

201446016A

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業

先天性難聴に対する保存臍帯を用いた胎内先天性風疹

ウイルス感染検索方法の新規開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 守本 倫子

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の障害者対策総合委託事業による委託業務として、守本倫子が実施した平成26年度「先天性難聴に対する保存臍帯を用いた胎内先天性風疹ウイルス感染検索方法の新規開発」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

障害者対策総合研究事業

先天性難聴に対する保存臍帯を用いた胎内先天性風疹

ウイルス感染検索方法の新規開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 守本 倫子

平成 27 (2015) 年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
先天性難聴に対する保存臍帯を用いた胎内先天性風疹ウイルス 感染検索方法の新規開発	
守本 倫子	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 保存乾燥臍帯からの RNA 抽出技術の開発・改良	
宮入 烈	7
2. 保存検体からのウイルスの安定した抽出法の開発と解析体制の構築	
齋藤 昭彦	9
3. 先天性難聴児における潜在性 CRS の出生頻度の検討及び CRS 難聴 児の言語発達評価	
仲野 敦子	11
4. 先天性風疹症候群児の難聴および病態	
守本 倫子	13
III. 学会等発表実績	17
IV. 研究成果の刊行物・別刷	19

I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業）

平成 26 年度 総括委託業務成果報告

先天性難聴に対する保存臍帯を用いた胎内先天性風疹ウイルス感染検索方法の新規開発
(H26-感覚-一般-005)

業務主任者 守本倫子

国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 耳鼻咽喉科医長

研究要旨

- 1) RNA が不安定であるために不可能とされていた風疹ウイルス RNA を保存臍帯から同定する技術を開発した。
- 2) 9 例の CRS 症例（1982 年生まれ～2013 年生まれ）の臍帯検査では 9 例共に風疹ウイルスの RNA が検出された。そのうち 2 例については DNA 解析が可能であり、当時流行していたウイルス株と一致した。感度は高く、診断に有用な技術であることが確認された。
- 3) 先天性難聴のうち、原因が明らかではない症例は約 50%あり、遅発性難聴のみの症例も確認されているため、潜在性 CRS 症例が存在する可能性が高いことが明らかになった。原因が明らかになることで、CRS の特性にあわせた介入を提供できるようになる。今後原因不明の難聴児に対して CRS 症例を検索する予定である。
- 4) 保存臍帯からの安定した RNA 抽出方法に関わる技術および解析体制の構築を推進し、汎用化のための技術開発、改良を行っていく。

研究分担者

宮入烈

国立成育医療研究センター 感染症科医長

齋藤昭彦

新潟大学大学院 小児科学分野教授

仲野敦子

千葉県こども病院 耳鼻咽喉科部長

研究協力者

宮田一平

国立成育医療研究センター 感染症科

岩瀬徳康

国立成育医療研究センター 耳鼻咽喉科

A. 研究目的

1994 年の予防接種法改正により風疹ワクチン接種率が低下した。これにより近年風疹が大流行し、2013-14 年にかけて 45 例の CRS の出生が報告されている。風疹ウイルスの感染力は麻疹などに比して高くないため不顕性感染率が高く（30%）、妊娠中感染の自覚のないまま出産に至るケースが多いことから、未診断の CRS 児もさらに存在することが推測される。難聴は出生後より遅発性に進行する例も少なくなく、妊娠中に感染すると合併症の有無に関わらず難聴の

発症は90%以上とされている。先天性難聴の約50%はいまだ原因が判明していなかったことから、その中に潜在性のCRS児が混在している可能性が否定できない。

現状では、CRSの診断として、母体の風疹罹患が明らかな例や出生直後の疑わしい症例に対してのみ体液よりウイルス分離が行われている。実際2012-2013年の風疹大流行時に、明らかに子宮内発育遅延があった児に対して体液の検査を行ったところ、風疹ウイルス感染陽性、と診断された児が数例あった。しかし、このうち半数は妊娠中に風疹に罹患した記憶がなく、さらにワクチン接種歴もあったため、出生した児に風疹ウイルスが検出されたことなど予想していない状況であった。

児にとって難聴やてんかん、または発達遅滞などの原因が明らかになることは、児の今後の治療方針や関わり方を決定する上で重要である。例えば、同程度の難聴であったとしても、CRS児の方が発達が緩徐であったり、多動傾向がみられることもある。このため児の特性にあった形で早期からコミュニケーションの方法を指導獲得させることが必要になる。有効な意思伝達手段を獲得することで、周囲との関わり方が上達し、2次的な問題行動を未然に防ぐことにつながる。さらに、児の知的発達や認知の特性にあわせた早期療育を適切に受けることも可能になる。

さらに2015年からは小児慢性特定疾患事業に疾患登録もされ、これにより先天性風疹症候群の実態を明らかにすることができるだけではなく、児の医療環境を整備することに大きな影響を与えられられる。しかし、妊娠中の風疹感染があったのかどうかをさかのぼって診断することは困難であった。

Tamayoらは、コロンビアでの研究結果で、風疹流行地域に難聴児が多く、その地域の聾学校に通う児童に対して眼底検査を行ったところ先天性風疹感染などのウイルス感染に特有の眼底所見が約30%に認められたと報告している(Tamayo ML, *Int J Pediatr Otolaryngol*, 2013)。つまり難聴以外の症状がなく、妊娠中には気がつかれていなかったCRSが実際には高い割合で存在することを示唆している。もちろんこれは直接風疹ウイルス感染を証明しているわけではない。あくまでもウイルス感染に特有な眼底所見が認められた、というものではあるが、風疹が流行している我が国でも、同様の事例がないとは否定できない。

胎盤感染を調べる方法として、先天性難聴の原因の一つとして知られるサイトメガロウイルス(CMV)では、保存された乾燥臍帯を用いてCMV遺伝を同定することが可能である。同様の方法で風疹ウイルスでも検索することを試みたが、DNAウイルスであるCMVと異なり、RNAウイルスの風疹ウイルスは変性を受けやすく不安定であり、臍帯からの分離検出は不可能とされていた。しかし、分担研究者の斎藤は、抽出条件を最適化することで困難とされていた臍帯からのRNAウイルスであるエンテロウイルスのRNA同定に世界で初めて成功した(Miyata I, Saito A, *L Clin Virol* 2013)。そこでさらに同じ技術を用いてCRSと確定診断が得られている児の保存臍帯より風疹ウイルスのRNA分離を行った。出生後30年以上経過した臍帯からでも風疹の胎盤感染を証明することにも成功した(Miyata I, *Clin Inf Dis*, 2014)。

そこで本研究では、原因が明らかではない先天性・進行性難聴症例に対して本検査方

法を用いて妊娠中の風疹感染の有無を検査する方法を確立することを目的とした。

本研究により、

- ①原因解明による適切な診療や療育の提供
- ②潜在性CRSの頻度の解明

③風疹ウイルス胎盤感染のメカニズム解明が明らかになることが期待できる。

①原因解明による適切な診療や療育の提供
難聴の進行、併発する中枢神経障害に対して早期から言語訓練や発達の評価など専門的な評価や、人工内耳手術などの医学的介入による効果も評価し、それにより症状の進行を最大限に抑え、疾患に適した診療や療育体制の構築が可能になる。

②潜在性CRSの頻度の解明

CRSは90%以上に難聴を引き起こすことがわかっており、CRSによる先天性難聴と診断されている症例は現在の実数以上である可能性が高い。さかのぼって風疹ウイルス感染の既往が診断できることは、先天性および進行性難聴の原因として風疹ウイルスの関与を明確にし、CRS発症頻度を正確に予測することが可能になり、最終的には風疹の予防や早期対応など政策形成の参考として我が国におけるワクチン行政への貴重な提言につながることを期待される。

③風疹ウイルス胎盤感染のメカニズム解明

CRS児の難聴程度、特徴と不随する合併症、ウイルス感染した時期などを明らかにし、エビデンスを基にした診断・治療指針の基準作成を目指す。

B. 研究方法

1) 先天性風疹症候群 (CRS) の病態

2013-2014 年に出生し、出生直後の体液の

PCR により CRS と診断された症例について、難聴や中枢神経系の合併症、その他難聴以外の症状および療育環境の整備などについて情報を得た。母胎の風疹ワクチン予防接種歴や罹患時期（罹患した既往があるかどうか）などについて母子手帳を確認しながら直接患者家族にインタビューを行った。聴力評価は聴性脳幹反応 (ABR) や聴性定常反応 (ASSR) と幼児聴力検査 (COR) にて行った。また、頭部 MRI または CT などの画像検査により中枢性疾患の評価を行うと共に、運動発達は遠城寺式発達評価などを用いて定期的に評価する体制を構築した。

2) 臨床検体

本研究の目的を説明し、同意を得られた CRS 患者の保護者により臍帯の提供を受け、保存容器のまま番号を記載し、連結可能匿名化を行ってから成育医療研究センターに検体を集積した。特異度、感度の検出のため、同意が得られた対象症例からも検体を受けた。これにより特異度、感度を算出したのち、原因不明の先天性・進行性難聴児（軽度～重度、一側性も含む）に対して保存臍帯の提供を依頼する。これはすでに既知の難聴遺伝子検査およびサイトメガロウイルス感染検査を行って陰性と結果が明らかであり、側頭骨 CT でも内耳奇形が認められなかった症例を対象とする。

3) 分子生物学的解析

①RNA 抽出

臍帯の一部を採取し (5mm 四方)、RNA を抽出・精製し、リアルタイム PCR により風疹ウイルスの同定を行った。保存臍帯から抽出した RNA は夾雑物が非常に多く、さらに不安定であるため、核酸抽出試薬を用いてビーズ破碎と氷冷を 10 回以上繰り返して

抽出した。

②風疹ウイルスの遺伝子型同定

得られた風疹ウイルス遺伝子型識別領域をPCRにより増幅し、塩基配列を解析した。さらに出生時期に流行が報告されている遺伝子株との整合性を確認した。

(倫理面の配慮)

本研究における検体提供の際には、患者または保護者に以下の点を記した文書を作成し、口頭でも説明する。同意は所定の同意書に署名を求める。

- 1) 保存臍帯の提供は親権者の自由意思によるため、提供の有無に関わらず今後の診療の中で不利益を受けないこと。
- 2) 本研究に同意したあとでも、参加について自由にとりやめることができるが、結果の公表後の同意撤回は不可能であること。
- 3) 提供を受けた保存臍帯は本研究のみに使用し、他の目的には転用しないこと。
- 4) 研究は国立成育医療研究センターと新潟大学において、匿名化の上で行われ、個人情報情報は厳密に保護される。
- 5) 研究の結果は学会や論文で発表されるが、その際個人が特定されるような形では公表されないこと。

倫理委員会受付番号 720「先天性難聴児に対する乾燥臍帯を用いた母胎風疹ウイルス感染検索」

平成25年10月2日

C 研究結果

① 感度および特異度

現在までに9例のCRS症例（1982年生まれ～2013年生まれ）の臍帯検査を行うことができた。さらに9例共に風疹ウイルスのRNA

が検出された。うち、現時点では2例についてはDNA解析が可能であり、当時流行していたウイルス株と一致した。2例のコントロール症例はすべて陰性であった。現時点では感度・特異度はほぼ100%となった。ただし、遺伝子型については、9例中2例のみ決定できたものであるが、いずれも同時期に流行していた株と一致した。今後他の検体についても条件を変えて検討を行う必要がある。

② 対象症例の抽出

千葉子ども病院および成育医療研究センターを受診した先天性難聴患者のうち、それぞれの難聴遺伝子検査および臍帯を用いたサイトメガロウイルス（CMV）胎内感染検査について検討を行った。

- a) 千葉子ども病院では難聴186例中難聴遺伝子変異例が76例、CMV陽性が4例、原因不明が106例であった。
- b) 成育医療センターでは難聴185例中難聴遺伝子変異例は80例、CMV陽性が9例、原因不明が96例であった。原因不明の先天性難聴はそれぞれ先天性難聴と診断された症例の57%（106例）、52%（96例）であった。

③ CRS特有の臨床所見

a) 成育医療研究センターでは6例のCRS症例の臨床所見を検討し、6例中5例に難聴が認められたこと、そのうち1例は生後半年までに進行性に聴力の低下が認められた。

b) 千葉子ども病院では、1歳過ぎてから聴力の低下がみられるようになった症例が認められている。

発達評価検査では、難聴が認められなかった1例、および1歳過ぎてから聴力低下が進行した1例については、現時点ではほとんど運動発達障害は認められていない。

④ 母の風疹罹患

成育医療研究センターでは、6例中3例が不顕性感染であった。また、ワクチン接種の既往があるにも関わらず風疹に罹患した症例も指摘された。

⑤ 早期診断・早期介入の体制構築

難聴の早期診断と介入は児の発達を促すために重要であることはすでに明らかである。しかし、個別に調査を行ったところウイルス排泄の問題から難聴医療および療育が十分にうけられていない児が少なくないことが判明した。またCRSと確定診断されている症例がそれほど多くないため、その特徴や介入効果などが周知されていないことも判明した。

今後実態を調査して体制の問題点を検証していく必要がある。

⑥ 検査工程の般用化

1検体のRNAの抽出工程では6時間以上を要するため、工程の簡略化による作業時間の短縮が必要であることが明らかになった。今後保存臍帯に残留するウイルスRNAを効率良く確実に得るため、裁断方法を標準化し、抽出作業を汎用化する方法を検討している。また、抽出されるRNA溶液に含まれている夾雑物質の組成が後の測定に影響を与えないよう多くの検体を処理してトラブルシューティングを作成することが重要である。

さらに、臍帯を保存しているのはわが国の風習であるが、海外ではほとんど行われてなく、汎用性が少ない技術であることが指摘されている。これに対し、新潟大学ではマスキング事業により保存されている血液ろ紙を使用してウイルスRNAを検出するための体制を整備している。

D. 考察

本研究の目的は、保存臍帯を用いた胎内風疹ウイルス感染検索方法の新規開発を行うことである。すなわち、臍帯を用いて安定したRNAウイルス抽出方法の技術開発を行い、さらにその技術を用いて原因が明らかではない先天性難聴児の周産期風疹ウイルス感染の有無を検索することにある。

我々が開発している方法では、保存された乾燥臍帯により風疹ウイルスRNAを証明することが可能であった。感度は高く、CRSであることを診断するには大変有用であると考えられた。この技術が汎用化することにより、原因不明と診断されていた難聴、発達障害、てんかんなどの症例に対して風疹ウイルスがどの程度関与しているのかが明らかになると考えられ、さらに風疹ウイルスの胎盤感染による難聴発症のメカニズムの解明や予防の為のワクチン、治療薬の解明につながる可能性がある。

また将来的には、トキソプラズマ感染、単純ヘルペスウイルス感染、水痘・帯状疱疹ウイルス感染などの胎盤感染が与える影響についても検証できる可能性があり、新潟大学(斎藤)が指摘するように、保存臍帯による微生物検索の実施体制を周知、構築し、大切な情報源である保存臍帯を廃棄することなどのないように徹底することも重要と考えられた。

現在の本技術の問題点は、RNAの検出に際し、収量や純度が明らかにならず抽出効果も高くない可能性があること、抽出したRNAには多量の夾雑物が混入している可能性があるため除去の必要があること、などから遺伝子型決定のためにも、できる限り工程を少なくしながら効率の高いRNAの精製を検討・開発していく必要があり、今後も

汎用化のための技術開発、改良を行っていく予定である。

E. 結論

本年度は短期間であったため、手順の確立と方法論の開発が中心であったが、手法を用いた臍帯からの風疹ウイルス感染検索は検査の感度はほぼ100%と考えられた。今後信頼性を高めること、および遺伝子型決定の条件を変えて検討する必要があると考えられた。本手法を用いて潜在性CRSの頻度が明らかになることで、風疹抗体検査や風疹ワクチン接種などの妊娠中の風疹対策に資するものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Miyata I, Kubo T, Miyairi I, Saitoh A, Morimoto N. Successful detection and genotyping of rubella virus from preserved umbilical cord of patients with congenital rubella syndrome. Clin Infect Dis. 2015. 15:60(4):605-7.

2) 守本倫子. 先天性風疹症候群. JOHNS 2014;30(11):1585-1588

3) 守本倫子、鈴木法臣、土橋奈々、原真理

子. 2012-2013年の風疹流行に伴う先天性風疹症候群症例の検討. Audiology Japan 2014;57(5):449-450

2. 学会発表

1) 守本倫子. 風疹症候群. 日本耳鼻咽喉科学会専門医講習会アドバンスセミナー 2016. 11. 22

2) 守本倫子、鈴木法臣、土橋奈々、原真理子. 2012-2013年の風疹流行に伴う先天性風疹症候群症例の検討. 第59回聴覚医学会、2014年11月27日、下関

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

3. その他：なし

H. 健康危険情報

なし

II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

保存乾燥臍帯からの RNA 抽出技術の開発・改良

担当責任者 宮入 烈

国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 感染症科医長

研究要旨

先天性風疹症候群が疑われる患者において、保存臍帯を用いた後方視的診断法の開発に関わる技術的な検討を行った。先天風疹症候群 6 例中 6 例の患者の保存臍帯から風疹遺伝子が検出されたが、遺伝子型解析に至ったのは 2 例にとどまった。技術的な課題として①臍帯からの RNA 抽出法の最適化、②風疹ウイルス RNA 検出法の最適化、③風疹ウイルス遺伝子型の解析法の工夫が必要と考えられた。

A. 研究目的

先天性風疹症候群が疑われる患者における、保存臍帯を用いた後方視的診断法の開発と最適化。

B. 研究方法

保存臍帯からの RNA 抽出

保存臍帯を、部位が偏らないよう、またその重量が約 20 mg となるよう裁断し、試料とした。これを、AGPC (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) 法を基にした核酸抽出試薬である ISOGEN (株式会社日本ジーン) とビーズ破砕機を用いて処理した。

処理工程は次の通りである。ステンレスビーズの入った 2 ml 容の強化チューブに試料と ISOGEN を加え、ビーズ破砕と氷冷を 10 回繰り返す。この上清を回収し、再度 ISOGEN を加え、ビーズ破砕と氷冷を 10 回繰り返す、同様に上清を回収する。この上清をまとめ RNA 粗抽出液とする。これを -70℃の冷凍庫にて凍結させた後、室温にて

融解させ、この上清を回収し夾雑物質を除去する。ここにクロロホルムを加え分液し、水相を回収する。ここに再度クロロホルムを加え分液し、水相を回収し混入しているフェノールを除去する。続いて夾雑物質を除去する為に、得られた水相に塩化リチウム溶液を加え-20℃の冷凍庫にて冷却し、沈殿を回収する。さらに 80%エタノールを加え沈殿を回収し、風乾にて乾燥させる。以上の処理により得られたペレットを専用の溶液に溶解させ、保存臍帯から抽出された総 RNA 溶液とする。

風疹ウイルス遺伝子のリアルタイム PCR による検出

既報のリアルタイム PCR 検出系 (A: Hübschen JM, et al. J Virol Methods 2008; 149:246-50. B: Okamoto K, et.al. J Virol Methods 2010;168:267-71) を用いて風疹ウイルス遺伝子を検出した。過去に検出限界の解析を行い、約 1×10^1 copies/20 μ L と確認されている。RNA 抽出に関する陽性対照として GAPDH の mRNA に対するリアル

タイム PCR 検出系を用いた。

風疹ウイルスの遺伝子型解析

抽出された RNA からの cDNA の合成には Random 15-mers (Stangegaard M, et.al., *BioTechniques* 2006; 40:649–57.)を用いた。既報に従い、風疹ウイルスの遺伝子型解析に必要な 739-bp 領域を含む 1039-bp アンプリコンを増幅した (*Wkly Epidemiol Rec* 2013;88:337–43.)。増幅が得られなかった場合は、国立感染症研究所の病原体検出マニュアルに従い、重複を含む2つのアンプリコンを増幅した。増幅産物の配列の解析は Eurofins Genomics K.K.(Tokyo, Japan)で行い World Health Organization の基準配列と比較した。

倫理面への配慮

本研究は患者・保護者のインフォームドコンセントおよび国立成育医療研究センターの倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

過去に先天性風疹症候群と診断された6名の患者、健常児2名を含む8名の患者臍帯を用いて検討が行われた。既報Aを用いた検討では6例全例が陽性、既報Bでは4例が陽性と判定された。陰性コントロール2例は検出限界未満と判定された。GAPDHは全8例で陽性であった。遺伝子型解析では2例で増幅、解析が可能であり、系統樹解析では国内検出株の clade 2B と相同性が高かった。(Miyata I, et al. *Clin Infect Dis.* 2015.15;60(4):605-7)

D. 考察

保存検体から風疹ウイルス遺伝子を検出することが可能であることが確認された。

その一方で、遺伝子解析による証明がなされたのは2例にとどまり、また実験手法も比較的煩雑である。

RNA 抽出工程における問題点と改善方法：RNA の抽出工程だけで6時間以上を要するため、工程の簡略化による作業時間の短縮化が必要である。保存臍帯の形状は様々であり、残存するウイルス RNA を効率よく確実に得るための裁断方法の標準化が必要である。RNA の抽出にビーズ破砕機を用いているが、効率がよくより一般的な器具や方法を採用し、抽出作業を汎用化する。

抽出される RNA 溶液には様々な夾雑物質が含まれているが、これらは保存臍帯の形状により大きく組成が異なる。この夾雑物質が後の測定に影響を与えることがある為、多くの検体を処理し、トラブルシューティングを作成する。

E. 結論

CRS 患者の保存臍帯を用いた、リアルタイム PCR 法による後方視的診断は可能である。核酸のより効率よい抽出方法と、確定診断をつけるための遺伝子型解析法の改善が必要である。

F. 研究発表

Miyata I, Kubo T, Miyairi I, Saitoh A, Morimoto N. Successful detection and genotyping of rubella virus from preserved umbilical cord of patients with congenital rubella syndrome. *Clin Infect Dis.* 2015. 15;60(4):605-7.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

保存検体からのウイルスの安定した抽出法の開発と解析体制の構築

担当責任者 齋藤昭彦

新潟大学大学院医歯学総合研究科小児科学分野 教授

研究要旨

本研究の目的は、先天性難聴患者に対して、保存臍帯を用い、胎内での先天性風疹ウイルス感染検索を行うことにある。これまでに、保存臍帯を用いて、その診断に成功したが、保存検体の処理とその診断法は煩雑であり、より簡便なで、かつ、精度の高い診断法が開発が望まれる。また、今後、より多くの先天性難聴の症例を集積し、その診断を行うと同時に、この診断法を用いて、他の先天性感染症の診断を含め、実際の臨床の現場での診断の構築と運用を行っていく予定である。

A. 研究目的

本研究の目的は、先天性難聴に対する保存臍帯を用いた胎内先天性風疹ウイルス感染検索方法の新規開発を行う上で、1) 臍帯や他の保存検体を用い、安定した RNA ウイルス抽出方法に関わる技術開発を行うこと、2) 臍帯などの保存検体を用いた解析体制の構築とその実際の運用を行うことにある。

B. 研究方法

①安定した RNA ウイルス抽出方法に関わる技術開発

我々は、保存臍帯からの風疹ウイルス RNA 抽出に成功し、その診断意義を報告したが (Miyata I, *et al. Clin Infect Dis* 2015) 現在の方法は、複雑で、特殊技術を要する。したがって、現在の方法を踏襲しながら、より簡便に RNA を抽出する方法を検討する。具体的には、その破碎方法、臍帯の柔軟化、効率の良い RNA 抽出法などである。また、保存臍帯以外の検体であるマスキリーニングに用いられている血液ろ紙もその解析に用いる

ことが出来ると考えられ、その検体からの RNA 抽出の検討を行う。

②解析体制の構築と運用

風疹が原因になって引き起こされる先天性難聴以外にも、保存臍帯を用いて診断可能なができる先天性感染症が存在する。既に実施されているものとして先天性難聴の原因ウイルスであるサイトメガロウイルスがあげられる。この方法は、他の先天性疾患の診断にも有用であると考えられる。具体的には、トキソプラズマ感染症、単純ヘルペスウイルス感染症、水痘・帯状疱疹感染症などである。

これらの診断を行うためには、実際の症例を集積し、検査を実施することが重要である。本研究では、新潟大学医歯学総合病院の小児科医、特に新生児専門医にこの研究内容を周知し、今後、先天性感染症が疑われる場合に検体を採取できる体制を構築する。

C. 研究結果、考察

1. 安定した RNA ウイルス抽出方法に関わる技術開発

安定した RNA ウイルス抽出方法に関わる技術開発において、過去に実施した臍帯からの RNA 抽出法をより精細に検証した。また、今度、より優れた検出法の開発のために、取り組むべき具体的な抽出方法を検討した。更には、保存臍帯以外の検体であるマスキニングに用いられているろ紙などの保存検体の過去のウイルス DNA, RNA 抽出法などの具体的方法についても検討を行った。実際に検査を検討している検体として、新潟大学医学部小児科に保存されている新潟県マスキニング事業による過去の保存検体などである。

今後、ここで検討した内容を検討し、実際の検体からのウイルス RNA 抽出を実施し、より効率よく、かつ容易に抽出可能な方法を探索していく予定である。

2. 解析体制の構築と運用

保存臍帯によって診断が可能な先天性感染症（風疹、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、トキソプラズマなど）について、新潟大学医歯学総合病院内の小児科医、特に新生児専門医に周知した。今後、先天性感染症が疑われる場合に、保存臍帯による微生物検索が実施できるように啓発活動を行った。また、今後、

新生児を取り扱う新潟大学小児科の関連施設でも同様の啓発活動を行い、検体の採取を実施できるようにする予定である。

D. 結論

本年度は、実施期間が短期間であったため、実際の方法論の検討と基礎的実験を行った。今後、具体的な抽出法の検討、検体の採取を行う予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

先天性難聴児における潜在性CRSの出生頻度の検討及びCRS難聴児の言語発達評価

担当責任者 仲野 敦子
千葉県こども病院 耳鼻咽喉科部長

研究要旨

妊娠初期に風疹罹患した母体より出生し、出生直後より風疹抗体価の上昇、ウイルス分離がみられたが、ABR は正常であり精神発達も良好で他の症状も見られなかった児において、後天性進行性難聴が発症していた。難聴の発症時期は不明であったが、難聴診断時にはウイルスは陰性化していた。

発達良好な遅発性・進行性難聴の原因として、胎児期の風疹ウイルス感染も考慮する可能性があり、風疹ウイルスが検出されない時期での診断方法として、保存臍帯での検査の有用性が示唆された。

A. 研究目的

先天性風疹症候群は風疹ウイルスの胎内感染によって先天異常（白内障、先天性心疾患、難聴）を起こす感染症である。妊娠初期の初感染で多くみられ、先天性風疹症候群における難聴の発現率は約90%との報告もある。また、不顕性感染例からの発症や、遅発性難聴も報告されており、原因不明の先天性あるいは遅発性難聴児の中に風疹の胎内感染が原因の症例が含まれている可能性も考えられる。

出生直後には障害がみられず先天性風疹感染症であったが、その後難聴の診断となった先天性風疹症候群症例に関して、臨床経過とウイルス分離について検討したので報告する。

B. 研究方法

症例検討を行った。血液中の風疹抗体価の測定その他、咽頭、尿、血液、胃液のPCR検査を施行した。保存臍帯検査を予定している。

（倫理面への配慮）

臍帯検査に関して、院内の倫理委員会で承認された。

C. 研究結果

【症例】初診時1歳7カ月男児。妊娠10週に母体風疹感染あり。39週2770gで出生、出生後の検査で児のウイルス検査（PCR）は咽頭、尿、血液、胃液のすべて陽性であり、先天性風疹感染が確認された。心奇形、白内障、網膜症はなく自動ABRは両側パスで

あったため先天性風疹感染症と診断された。生後 10 か月には咽頭からのウイルス分離は陰性化した。ウイルス PCR 検査は、血液は生後 9 か月、尿は生後 10 か月、咽頭は生後 13 か月で陰性化した。

生後 3 カ月に頸定、生後 13 カ月で独歩開始と運動発達は良好であった。遠城寺式発達検査では運動・社会性は年齢相応で、言語には遅れがみられていた。

生後 6 カ月頃より音のでるおもちゃを左耳にあてる様子があったが、音への反応は良好であったためそのまま経過観察となっていた。1 歳 1 カ月頃左耳におもちゃをあてる状態が継続していたために他院耳鼻咽喉科を受診。滲出性中耳炎を認め治療。治療後に施行した COR 検査では 60 - 70dB での反応であり、ABR 検査は右無反応、左 V 波閾値 60dBnHL であったために、当院に紹介となった。

当院初診時は滲出性中耳炎はなく、COR 検査では 60 - 70dB での反応であった。ABR 検査、ASSR 検査も併せて右はほぼスケールアウトで、左は 60 - 70dB の水平型の難聴と診断した。

現在、補聴器装用を開始している。

【保存臍帯検査】

現在実施中である。

D. 考察

本症例は、妊娠初期の風疹感染であったにも関わらず、出生時には先天性風疹症候

群の症状はみられなかった。その後現在に至るまで、精神発達も良好であり他の症状の出現はみられていないが、難聴だけが遅発性に発症し、進行したものと考えられた。

先天性風疹症候群の難聴は 2014 年 1 月に日本周産期・新生児医学会の先天性風疹症候群診療マニュアルでは、6 歳（就学前）まで年 1~2 回の定期的な聴力評価（出生直後、生後 3 か月、6 か月以降 3 歳まで 6 か月ごと、3 歳以降 1 年ごと）を行うことが推奨されているが、マニュアルが作成される以前の症例であり、定期的な聴力検査が施行されていなかった。耳鼻咽喉科医だけではなく小児科医にも先天性風疹感染による後天性、進行性難聴の認識が少なかったと考えられた。本児においては、発達が良好であったことで難聴が疑われず、また滲出性中耳炎の合併があったことも難聴の診断が遅れた要因の一つであったと考えられた。

E. 結論

発達良好な遅発性・進行性難聴の原因として、胎児期の風疹ウイルス感染も考慮する可能性がある。風疹ウイルスが検出されない時期での診断方法として、保存臍帯での検査の有用性が示唆された。

F. 研究発表

2015 年 5 月開催の日本小児耳鼻咽喉科学会にて研究結果発表を予定している。

厚生労働科学研究委託費（障害者対策総合研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

先天性風疹症候群児の難聴および病態

担当責任者 守本倫子

国立成育医療研究センター 感覚器・形態外科部 耳鼻咽喉科医長

研究要旨

先天性風疹症候群 6 例の妊娠中の経過、難聴の程度、および難聴以外の臨床症状について検討を行った。難聴や発達遅滞が高率に認められ、療育の早期介入の必要性が高い。難聴の原因の 1 つとして、胎児期に風疹ウイルス感染をしたか検査できる方法を確立する必要性が感じられた。

A. 研究目的

2012-13 年に風疹が大流行した際に先天性風疹症候群（CRS）児の出生が増加し、例年 1-2 年程度の発生率が 2013 年だけで 30 人以上に上った。CRS 児は、出生後約 1 年近く尿や唾液、涙などからウイルス排泄を続けるため、2 次感染の危険が高く医療施設や療育施設などに参加することを敬遠される傾向がある。そこで、近年出生した CRS 児 6 例について、必要な介助や実態を明らかにすることを目的に検討を行った。

B. 研究方法

対象

2013-2014 年に出生し、出生直後の体液の PCR により CRS と診断され、当院で診療を行っている 6 例を対象にした。1 例は月齢 3 カ月で呼吸不全のため死亡していたが、その他の 5 例は検討した時点で 10 カ月-22 カ月であった。性別は男児 4 例、女児 2 例であった。これらについて、母の風疹罹患の既往、難聴の程度、難聴以外の症状および療育の状況について検討を行った。

C. 結果

風疹罹患時期

6 例中 3 例は在胎 9 週-12 週の妊娠初期に風疹罹患の既往があった。他 3 例は罹患時期は不明である不顕性感染であった。予防接種歴は 6 人中 4 人は既往があることを確認できているが、2 人は妊娠経過中には全く疑われなかった症例であった。咽頭ぬぐい液にて PCR 検査で診断された。また出生時の母の年齢は 26 歳~42 歳であった。

難聴以外の臨床症状

6 例中、肝脾腫 2 例、出血斑 3 例、血小板低下 3 例、心疾患 3 例、白内障・網膜症 4 例が認められた。6 例中 4 例は Apgar score(5 分)で 7 点以下であり、数日酸素または呼吸器装用を必要とした。頭部 MRI または CT 検査にて石灰化や髄鞘化不全などが指摘されたのは 4 例であったが、全例運動発達の遅れは認められた。

難聴の程度

6例中4例はABRにて両側105dBで全く波形が得られなかった。さらに1例は出生直後のABRで両側70dBの閾値にて波形が認められていたが、生後4カ月時に再度検査を行ったところ右90dB、左105dBまで閾値上昇が認められた。残りの1例は聴力は正常であったが、1歳6カ月頃から左軽度聴力低下が指摘されている。補聴器装用は3カ月で死亡した1例および聴力がほぼ正常である1例を除く4例に対して開始した。装用開始時期は6カ月-12カ月であり、全身状態が悪いとなかなか耳鼻科受診ができなかったことから遅くなる傾向があった。補聴器装用により音への反応はわずかに認められているがまだ明らかではない。

D. 考察

先天性風疹症候群(CRS)は妊娠20週までに罹患した場合は心疾患や中枢神経疾患など重篤な全身病変を合併するが、20週を越えて罹患した場合は難聴だけ認められることが多いとされている。CRSの難聴の特徴として、左右非対称であり、一側性のこともあるとされている。また、難聴の程度も軽度から重度までであるが、感染が妊娠初期に近いほど高度であるとされ、さらに長期的に観察することにより1-2歳頃までに遅発性に難聴が進行した例も報告されている。今回、出生から4カ月までの間にABRの閾値上昇が認められた症例があり、CRS児に対しては定期的な聴力の評価が必要であると考えられた。

今回経験した6例では、3例は明らかに妊娠初期に母が風疹に罹患したことが明らかであったが、他3例は不顕性感染と考えられたため臨床症状から診断された。このため、風疹の罹患時期は明らかではない。しかし、全例難聴以外の合併症を伴ってお

り、少なくとも妊娠前期に罹患したの可能性がうかがわれた。母胎が不顕性感染の場合は流行時期を考えて診断をされることになる。子宮内発育不良や出血斑、肝脾腫などの外からみてわかる典型的な症状があった場合は出生直後に検査が行われ、診断可能である。しかし、今回はなかったが、難聴のみの症状しかなかった場合、CRSの診断は疑われなかった場合困難であり、出生後約1年間ウイルスを排泄するため、さらに新しい感染を引き起こす可能性が考えられる。

欧米ではワクチン政策が効を奏しており近年ではCRSの発症は報告されていないとされている。しかし、本邦では大流行は落ち着いているものの、2014年の春以降も常に風疹患者は報告が続いており、特に大都市に散見される。現在自治体でも風疹ワクチンの予防接種を呼びかける努力がされているが、今後もまだ流行は続く可能性が懸念されており、ワクチン接種の重要性を主張すると共に、先天性難聴または進行性難聴の原因の一つということを念頭におく必要があると考えられた。

E. 結論

先天性難聴、進行性難聴の原因として妊娠中の風疹ウイルス感染が関わっている可能性があり、不顕性感染も少なくない。早期介入を実現するためにも、さかのぼってCRSを診断する方法を確立することが必要と考えられた。

F. 研究発表

Miyata I, Kubo T, Miyairi I, Saitoh A, Morimoto N. Successful detection and genotyping of rubella virus from preserved umbilical cord of patients with congenital