

厚生労働科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）

分担研究報告（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(H26-感覚-一般-005)

研究分担者 氏名 宮入 烈

所属・役職 国立成育医療研究センター 生体防御系内科部 感染症科

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 臍帯からの RNA 抽出法の最適化、風疹ウイルス RNA 検出法の最適化、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) とビーズ破碎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、ビーズ破碎と氷冷を 10 回繰り返す。この上清を回収し、再度 ISOGEN を加え、ビーズ破碎と氷冷を 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 の抽出にビーズ破碎機を用いているが、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