

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
新規開発に関する研究

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）	
全体の総括およびプロジェクトの推進	解析体制の構築と運用に関する研究
-----	1
守本倫子	
（資料）	のアンケート調査用紙
II . 委託業務成果報告（業務項目）	
1 . RNAウイルス抽出とゲノム同定に関わる技術開発に関する研究	-----30
宮入烈	
（資料）資料名	
2 . 本検査の特異度に関する研究	----- 60
齋藤明彦	
（資料）資料名	
3 . CRSによる難聴児の実態に関する研究	----- 80
仲野晶子	
（資料）資料名	
4 . CRSによる難聴児の実態に関する研究	----- 100
守本倫子	
（資料）資料名	
III . 学会等発表実績	----- 140
IV . 研究成果の刊行物・別刷	----- 150

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

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

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

分担研究課題 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

研究分担者 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）

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、精度の高い診断法の開発が望まれる。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

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スク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。

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、具体的な抽出方法の検討、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

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
（分担）研究報告書

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 年度障害者対策総合研究事業（委託費）(H26-感覚-一般-005)

研究分担者 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 2770 g 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）

先天性風疹症候群児の難聴および病態（H26-感覚-一般-005）

研究分担者 氏名 守本倫子

所属・役職 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果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 rubella syndrome. Clin Infect Dis. 2015. 15;60(4):605-7.

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

守本倫子：先天性風疹症候群． JOHNS

2014;30(11):1585-1588

G．知的所有権の取得状況

なし

6症例の症状

症例	難聴	白内障	心疾患	脳内石灰化	出血斑	血小板 低下	肝脾腫	呼吸	運動発達	妊娠中 罹患
1	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	15週
2	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	10週
3	(+/-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+/-)	(-)
4	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
6	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	6週

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「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」 機関名 国立成育医療研究センター

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
先天性風疹症候群の現状と対応（シンポジウム講演）	宮入 烈	小児感染症学会	2014.1	国内
風疹感染	守本倫子	日本耳鼻咽喉科学会専門医講習会	2014.11	国内
2012-2013年の風疹流行に伴う先天性風疹症候群症例	守本倫子、鈴木法臣、土橋奈々、原真理子	日本聴覚医学会総会	2014.11	国内

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載

掲載した論文（発表題目）	発表者氏名	発表した場所（学会誌・雑誌等名）	発表した時期	国内・外の別
Successful detection and genotyping of rubella virus from preserved umbilical cord of patients with congenital rubella syndrome	Miyata I, Kubo T, Miyairi I, Saitoh A, Morimoto N.	Clinical Infectious Diseases	2015	国外
先天性風疹症候群	守本倫子	JOHNS	2014	国内
2012-2013年の風疹流行に伴う先天性風疹症候群症例	守本倫子、鈴木法臣、土橋奈々、原真理子	Audiology Japan	2014	国内

Successful Detection and Genotyping of Rubella Virus From Preserved Umbilical Cord of Patients With Congenital Rubella Syndrome

Ippei Miyata,¹ Takahiko Kubo,² Isao Miyairi,¹ Akihiko Saitoh,^{1,3} and Noriko Morimoto⁴

¹Division of Infectious Diseases, Department of Medical Subspecialties,

²Division of Obstetrics, Center of Maternal-Fetal, Neonatal and Reproductive Medicine, National Center for Child Health and Development, Tokyo, ³Department of Pediatrics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, and ⁴Department of Otolaryngology, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Keywords. congenital rubella syndrome; preserved umbilical cord; retrospective investigation.

Congenital rubella syndrome (CRS), first documented in 1941 by Gregg [1], presents with multifarious manifestations involving multiple organ systems, including the ophthalmic, auditory, cardiovascular, and encephalic systems. These manifestations are identified in “transient,” “permanent,” and “delayed” (late-onset) manners.

Although investigation of CRS can be aided by disease surveillance information, it is challenging to confirm suspected cases in countries where rubella is completely or nearly eradicated. Cases of newborns with CRS born by women reinfected with either symptomatic or asymptomatic form of rubella have been reported in the literature. CRS cases with strictly delayed manifestations are likely to be missed at birth. For such cases, specimens for investigation may be limited by the time the symptoms become salient.

Between 2012 and 2013, Japan suffered from an epidemic of rubella [2], accumulating CRS cases in excess of 40 [3]. Clinical manifestations of CRS differ in each case. Some cases that were completely asymptomatic at birth subsequently developed into hearing difficulty and/or other CRS-associated symptoms.

In a quest for feasibly available potent specimens for retrospective investigation of CRS, we investigated preserved umbilical cords, which are usually treasured lifelong as an embodiment of maternofilial bond in the Japanese culture.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

Specimens in this study were collected with informed consent of the patient’s guardian and ethical approval from our institute’s internal review board. Preserved umbilical cords were voluntarily provided from individuals diagnosed with CRS (recruited from a CRS patient organization; diagnosed elsewhere), as well as from individuals with no signs nor circumstances indicative of CRS, serving as negative controls. Typically, the withered umbilical cord stump and/or a small portion of the severed umbilical cord are wrapped in paper, cotton, or gauze and preserved in a small wooden box (Supplementary Figure 1). A small fragment of approximately 20 mg was chipped off from each preserved umbilical cord for investigation.

The diagnosis of all our subjects, except for those born before April 1999, is based on the criteria under which all CRS cases are mandatorily reported to the national epidemiological surveillance system [2].

RNA Extraction

RNA was extracted as described elsewhere [4]. In brief, RNA was extracted by ISOGEN reagent (Nippon Gene Co, Ltd) in combination with a PureLink mini kit (Thermo Fisher Scientific), and eluted with nuclease-free water in volumes corresponding to 4 times the mass of the starting material. In the instance that glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) messenger RNA (mRNA) was negative (employed as a control for RNA extraction), high-salt precipitation was further performed and the RNA reanalyzed.

Real-time Polymerase Chain Reaction

Two primer/probe sets (“A” [5] and “B” [6]) for detecting rubella virus (RV), confirmed to be of comparable detection limits under our settings (approximately 1×10^1 copies/20 μ L; data not shown), were adopted from the literature. Another primer/probe set was employed for detecting mRNA for GAPDH [7], as a control of RNA extraction. RNA transcribed in vitro served as positive controls. Four microliters of the eluted RNA was amplified in a 20- μ L reaction on a CFX96 detection system (Bio-Rad). The thermal conditions were as follows: 42°C

Received 7 July 2014; accepted 28 October 2014; electronically published 6 November 2014.
Correspondence: Ippei Miyata, MD, PhD, Division of Infectious Diseases, Department of Medical Subspecialties, National Center for Child Health and Development, 2-10-1 Okura, Setagaya-ku, Tokyo 157-8535, Japan (miyata-i@ncchd.go.jp).

Clinical Infectious Diseases® 2015;60(4):605–7

© The Author 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved. For Permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

DOI: 10.1093/cid/ciu882

for 5 minutes and 95°C for 3 minutes, followed by amplification cycles of 95°C for 5 seconds and 60°C for 20 seconds.

Genotyping

Each specimen positive for RV by at least 1 detection method was subjected to genotyping. Expecting efficient transcription, complementary DNA was reverse-transcribed using random 15-mers [8]. To amplify the 739-bp sequencing window used for genotyping [9], amplification of a 1039-bp amplicon using the 2 primers, RV-gt-F and RV-gt-R, was attempted. If this failed, another protocol that amplifies the sequencing window in 2 overlapping short amplicons was adopted from the domestic manual of infectious agent detection for RV [10]. The sequences and orientations of the utilized primers are listed in [Supplementary Figure 2](#). Successfully amplified products by either strategy were sequenced at Eurofins Genomics K.K. (Tokyo, Japan).

The determined sequences were aligned with the sequences of the 32 World Health Organization reference strains [9]. Thirty-nine RV sequences determined in Japan between 2011 and 2013 were also chosen from GenBank to be included in this alignment. Using the 739-bp sequencing window, a dendrogram was constructed using the MEGA6 software [11].

RESULTS

Specimens Subjected to Analysis

A total of 8 umbilical cord specimens were collected and subjected to investigation; 6 were from individuals diagnosed with CRS (specimens 1–6), whereas 2 were from individuals with no signs nor circumstances indicative of CRS, serving as negative controls (specimens 7 and 8). The profiles of the 8 individuals from whom the umbilical cords were derived, and the analysis results mentioned hereafter, are summarized in [Table 1](#).

Real-time Polymerase Chain Reaction

All 6 CRS specimens proved positive for RV by primer/probe set B; among these, 2 were not proven positive by set A. The 2 negative control specimens remained negative for both RV detection methods. All 8 specimens proved positive for GAPDH mRNA, suggesting successful RNA extraction, although 1 negative control (specimen 8) required additional high-salt precipitation.

Genotyping

Genotyping could be achieved from 2 of the 6 RV-positive specimens. According to the dendrogram, these sequences clustered most closely with clade 2B, close to sequences from Japan ([Supplementary Figure 3](#)).

DISCUSSION

In this report, RV was successfully detected from preserved umbilical cords of all 6 CRS cases by real-time polymerase chain reaction (PCR). Despite the potential degradation of RNA during preservation and further specimen processing procedures, we managed to genotype the viral sequence in 2 of 6 RV-positive specimens. Accuracy and reliability of these sequences were suggested, as they clustered closely to other sequences determined in Japan between 2011 and 2013. To the best of our knowledge, there are no reports of utilizing preserved umbilical cord for detection or genotyping of RV in the literature.

In most retrospective studies on infections, the availability of specimens of interest is scarce, especially in the case of apparently healthy individuals. Nonetheless, there have been several reports of successful retrospective investigation of prenatal viral infections in developed countries, such as the utilization of Guthrie cards (dried blood spots) and umbilical cord blood. However, these specimens are not always readily accessible; Guthrie cards are conserved at public health agencies, and

Table 1. Background of Study Subjects and Results

Specimen No.	Status	Year/Week of Birth	CRS Triads			Detection/ Δ Ct		Accession No. ^a
			CA	HL	CCD	Set A [5]	Set B [6]	
1	CRS	2013/28	–	+	–	–2.6	–4.0	AB920562
2	CRS	1982/46	+	+	+	ND	2.5	
3	CRS	2012/47	–	+	+	ND	6.0	
4	CRS	2013/30	–	+	+	2.4	0.9	
5	CRS	2013/31	–	+	+	1.8	–0.5	AB920563
6	CRS	2002/48	–	+	–	1.2	0.5	
7	NC	2009/46	–	–	–	ND	ND	
8	NC	2011/42	–	–	–	ND	ND	

A negative Δ Ct value indicates that the threshold cycle of the specimen was smaller than the control RNA (ie, the specimen proved positive faster than the control). Abbreviations: Δ Ct, difference of threshold cycles of the specimen and control RNA of 4×10^2 copies/reaction; CA, cataract; CCD, congenital cardiovascular disease; CRS, congenital rubella syndrome; HL, hearing loss/impairment; NC, negative control; ND, not detected.

^a From DNA Data Bank of Japan (DDBJ).

umbilical cord blood is usually cryopreserved at appointed facilities. In contrast, preserved umbilical cords kept in the patient's home are easily accessible. In addition to our present investigation, there are reports on the successful utilization of preserved umbilical cords for retrospective investigation of prenatal infections by both DNA and RNA viruses.

The availability of preserved umbilical cord might be misunderstood as a limitation to our study, as some may believe that this is limited to the Japanese cultural background. To the contrary, similar customs of preserving the umbilical cord are documented among many countries and cultures ([Supplementary Data 4](#)). Thus, by paying attention to the cultural background of the patients, similar investigations might be possible worldwide.

There are several limitations to our study. First, the number of evaluated specimens was not substantial enough to discuss sensitivity/specificity. Nonetheless, we have demonstrated the suitability of preserved umbilical cord as a specimen for retrospective molecular detection of RV in suspected CRS cases. Second, the accuracy of the diagnosis of the oldest patient, born in 1982, was uncertain. However, this patient presented with the classic triad of CRS (ophthalmic, auditory, and cardiovascular involvements; [Table 1](#)); combined with the fact that Japan experienced a rubella epidemic in 1982 [[12](#)], evidence supporting the diagnosis of this case seems sufficient. Third, genotyping was not possible for 4 of the 6 CRS specimens. In addition to the potential degradation of RNA during preservation, the continuous force applied during the extraction procedure may have increased the chance of RNA shearing into fragments too short to serve as templates for sequence determination (739 nucleotides), but still permissible for real-time PCR detection (129 nucleotides). Meanwhile, RV had smaller threshold cycles in successfully genotyped specimens ([Table 1](#)), suggesting that higher RNA concentration favors genotyping. Hence, further optimization of the extraction procedure to overcome these factors may improve the suitability of the extracted RNA as a template for genotyping, as well as for real-time PCR-based detection, boosting the value of preserved umbilical cord as a specimen for retrospective molecular investigation.

Despite being a congenital condition, late-onset manifestations of CRS can take years before it is noticed. A definitive diagnosis can allow adequate patient care to be initiated earlier, and substantial proof of prenatal infection can also provide answers to patients who wish to know the cause of their conditions. Furthermore, diagnosing otherwise missed CRS cases may help to unveil unknown aspects and/or manifestations of the syndrome. However, current laboratory confirmation of CRS becomes very difficult after 1 year; in such situations, preserved umbilical cord can serve as an alternative specimen that extends this 1-year limit.

In conclusion, this is the first report of the successful detection and genotyping of RV from preserved umbilical cord

specimens of CRS patients. Notably, a specimen that has been preserved for 31 years was still of value. Our findings add to the evidence that preserved umbilical cord is a useful archive of prenatal information and can be utilized for retrospective investigations of other prenatal infections.

Supplementary Data

[Supplementary materials](#) are available at *Clinical Infectious Diseases* online (<http://cid.oxfordjournals.org>). Supplementary materials consist of data provided by the author that are published to benefit the reader. The posted materials are not copyedited. The contents of all supplementary data are the sole responsibility of the authors. Questions or messages regarding errors should be addressed to the author.

Notes

Acknowledgments. This study was approved by the Internal Review Board at the National Center for Child Health and Development, Japan (NCCHD). The authors thank Dr Julian Tang from the Department of Education for Clinical Research, NCCHD, for reviewing this manuscript. The authors also thank all the volunteers for providing their preserved umbilical cords.

Financial support. This work was supported by NCCHD, Japan (grant number 24-11).

Potential conflicts of interest. All authors: No reported conflicts.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

References

- Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. *Trans Ophthalmol Soc Aust* **1941**; 3:35–46.
- Centers for Disease Control and Prevention. Nationwide rubella epidemic—Japan, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **2013**; 62:457–62.
- Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases. Reports of congenital rubella syndrome (CRS) (as of 26 March 2014) [in Japanese]. Available at: <http://www.nih.go.jp/niid/ja/rubella-m-1111/rubella-top/700-idsc/4505-rubella-crs-20140326.html>. Accessed 11 November 2014.
- Miyata I, Saitoh A. Detection of enteroviral RNA from preserved umbilical cord. *J Clin Virol* **2013**; 56:274–5.
- Hübschen JM, Kremer JR, De Landtsheer S, Muller CP. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. *J Virol Methods* **2008**; 149:246–50.
- Okamoto K, Fujii K, Komase K. Development of a novel TaqMan real-time PCR assay for detecting rubella virus RNA. *J Virol Methods* **2010**; 168:267–71.
- ABI PRISM 7700 Sequence Detection System. User bulletin No. 2. Foster City, CA: Perkin-Elmer, **1997**.
- Stangegaard M, Dufva IH, Dufva M. Reverse transcription using random pentadecamer primers increases yield and quality of resulting cDNA. *BioTechniques* **2006**; 40:649–57.
- Rubella virus nomenclature update: 2013. *Wkly Epidemiol Rec* **2013**; 88:337–43.
- Mori Y, Otsuki N, Okamoto K, et al. Manual of infectious agent detection: rubella. [in Japanese]. 2nd ed. Tokyo, Japan: National Institute of Infectious Diseases, **2012**.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **2013**; 30:2725–9.
- Terada K. Rubella and congenital rubella syndrome in Japan: epidemiological problems. *Jpn J Infect Dis* **2003**; 56:81–7.

○守本倫子，鈴木法臣，土橋奈々，原 真理子
国立成育医療研究センター 耳鼻咽喉科

【はじめに】先天性風疹症候群は、妊娠中の風疹ウイルス感染により難聴、心疾患、白内障、発達遅滞

など様々な先天異常を生じる疾患である。予防にはワクチン接種が有効であるが、1994年の予防接種法改正により集団接種から個別接種になり、ワクチン接種率の低下と風疹罹患率の増加がみられるようになった。ちょうど妊娠・出産の適齢期にある20歳—40歳の女性は風疹の血清抗体価が低く罹患しやすかったことから、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病院受診には2次感染対策を確実にしなければならない。また、多様な症状があるため複数科受診が必要になることもあって今回当院に通院されることになった、CRS児は6例であった。CRSは海外でも発生率は低くなってきているため、今回同時期の罹患症例についてまとめて報告する。

【症例】

対象の月齢：6症例のうち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。

出生体重：1例のみ、正常体重で出生しているが、他5例は全例2500g以下の低出生体重児であり、うち1例は1125gと極低出生体重児であった。

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り、そのうち1例は発育遅延のため母の抗体価を測定して診断、2例は出生後の臨床症状からCRSを疑われて咽頭ぬぐい液にて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。6例中1例は生後8カ月頃から角膜の混濁が認められ、進行性の白内障にて診断された症例であった。

難聴について：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。

療育：補聴器装用開始した 4 例については、全例当院の言語聴覚士により聴能訓練の介入が行われている。しかし、4 例のうち、咽頭ぬぐい液によるウイルス排泄陰性化が認められたのは 3 例で 6 カ月、7 カ月、10 カ月の時期であり、さらに 1 例はまだ陰性化していない。このため、補聴器装用開始してもしばらく感染の可能性があることから聾学校などの個別指導も受けることができず、遠くから当院に通う以外の指導が不可能であった。また、運動発達の遅れもあるため療育施設への通園指導が予定されている。

【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、臨床症状から診断された例であったため、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ではないかと考えられた。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。

12月23日のニュース

へその緒から風疹ウイルス遺伝子を検出 (12月23日 17時56分)

東京の国立成育医療研究センターが、最長で生後30年以上たったヒトのへその緒から風疹ウイルスの遺伝子を検出することに成功しました。これまでは生後しばらくしてから子どもに難聴などの症状が出て風疹が原因かどうか調べる方法がなかったことから、早期の診断につながると期待されています。

風疹は、妊娠初期の女性が感染すると、生まれてくる赤ちゃんの耳や目、心臓などに障害が出る「先天性風疹症候群」になるおそれがあり、おととしから去年にかけての流行では45人の赤ちゃんがこの症候群と診断されました。しかし、難聴などの症状は成長とともに出てくることがあり、生まれてから時間がたつと風疹が原因かどうかを調べる方法がないことが課題になっていました。国立成育医療研究センターの研究グループは、風疹ウイルスが妊婦から胎児にへその緒を通して感染することから、生後も保管されているへその緒からウイルスを検出できないか調べました。その結果、先天性風疹症候群と診断された生後3か月から3年たった6人のへその緒から遺伝情報を伝えるRNAを抽出し調べたところ、すべてから風疹ウイルスの遺伝子が検出されたということです。この方法が確立すれば症候群かどうかを早期に診断することができ、将来的には治療

方法の開発にもつながると期待されています。また、先天性風疹症候群は来月から小児慢性特定疾患に指定され、症候群と診断された患者には医療費が補助されることになっていて、補助を受けるうえでも今回の方法が役立つと期待されています。研究グループの国立成育医療研究センター耳鼻咽喉科の守本倫子医師は「診断されていない先天性風疹症候群の患者は大勢いると思う。難聴などの原因が分からない患者に、今回の検査法を使って診断することで、社会的、医療的な支援につながれば」と話しています。

へその緒を提供した岐阜市の可児佳代さん(60)は、娘の妙子さんを妊娠中に風疹に感染し、妙子さんは心臓の重い障害が原因で13年前に18歳の若さで亡くなりました。娘のへその緒から風疹ウイルスが検出されたことについて、可児さんは、「やっぱり風疹だったと改めて思うのと、時間がたってもウイルスが消えないという驚きがあります。なんで難聴になったんだろうと悩んでいる方は多いので、検査などさまざまな手立てを受けられるようになればいいなと思います」と話しています。

12月23日のニュース一覧 へその緒から風疹ウイルス遺伝子を検出 (12月23日 17時56分)

▶ トップページへ戻る



リンク集

NHKサイトを離れます

【厚生労働省】 風しんについて

て

【国立感染症研究所】 国立感染症研究所による風疹Q & A先天性風疹症候群とは感染症発生動向調査(風疹の発生状況。毎週更新されます)【東京都感染症情報センター】 東京都内の風疹の発生状況

過去のニュース

月を選んでください ▼

11月	2014年12月						1月▶
日	月	火	水	木	金	土	
7	8	9	10	11	12	13	
14	15	16	17	18	19	20	
21	22	23	24	25	26	27	
28	29	30	31				

日付をクリックしてください