅滞として経過観察されていた。2歳6ヶ月時聴力についての精査のため当科紹介となる。ABR両側110dB無反応、ASSR推定聴力両側120dB以上、COR100dB以上の結果であった。2歳8ヶ月ごろより補聴器の装用指導を開始し現在は聾学校幼稚園部にて療育を受けている。3歳9ヶ月時の聴力は右117dB、左118dBであり変化を認めない。

#### 《症例6》

平成14年12月21日生、4歳3ヶ月 男  
診断：両感音難聴  
経過：38週 2,992g周産期異常なく出生。1歳8ヶ月頃から発語がなくなり聞こえの悪い様子が見られ、耳鼻咽喉科を受診、ABR左100dB無反応、右V波閾値70dBであったため感音難聴を疑われ当科を紹介され受診。COR95dB、ASSRによる推定聴力は左120dB以上、右90dBであった。頭部CTでは異常所見は見られなかった。2歳3ヶ月より補聴器装用開始したが、装用効果が得られず、3歳0ヶ月時の聴力は左120dB、右118dBであった。3歳2ヶ月で左人工内耳埋め込み術を受け、現在療育継続中である。

#### 《症例7》

平成16年4月30日生、1歳10ヶ月 男  
診断：両感音難聴  
経過：38週、3,195gにて出生。音への反応が不良であるため11ヶ月時受診。ABR両側110dB無反応、ASSRに

よる推定聴力左110dB、右120dB以上。COR82.5dB。1歳1ヶ月より補聴器の装用指導開始した。1歳10ヶ月時の遊聴力検査で両耳とも120dBでありASSRと矛盾しない結果であった。2歳3ヶ月時人工内耳埋め込みを受け、装用効果は良好であり、現在聴能訓練中である。

#### 《症例8》

平成16年5月26日生、2歳10ヶ月 女  
診断：両感音難聴  
経過：40週 2,995gにて出生。周産期異常なし。生後6ヶ月までは音に対する反応を認めていたが、その後音に対する反応がなくなったことを家族が心配し、耳鼻咽喉科を受診、ABR両側105dB無反応であったため当科紹介となる。CORは108.5dB、ASSRによる推定聴力は左110dB、右120dB以上であった。頭部CTでは異常所見を認めなかった。1歳1ヶ月より補聴器の装用指導を開始した。1歳9ヶ月での遊聴力検査で平均聴力右115dB、左120dB以上でありASSRと矛盾しない結果と考えられた。2歳9ヶ月に人工内耳埋め込み術をうけ、装用効果は良好であり、現在聴能訓練中である。

#### 《症例9》

平成14年7月6日生、4歳8ヶ月 男  
診断：両感音難聴、自閉症、精神発達遅滞（中等度）  
経過：39週 3,150gにて出生。1歳6ヶ月ごろより家族が聞こえが悪いのではないかと感じるようになった。1歳7ヶ月でABRをうけ右無反応、左V波閾値90dBであったため当科紹介となった。1歳9ヶ月当科初診。ASSRによる推定聴力は右105dB左95dBであった。精神発達遅滞（2歳5ヶ月の津守稲毛式発達検査：DQ48、新版K式：DQ62）と自閉症のため、聴性行動反応や遊聴力検査による評価は困難で、ASSRの結果をもとに補聴器を調整した。現在は聾学校で主に療育を受けている。

#### 《症例10》

平成15年12月3日生、3歳3ヶ月 男  
診断：両感音難聴、精神発達遅滞（中等度）  
経過：36週 2,130g帝王切開で出生。子宮内胎児発育不全あり。新生児聴覚スクリーニング検査にて両側referであった。2歳1ヶ月、言語発達遅滞を主訴に受診し、ASSRで両耳とも推定聴力110dB、COR検査でも100dB以上であった。3歳2ヶ月の津守稲毛式発達検査：DQ60、新版K式：DQ63と中等度の精神発達遅滞を認める。2歳3ヶ月より当センターで療育を行っている。

#### 《症例11》

平成16年7月14日生、2歳8ヶ月 女  
診断：両感音難聴  
経過：40週 2,496gにて出生。周産期異常なし。新生児聴覚スクリーニング両側pass。1歳6ヶ月頃から家族が聞こえが悪いのではないかと感じるようになったため、ABRをうけ両側無反応であったため、当科紹介となる。遊聴力検査では、右1、10dB 左120dB以上、ASSRによる推定聴力は両耳120dB以上であった。2歳6ヶ月で人工内耳埋め込み術を受け、装用効果は良好で

あり、現在聴能訓練中である。

## D. 考 察

当科で経過観察中の先天性 CMV 感染症と診断された難聴児11例中5例は進行性難聴であった。9例は両側の高度難聴で、1例は片側の高度難聴（片側は正常）11例中7例に精神運動発達遅滞を認めたが、他の4例は難聴のみが先天性 CMV 感染症の症状であった。これらは先天性 CMV 感染症による難聴は出生時にはなく持続するウイルスの増殖により生後難聴が出現する場合があること、難聴のみが症状として出現する場合があるとの過去の報告と一致していた。

小児の感音難聴の原因としては50%が遺伝性、25%が非遺伝性、25%が原因不明といわれているが、今回の保存臍帯を用いた検査で先天性 CMV 感染の割合が88例中11例あったことから、12.5%程度が先天性 CMV 感染によるものと推察された。

## E. ま と め

保存臍帯から先天性 CMV 感染症と診断しえた難聴児11例の聴力像とその経過について報告した。88例の難聴児の臍帯を検査し、11例の CMV の DNA 陽性者があったことから本邦では乳幼児の難聴の原因のおよそ12.5%を占めると推察された。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

馬場陽子, 小川 洋, 大森孝一: 保存臍帯より先天性 CMV が診断された難聴乳幼児の聴力像. 第50回日本聴覚医学会 (2005. 9 東京)

## 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

分担研究者 馬場 陽子（福島県総合療育センター耳鼻咽喉科）

研究主任者 大森 孝一（福島県立医科大学耳鼻咽喉科）

### 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、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 refer 2名（0.46%）、片側 refer 5名（1.15%）であった。確認検査を7名が受検し pass 3名（0.69%）、両側 refer 1名（0.23%）、片側 refer 3名（0.69%）であった。再確認検査は3名が受検し pass 2名（0.46%）、両側 refer 1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 refer 9名（0.28%）、片側 refer 6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 refer 4名

（0.13%）、片側 refer 5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 refer 4名（0.08%）、片側 refer 9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 refer 3名（0.06%）、片側 refer 5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 refer 5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 refer 1名（0.02%）、片側 refer 3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。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: 〈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)
- 2) 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)

- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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33s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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 馬場陽子: 〈講演〉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)
- 9) 馬場陽子: 〈講演〉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

先天性 CMV 感染による障害発症機構を検討するに当り、1) 高度難聴患者に感染したウイルス遺伝子の遺伝子型の分析及び2) モルモット感染動物モデルを有効に利用可能にするための組換えモルモット CMV (GPCMV) の作製という2つのアプローチから研究を行った。前者については、UL144、gB、gH の3遺伝子領域の遺伝子型の分析により、難聴患児に感染したウイルス株は、特別なものでないことを明らかにした。後者については、緑色蛍光蛋白を発現する GPCMV を作出し、培養細胞レベルで野生株と同様な増殖性を有することが確認でき、今後の感染動物モデルでの利用を可能にした。

### A. 研究目的

CMV は、妊婦の初感染により胎盤を通して胎児へ感染し（先天性感染）、流産や出生児の発達障害の原因となることが知られている。感染胎児の約1割が出生時に明白な障害を持って生まれる。出生時無症候児の約1割が数年のうちに難聴などの感覚器障害を伴う後遺症を発症すると考えられている。

先天性 CMV 感染による障害発症機構を検討するに当り、高度難聴患者に感染したウイルス株の遺伝子型の解析とモルモット感染動物モデルの利用という2つのアプローチで研究を行った。

#### 1) 難聴と遺伝子型

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かどうかという観点から、感染した CMV 株の遺伝子型を解析し、難聴患者の CMV 株に何らかの特徴があるかについて検討した。

#### 2) モルモット感染動物モデルの利用

CMV は宿主特異性が高くヒト CMV は小動物に感染しないことから動物固有の CMV を用いて感染動物モデルを構築することとなる。胎盤の構造の違いからマウス CMV は先天性感染を起こさないが、モルモット CMV (GPCMV) は胎児に感染し、聴覚障害も生じさせるため有用なモデル系である（片野らの項参照）。しかしながら、その研究は、ゲノムの全塩基配列が決定されていないことや感染初期に発現される前初期蛋白に対する抗体が存在しないなど、感染増殖様式の解析を行うにあたり様々な制約がある。そこで、本研究では、簡便に感染増殖様式を解析し経胎盤感染と障害発生のメカニズムを明らかにすることを目的として、緑色蛍光蛋白 (GFP) を発現する組換え体ウイルスを作成した。

### 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（小川らの項参照）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

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もしくは UL83をコードする発現プラスミドを用いた。

#### 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 nested-PCR により UL144、gB、gH の各遺伝子領域を増幅した。遺伝子増幅に用いたプライマー及びサイクル条件等は18年度分担報告書参照。PCR 産物を電気泳動後、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。

#### 4) GPCMV の増殖とゲノム DNA の精製

モルモット肺由来繊維芽細胞 (GPL) JH4 clone 1 (ATCC CCL-158) は、10%仔牛血清を含む Ham's F12培地にて培養した。GPCMV は ATCC より購入し (VR682)、

GPL 細胞を用いて増殖させた。ゲノム DNA 調製のために大量の感染細胞を得る時には感染細胞を未感染細胞と 1 : 5 - 1 : 10 となるように培養し、3 - 4 日後に 50 - 70% 程度の細胞で細胞変性効果 (CPE) が見られる条件下で細胞を集め、nucleocapsid DNA として精製する方法 (Martin ら、1982 ; Straus ら、1981) に従った。即ち、感染細胞を界面活性剤を含む緩衝液で溶解後、細胞由来の核酸を酵素分解し、ここからウイルスキャプシドを含む分画を超速心により回収後、プロテアーゼ処理、フェノール抽出によりキャプシドにパッケージングされていた GPCMV ゲノム DNA を精製した。

#### 5) 組換え GPCMV の作製 (図 1)

SV40 プロモーターにより GFP 遺伝子が発現されるカセットを、EcoRI L 断片中にコードされる GP35 と GP37 の間に挿入したトランスファープラスミドを構築した。このプラスミド DNA とゲノム DNA を GPL 細胞に Eugene6 (Roche) を用いて遺伝子導入し、細胞内で相同的組換えを起こさせた。約 1 週間後の感染細胞を培養液ごと凍結融解・sonication 処理し、組換え GPCMV と野生型 GPCMV の混合液を得た。これを 24 穴プレートの多数のウェル中の GPL 細胞に感染させ、アガーを重層後培養し、緑色蛍光蛋白の発現が認められるプラークを採取した。このプラーク精製過程を数回繰り返すことで、野生型ウイルスを含まない組換えウイルス標品を得た。

#### (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、乾燥臍帯・尿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。また、組換え GPCMV の作成は遺伝子組換え生物等の第二種使用等拡散防止措置の大臣確認に対する承認を得て行われた。

### C. 研究結果

#### 1. 難聴と遺伝子型

UL144、gB、gH 遺伝子型の分布は、表 1 に示す通りであった。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、その差が見られなかった。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。さらに、各遺伝子領域の型間にリンクがなかった。これらのことから、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と結論づけることができる。

#### 2. GFP を発現する組換え GPCMV の作製

GFP を発現する組換え GPCMV の構築法をデザインし (図 1)、組換え DNA の 2 種使用に関する大臣確認実験の承認を得て作製した。組換え体の構造確認は、GP35 及び GP37 に設定したプライマーを用いた PCR 産物が GFP 遺伝子カセットを含むことで長くなることを利用した方法、及び大量に組換えウイルスを培養後ゲノム DNA を精製し、GFP カセットを含む HindIII 切断産物が大きくなったことを証明するサザンプロテイング法

の 2 通りでおこなった。複数の組換え GPCMV クローンが得られ、すべて期待されるゲノム構造であった。

#### 3. GFP 発現組換え GPCMV の増殖性の検討

得られた組換えウイルスと野生型ウイルスを GPL に感染後、その増殖の経時的变化を解析した (図 2)。組換えウイルス量については、蛍光顕微鏡下で緑色蛍光を呈するプラーク数及び感染細胞を筒井らが作成した抗モルモットモノクローナル g-1 を用いて反応後 DAB にて免疫染色されたプラーク数を計数することにより定量した。また、野生型ウイルスの定量は DAB 染色によった。これらの方法により得られた組換え及び野生型両ウイルス量の経時的变化はほぼ同一であり、組換え GPCMV の培養細胞内での増殖性は野生型ウイルスと変わらないと結論した。

### D. 考 察

#### 1. 難聴症例における CMV 遺伝子型

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」について解析し、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。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。

#### 2. GFP 発現組換え GPCMV の作製

GPCMV 感染動物モデルにより、聴覚障害が検討できることが明確になり (片野らの項参照)、今後、先天性感染における感染経路を詳細に解析していくことが重要となる。今回、大臣確認承認を得るまでに予定外の時間を要してしまったために組換えウイルスを利用した感染動物実験にまで到らなかったが、組換え GPCMV の作製法を確立し、培養細胞レベルでその増殖性を確認できたことは、in vivo イメージング機器の利用などを含め今後の感染動物モデルでの研究にとって有用と考えられる。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

《原著》

- 1) Koyano S, Araki A, Hirano Y, Fujieda K, Suzutani T, Yagyu K, Murono K, Inoue N. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. *Ped. Infect. Dis. J.* 23:481-482, 2004
- 2) 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.* 116:1991-1994, 2006
- 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 21<sup>st</sup> Century.* Springer, NY. 2006.

- 2) 井上直樹, 野澤直樹: 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, 2006

- 3) 野澤直樹, 井上直樹: CMV の先天性感染機構. *日本臨床64巻増刊号3* : 446-450, 2006

2. 学会発表

- 1) 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, Finland, Jul 30-Aug 4, 2005.

- 2) 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. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005.

- 3) 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. 12<sup>th</sup> International Conference on Immunobiology and Prophylaxis of Human Herpesvirus Infections. Osaka, Oct. 6-8, 2005.

- 4) Inoue N, Suzutani T, Ogawa H, Koyano S, Baba Y, Yan H, Ishibashi H, 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 31<sup>st</sup> International Herpesvirus Workshop, Seattle, 2006.

- 5) 野澤直樹, 片野晴隆, 中村幸之助, 福井良子, 山本由美子, 小村仁美, 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」第20回ヘルペスウイルス研究会 (2005. 6, 名古屋)

- 6) 野澤直樹, 古谷野伸, 片野晴隆, 福井良子, 山本由美子, 中村幸之助, 小村広美, 筒井祥博, 倉根一郎, 井上直樹「先天性サイトメガロウイルス

ス感染による感覚器障害の実態把握及びモルモット感染モデルを用いた障害発生機序解明のための緑色蛍光蛋白を発現する組換え体ウイルスの作製」第9回日本神経ウイルス研究会 (2005. 6, 浜松)

- 7) 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, 横浜)

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

表1 遺伝子型と難聴

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

図1 組換え GPCMVM の構築

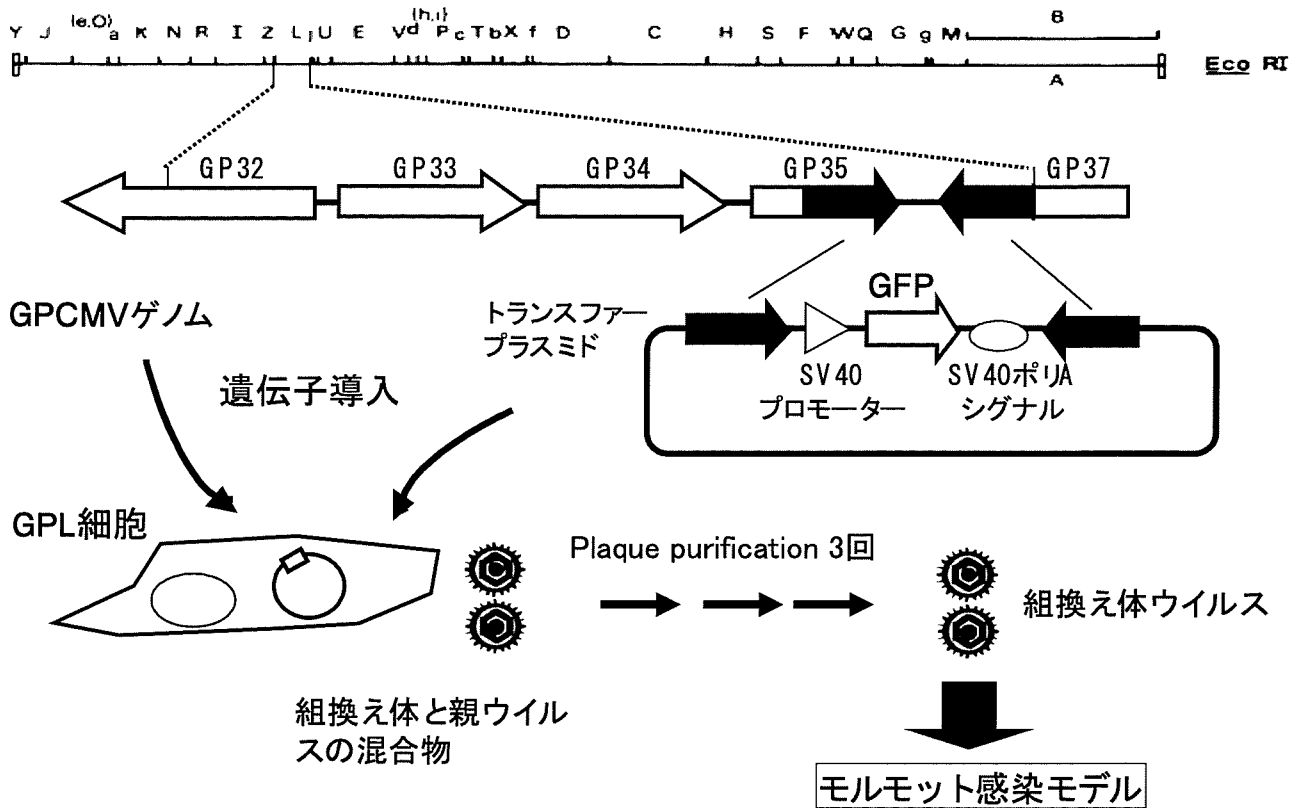
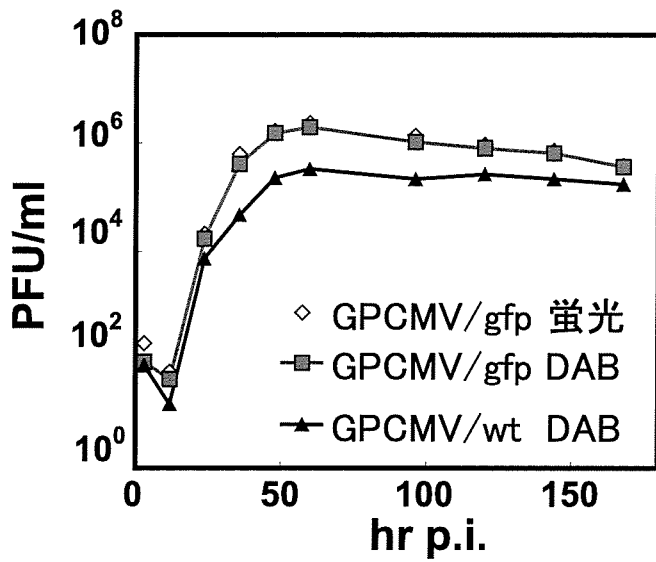


図2 組換え GPCMVM の増殖性



## 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）

### 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 に対する大腸菌の系を用いて得られた Fab 抗体を実用化に向けてホール化の検討を行った。H鎖の Fab 領域のうち可変領域（VH）を取り出して新たに作製したカセットベクターにクローニングすることによって、いかなる Fab 抗体も IgG1 に変換できるようになった。またホール抗体遺伝子を産生するために新たな発現ベクターの構築も行った。H鎖とL鎖をそれぞれレアーな制限酵素部位にクローニングすることによって簡単に抗体遺伝子発現ベクターが構築できる系の開発に成功した。現在、この系を用いて抗体の生産に取り組んでいる。

### 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пит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	58 k - 116 k	102 k
gH (gCIII) UL75	86 k	84 k
gN (gCII) UL73	50~60 k	15 k

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	34 k	24 k
UL119-8	68 k	33 k

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いかなる種類の中和 Fab 抗体もホール抗体（IgG1）に変換することである。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細胞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が、最終的にはカイコの系を検討した。

## 1. ヒト抗体の植物細胞発現ベクターの構築

Fab 抗体のうちL鎖は全領域が含まれるが、H鎖に関してはVH-CH1しか含まれず、CH2-CH3を欠いている。そこで我々の研究室ですでにクローニングした抗HBs抗体遺伝子CL4 (IgG1) のCH1-CH2-CH3領域を用いてホール化を行う。CH1の5'側15塩基ほど離れた所に制限酵素のApaIサイトが存在する。これはIgG1~4まで共通である。したがって、IgG由来のFabはVH領域と隣接するCH1の5'端をApaIで切り出し、CL4のCH1-CH3領域の上流にクローニングすることでインフレームにホール化することができる。IgG以外のFabの場合はApaIサイトとCH1の5'側15塩基ほどを付加したプライマーでVH領域を増幅して、同じようにCL4のCH1-CH2-CH3領域にクローニングする。

植物発現ベクターとしては共同研究を行っているドイツのフランフォファー研究所の分子生物学応用生態学研究所ライナー・フィッシャー部長から供与されたpTRAcK-ERHをベースに抗体遺伝子のL鎖とH鎖の2つの遺伝子を導入できるように改造する。

## 2. 抗原タンパクのバキュロウイルス系での生産

中和エピトープを担うgB、gHおよびFcγレセプターのTRL11、UL119-8についてバキュロウイルス系での生産を行う。そのためにいずれのタンパク質も本来の分泌シグナルをそのまま利用して、培養液中に分泌させる。また膜貫通ドメインは除去する。タグとしてはHis-TagをC末端に付加し、精製に利用する。バキュロウイルスの感染には一般に用いられるSf9細胞に加え、タンパク産生効率の良いTn5細胞も抗原生産時に用いる。そして、分泌タンパク質の精製を容易にするため無血清培地で培養する。以上の条件で生産を試みる。使用する組換えバキュロウイルス作製用インサクションベクターはInvitrogen社のpFastBac1とPharming社のpVL1392である。前者はバキュロウイルスゲノムがBacmidの形で大腸菌に入っているため、大腸菌内で組換えが行える(Bac to Bacシステム)。後者は欠損したバキュロウイルスゲノムと一緒にトランスフェクションしてSf9細胞で組換え体を作製する。

## C. 研究結果

### 1-1. 植物細胞発現ベクターの構築

ベクターの出発材料としてpBluescript (pBs)を用いた。まずpBsのマルチクローニングサイトのsalIサイトを切断した後に平滑化してライゲーションを行い、結果的にsalIサイトを消失させた。次にPstI-SpeI間に合成リンカーを導入して植物用分泌シグナルとなるLPH配列を導入した。この配列は使用予定のタバコのコドン使用頻度に合わせて塩基配列を最適化した。さらに分泌シグナルが適切に切り出されるかどうかをデンマーク工科大学の予測サイト (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)を用いて検定した。同時に制限酵素サイトのPstIサイトを消失させ、SpeIサイトをNheIサイトに変換した。次にLPHの5'側のXhoI-EcoRIサイトにpTRAcK-

ERH由来の植物用プロモーターの0.7kbを導入した後にEcoRIサイトを消失させた。次にLPHの3'側のXbaI-SacIIサイトにpTRAcK-ERH由来の植物用polyAシグナルの0.3kbを導入した。得られたベクターをpPLA2と名付けた。これをL鎖用とH鎖用に分けるために、pPLA2の5'側にあるApaIサイトと3'側にあるSacIサイトをそれぞれL鎖用にEcoRI-NotIサイト、H鎖用にAscI-HindIIIサイトに変換した。これらベクターに関してもシークエンシングを行い塩基配列の確認を行った。L鎖とH鎖を植物に導入するために次に植物導入用ベクターpTRAcK-ERHの改造を行った。pTRAcK-ERHのAscI-FseI領域を切り出し、代わりにAscI-HindIII-EcoRI-NotI-FseIlikeサイトを含む合成リンカーを導入し、pTRAcK-ANと名付けた。これによりFab抗体をIgG1に変換して植物で発現させるために必要なすべてのベクターが完成した。

現在、このベクターにHCMV中和抗体遺伝子である13-3とTG252の遺伝子を導入した。抗体遺伝子のホール化はシークエンシングによって確認した。現在、タバコ細胞に導入して抗体酸性株の分離を行っている。

### 2. 抗原タンパクの産生

#### 2-1. gB、gHの産生

gBおよびgHタンパクの膜貫通ドメインの直前までの領域をPCRで増幅しバキュロウイルスに導入してSf9細胞で発現させた。Invitrogen社のpFastBac1よりPharming社のpVL1392の方が産生効率が良かったので、pVL1392を用いて産生条件を検討した。しかし産生量が思うように得られず、Sf9細胞の変わりにカイコを用いた系での生産を検討している。

#### 2-2. Fcγレセプターの産生

Fcγレセプターに関しては既存の抗体がないためHis-Tagに対する検出法でその産生を確認した。TRL11に比べUL119-8の方が産生量が多かったので、UL119-8の生産を先に進め、現在までに数ミリグラムを生産した。TRL11に関しては2ミリグラムを生産した。これらを濃度を変えてELISAプレートに塗布し、ヒトIgGとそのFabを反応させたところ、TRL11もUL119-8も濃度依存的にIgGのみと特異的に反応し、Fabとはまったく反応しないことを確認した。まちがいにFcγレセプターであると思われる。

現在、大量培養、大量精製法について種々の検討を行っているところである。

## D. 考察

Fabホール化ベクターおよび植物細胞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。今後の抗体産生においてはタンパク生産量を増大されると言われていたKDEL配列の効果が見られなかったことから、

KDEL 配列を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細胞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) 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*. *Clinic Diag Lab Immunol.* 11:216-218, 2004
- 2) 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
- 3) Yano A, Takekoshi M : Transgenic plant-derived pharmaceuticals - the practical approach? *Expert Opin. Biol. Ther.* 4:1565-1568, 2004
- 4) Maeda F, Takekoshi M, Nagatsuka Y, Aotsuka M, Tsukahara S, 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
- 5) 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
- 6) 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.* 101:251-6, 2006
- 7) 矢野 明, 竹腰正隆 : 植物でヒトの抗体を作る. *日本臨床* 64 : 512-7, 2006
- 8) 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 : 512-7, 2006
- 9) 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 : 30-5, 2006

### 2. 学会発表

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)

## 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

## 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

分担研究者 筒井 祥博（浜松医科大学病理学第二講座）

研究協力者 小杉伊三夫（浜松医科大学病理学第二講座）

李 立（浜松医科大学病理学第二講座）

### 研究要旨

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症においてなぜ難聴が起きやすいかその病理発生と予防法の確立のために、マウスを用いた実験モデルを確立した。ウイルスの脳内感染と腹腔内感染による内耳のウイルス感染細胞の分布を調べた。その結果2種類の感染経路ともに外リンパに感染しやすく内リンパに感染しにくいことが分かった。血液・内リンパ関門以前の外リンパ内皮および周囲の間葉系細胞に感染しやすいが、聴覚感覚装置を含む内リンパの中央階は感染から強く護られており、簡単には破壊されないように保護されている可能性が考えられる。この実験モデルによって先天性CMV感染症の難聴の発生機序の解明と予防法の確立の基礎研究の基盤になると考える。

### A. 研究の目的

サイトメガロウイルス（CMV）の先天感染は全出産の0.4% - 1%に起こることが知られている。出生時に小頭症、脳室の拡大、小脳低形成、小眼球症などの脳形成障害が生ずる場合と、出生時は無症状で生後数年して、精神発達障害、難聴、視力障害、てんかんなどが生じてくる場合がある。特に先天性CMV感染による感音性難聴は、非遺伝性難聴の主要な原因であると考えられている。先天性CMV感染症と難聴の関係は世界的に注目され、本研究班でも疫学的、臨床的調査研究が行われている。

本研究の目的は、発育期のCMVの感染による難聴の発生機序を解明するためのマウス実験モデルを作成し、その病理発生に関わる要因を明らかにし、ヒトにおける予防法のための基礎を確立することである。

### B. 方法

#### 1) 感染方法

(1) 脳内感染：生後2日目のBALB/cマウスの右脳内へMCMVを $2 \times 10^4$ PFU投与し、感染6日目（生後8日目）に脳を取り出した。

(2) 腹腔内投与：生後2日目のBALB/cマウスの腹腔内へ $1 \times 10^5$ PFU投与した。感染前1日、感染後1日、3日、5日に右脳内Lipopolysaccharide (LPS)を $5 \mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 投与して感染6日目に脳を取り出した。

#### 2) 内耳における組織標本の作製

エーテル麻酔下で左心室から4%パラフォルムアルデヒド（PFA）を注入して還流固定した。脳と側頭骨部を別々にして2日間固定した。側頭骨部は0.3M EDTA

で1週間脱灰した。蝸牛の矢状断と平行に頭部を切り出し、パラフィン包埋し、連続切片によって内耳を同定した。

#### 3) 免疫染色

ウイルス感染細胞はMCMV前初期遺伝子（IE1抗原）に対するモノクローナル抗体を用いた。ウイルス抗原陽性細胞は右側内耳および右側大脳切片当たりで数えた。必要に応じて神経系のマーカーに（NeuN、GFAPなど）に対する抗体を用いて免疫二重染色を行った。

#### 4) ウイルス感染価の測定

両側の側頭骨の内耳を含む部分を切り出し、ホモジネートにして、プラークアッセイを行った。ウイルス感染価は臓器当たりで示した。

#### 5) サイトカインの定量

凍結保存した組織を超音波で破碎してホモジネートにし、サイトカインの測定にはホモジネート上清を用い、Cytometric Bead Array System（BD Biosciences）によって定量した。ウイルス量及びサイトカイン量は両側内耳当たりで換算した。

### C. 結果

#### 1. 新生児マウス脳へのMCMVの感染と内耳感染検出

BALB/cマウスあるいはC57BL/6マウス新生児（生後2日）脳内にLD50の3倍量のMCMV（Smith株）を接種し、一週間後4%PFAで灌流固定した後脳と内耳を含む側頭部を採取した。採取後数日～1週間の後固定後、1～2週間の0.3M EDTA処理によって脱灰標本を作製した。脱灰後に側頭部組織の顎下部から鼓膜上部を結ぶ断面を作製しパラフィン包埋後、この断面に平行に薄切することで蝸牛の全体像（頂部から底部まで）の標本作製することができた。一匹のマウスから約30枚



の連続切片が作製可能である。

## 2. 脳内感染による内耳への感染

脳内感染によって、感染細胞は螺旋神経節と鼓室階に認められた。螺旋神経節ではウイルス抗原 (IE1) は神経細胞には認められず、非神経細胞 (シュワン細胞及びグリア細胞) に認められた。鼓室階では内皮細胞と内皮下の間質細胞にウイルス抗原が認められた。しかし、コルチ器への感染は認められなかった。

## 3. 腹腔内感染による内耳への感染

内耳への感染をより自然に近づけるために、腹腔内感染を試みた。無処置のマウスの腹腔内へ MCMV を強いウイルス感染価で感染しても内耳に感染しなかつた。そこで LPS (5 $\mu$ g/5 $\mu$ l) を感染前1日、感染後1日、3日、5日後投与あるいは PBS を同様脳内投与してから、MCMV を腹腔内感染した。LPS を脳内投与した群では感染後6日の生存率は約55%で、PBS を脳内投与した群では90%以上生存した。PBS を脳内投与して、MCMV を腹腔内投与した群においては、免疫染色でウイルス抗原陽性細胞は内耳においても、脳においても認めなかつた。LPS を脳内投与した群においては、内耳においてウイルス抗原陽性細胞は著しく増加した (7匹中3匹)。これに対して LPS を投与した同じマウスの脳においてウイルス抗原陽性細胞の増加は軽度であった。

内耳および脳におけるウイルス感染価をプラークアッセイで調べた。PBS 投与群においては腹腔内感染で、内耳および脳において、1 $\times$ 10<sup>2</sup> PFU/organ 以下であったが、LPS の投与群においては、内耳では約30倍、脳では約6倍上昇した。

## 4. 脳内感染と腹腔内感染における内耳におけるウイルス感染細胞の局在の相違

腹腔内感染においては脳内へ LPS を4回投与することによって、内耳に感染細胞を検出することが出来た。脳より内耳の方が感染細胞数が多く、これはウイルス感染価においても一致した。

今回は内耳におけるウイルス感染細胞の分布を内耳のセクション当たり定量的に調べてみた。腹腔内感染においては、蝸牛の鼓室階 (ST)、前庭階 (SV) の内皮に感染細胞をほぼ同等に認め、その周囲の間葉系細胞にも多く認められた。しかし、内リンパ腔である中央階 (SM)、それに接する螺旋靭帯 (SL) には感染細胞を殆ど認めなかつた。また、蝸牛神経 (CN) およびその神経節 (G) に比較的多くの陽性細胞を認めた。

一方脳内感染においては、蝸牛神経 (CN) と鼓室階 (ST) には比較的多く感染細胞をみとめたが、腹腔内感染と同様に内リンパの中央階、螺旋靭帯では感染細胞を認めなかつた。

## 5. 腹腔内感染における内耳及び脳における TNF- $\alpha$ および INF- $\gamma$ の変化

脳への LPS の投与によってなぜ MCMV 感染に対する内耳の感受性が亢進するのかが問題である。私たちは、Cytometric Bead Array System 法によって、TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$  を定量した。非感染状態では LPS の投与によって内

耳の TNF- $\alpha$  の量はやや増加したが、MCMV 感染によって有意に促進された。LPS 投与された MCMV 感染マウスでは、脳及び内耳の何れにおいてもウイルス量の増加を認めた。この感染増強は内耳において顕著であった。LPS 投与された感染マウスでは、内耳ホモジネート上清中の INF- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  濃度は何れも対照に比べ著明に低下していた。脳では何れの実験群においてもサイトカイン濃度は内耳に比べ低値であった。また、同様のサイトカイン濃度の低下を認めたが変動は内耳よりも軽度であった。

## D. 結 論

1) 周産期マウスにサイトメガロウイルス (CMV) を感染し、内耳へ感染させ、解析する実験系を確立した。脳内感染によって内耳へ感染させることが出来るが、LPS 脳内投与により腹腔内感染による全身感染によって内耳に感染する実験系を確立した。

2) LPS 脳内投与による腹腔内感染では、ウイルス抗原陽性細胞およびプラークアッセイによる感染感受性で比べると、脳より内耳の方が感受性が高いことが分かった。

3) 内耳のウイルス感染細胞の局在は、蝸牛の外リンパである鼓室階 (ST)、前庭階 (SV) に多く認め、内リンパのコルチ器を含む中央階 (SM) およびそれに接する螺旋靭帯 (SL) には感染細胞を殆ど認めなかつた。

4) 螺旋神経および外リンパをとりまく間質には感染細胞を求めたが、螺旋神経節の神経細胞には感染細胞を認めなかつた。

5) 脳および内耳のサイトカイン INF- $\gamma$  及び TNF- $\alpha$  産生は MCMV の感染によって上昇し、LPS の投与によって低下した。LPS によって炎症反応の喚起および生体防御の低下が、CMV への感受性の増強に繋がる可能性が示唆された。

## F. 研究発表

《平成18年度》

### 1. 論文発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) 筒井祥博:  $\beta$  ヘルペスウイルスの中樞神経系感染.

日本臨牀64 (Suppl 3):440-445, 2006

- 6) 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
2. 学会発表
  - 1) 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)
  - 2) 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 31<sup>st</sup> International Herpesvirus Workshop (2006.7, Seattle)
  - 3) 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)
  - 4) 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)
  - 5) 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)
  - 6) 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)
  - 7) 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大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)
  - 8) 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)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
  - 11) 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)
  - 12) 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)
  - 13) 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)
  - 14) 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)
  - 15) 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)
  - 16) 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)
- 《平成17年度》
1. 論文発表
  - 1) 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
  - 2) 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
  - 3) 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
2. 学会発表
  - 1) 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)
- 2) 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)
  - 3) 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)
  - 4) 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)
  - 5) 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)
  - 6) 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)
  - 7) 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)
  - 8) 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)
  - 9) 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)
  - 10) 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)
- brain after transplantation of the neural stem cells. Acta Neuropathol 107, 406-412, 2004
- 2) 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

《平成16年度》

1. 論文発表

- 1) Li RY, Kosugi I, Tsutsui Y: Activation of murine cytomegalovirus immediate-early promoter in mouse

## 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

分担研究者：片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

### 研究要旨

サイトメガロウイルス（CMV）感染は先天性難聴の原因として重要である。CMV 関連難聴の発症機構を解明することを目的に、モルモットサイトメガロウイルス（GPCMV）の水平および垂直感染モデルにおける GPCMV 感染細胞の局在を GPCMV の早期タンパクを認識する抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学により明らかにした。モルモットの内耳への接種実験、および妊娠モルモットへの垂直感染実験の結果、いずれも GPCMV 感染細胞は前庭階、鼓室階などの外リンパ液領域とらせん神経節に見られ、蝸牛管、コルチ器などの内リンパ液領域には見られなかった。これらの結果から、コルチ器周辺の出血等による循環障害、および、神経節の破壊による神経伝導障害が難聴のメカニズムと考えられた。これはヒトのサイトメガロウイルスによる難聴のメカニズムを考える上で重要な示唆を含むものと思われる。

### A. 研究目的

ヒトサイトメガロウイルス（human cytomegalovirus, HCMV）は先天性ウイルス感染症としては最も頻度の高いウイルスである。聴覚障害は先天性 HCMV 感染症の中でも最も頻度の高いものであり、HCMV が検出された幼児の10-15%程度が将来、何らかの聴覚障害を持つ。しかし、HCMV 関連難聴の病因メカニズムにはいまだに不明な点が多い。モルモットは妊娠期間（10週）が比較的短期である上に、胎盤の構造がヒトに近似していることから、モルモットにモルモットサイトメガロウイルス（Guinea pig cytomegalovirus, GPCMV）を感染させた動物モデルは先天性 CMV 感染の動物モデルとして1970年代から使用されてきた。1980年代後半までに明らかになった知見として、先天性 CMV 感染の内耳の組織学的変化は出血と巨細胞封入体のある細胞を伴った炎症細胞浸潤が主であり、ライスナー膜、血管条、らせん神経節（蝸牛神経節）に障害が見られることであった。こうした、内耳の組織障害が難聴に直接関連すると考えられてきたが、これらの研究は高感度な免疫組織化学が開発される以前のものであり、内耳、特に蝸牛における GPCMV 感染細胞の詳細な局在は分かっていない。そこで、本研究ではモルモット動物モデルにおける GPCMV 感染細胞の詳細な局在を検索する目的で、ひとつは内耳に GPCMV を直接接種する実験系、もうひとつは妊娠モルモットにウイルスを接種する系を行い、ウイルスを接種したモルモット、および胎児の内耳および各臓器における GPCMV 感染細胞の局在を、抗 GPCMV 抗体を用いた免疫組織化学で検討した。

### B. 研究方法

方法の詳細は各年度の報告書に記載した。本報告書ではその要約を記載する。

#### 1. 内耳への感染実験

Hartley 系クリーンモルモット（体重200 g）の右中耳胞をメスで開放し正円窓より GP-CMV ウイルス液を注入した。ウイルス液は感染唾液腺乳剤を10% DMSO / ハンクス液で調整した。

#### 2. 妊娠モルモットへの感染実験

妊娠5週の Hartley 系クリーンモルモットの背臀部皮下に  $5 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.5ml の GPCMV ウイルス液を接種した。出産直前に麻酔下で胎児と母体の内耳を含む全臓器を摘出し10%緩衝ホルマリンで固定した。

#### 3. 病理標本の作製と免疫組織学的検索

耳を含めた全臓器の組織は10%緩衝ホルマリンで固定し、蝸牛などの硬組織を含むサンプルは10% EDTA で14日間脱灰を行った。パラフィンブロックから薄切片を作製し、抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体（Tsutsui Y., et al. Monoclonal antibodies to guinea-pig cytomegalovirus: an immunoelectron microscopic study, 1986 J Gen Virol 67: 107-118）を一次抗体に用いた免疫組織化学を行った。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン（HE）染色で全体の形態変化を観察した。

（倫理面への配慮）

動物実験は当該施設（国立感染症研究所）の承認の後、国立感染症研究所動物実験ガイドラインに沿って行われた。