

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）

研究代表者 氏名 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 新潟大学小児科教授

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とにより近年  
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  
なくなき、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ても、発達が緩徐であったり、多動傾向にあることもあるため、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可能になる。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も可能になる。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。

2015 年からは先天性風疹症候群は小児慢性疾患特定事業の疾患として登録された。遅発性の難聴や成長してから発達遅滞などが明らかになったときに風疹ウイルスが関与した可能性が明らかになることは、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なく、児の今後の治療方針決定や医療環境を整備す

ることに大きな影響を与えることが可能になるが、現在のところ、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る。

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、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変化が認められたと報告しており、実際には難聴以外の症状がなく診断されていない CRS の存在を示唆している。しかし、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ため、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、というものである。

我々のグループは、抽出条件の最適化により、困難とされていた臍帯からの RNA ウイルス分離に成功した。さらに同じ手法を使って CRS 児の保存臍帯を提供いただき、そこから風疹ウイルスの 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。原因検索の手段として、CRS を診断できることで難聴の原因と治療、併発する中枢神経障害の予防につながる。疾患の特徴が明確になると、言語訓練や発達の評価など専門的な評価が可能になり、人工内耳手術などの医学的介入による効果も評価することが可能であり、それにより疾患に適した診療や療育体制の構築が可能になると考えられた。また、しばらくウイルスの

体液への排泄などが続く可能性があるため、早期診断は長期に渡る水平感染の機会を減少させる可能性につながる。

さらに、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。臍帯により、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、ひいては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。先天性難聴における潜在性CRSの頻度を解明し、エビデンスをもとに治療の基準や診断指針の策定を目的としている。

## 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、運動発達程度は遠城寺式発達評価により定期的に観察した。

### 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

#### RNA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。

#### 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

### 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。

### 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。

### 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例および難聴が1歳なってから進行した1例については、ほとんど運動発達障害は認められていない。

### 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。

### 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。

### 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。今後保存臍帯に残存するウイルス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。

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、涙や咽頭ぬぐい液などの体液よりウイルス分離が行われている。しかし、遅発性の難聴や成長してから発達遅滞などが明らかになったときに風疹ウイルスが関与した可能性をさかのぼって診断することは困難である。

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にワクチン、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・带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であると考えられた。

## 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