

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10771

研究課題名(和文) 妊娠中のウイルス胎盤感染が児の聴力に与える影響についての研究

研究課題名(英文) Relation of viral infection during pregnancy to hearing-impaired children

研究代表者

守本 倫子 (Morimoto, Noriko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・感覚器・形態外科部・医長

研究者番号：40286555

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中の経胎盤感染を出生後しばらく経過してから後方視的に診断する方法はない。しかし我々はDNAウイルスより不安定で断片化している風疹ウイルスRNAを乾燥臍帯より抽出、RT-PCR法にて同定できる方法を確立し、感度80%・特異度100%となった。偽陰性となった検体は、症状が軽くウイルスRNA含有が少ない可能性と、RNAの断片化により検出域から外れてしまった可能性が挙げられた。本法の確立により、今後ウイルス胎盤感染を確実に診断し、将来生じうる障害の予防につなげられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to diagnose after long time passes whether it is infected during pregnancy.

Rubella virus is an RNA virus, so it is said to be more unstable and difficult to extract than DNA virus. We established a method to reliably identify rubella virus RNA from dry umbilical cord by RT-PCR method. As a result, it was possible to establish a procedure with sensitivity of 80% and specificity of 100%. The cause of false negatives is the possibility that the symptoms are light, the viral RNA content is low, and the possibility that it has deviated from the detection area due to RNA fragmentation. It will be necessary to raise invention and reproducibility to raise sensitivity more in future.

研究分野：聴覚 小児耳鼻咽喉科

キーワード：胎盤感染 遅発性難聴 ウイルス感染 先天性風疹症候群 RNAウイルス 乾燥臍帯

1. 研究開始当初の背景

妊娠中のウイルス感染により出生児は様々な影響をうけることがある。その中でも先天性サイトメガロウイルス (CMV) 感染や先天性風疹症候群では妊娠中にウイルスの胎盤感染が生じることで出生直後から重篤な難聴やその他の合併疾患を有する場合と、遅発性に 1-2 歳以降になってから難聴やてんかんなどを生じる場合の 2 つのパターンがある。後者の場合、妊娠中の不顕性感染や典型的な症状が認められなかった場合、児が出生直後にウイルス感染を診断されることが不可能である。一方、海外の報告では風疹が流行した年に出生した難聴児の眼底を検査したところ、先天性風疹症候群によく認められるウイルス性網膜変性が約 30% に認められたと報告しており、本邦での原因不明先天性難聴の中に、風疹ウイルスや、または他のウイルスが胎盤感染したことが原因になっている例が混在している可能性が指摘されている。

妊娠中の経胎盤感染は、出生直後には診断可能であるものの、出生後しばらくすると児から直接ウイルスを検出することは不可能になり、また抗体価を調べても経胎盤感染か出生後の感染かを判断することも不可能であった。出生直後にすべての児のウイルススクリーニングすることができることが理想ではあるが現実的に不可能である。このため、原因不明の難聴や胎盤感染が疑われる場合に、成長してからも検査できる方法が望まれていた。

一方、先天性サイトメガロウイルス感染では、すでに臍帯を用いて RT-PCR を行い、サイトメガロウイルス DNA を検出する方法はかなり確立している。また、RNA が不安定であるため不可能とされていた、風疹ウイルスの遺伝子を保存臍帯から検出することも成功した。胎盤感染を明らかにすることは、臨床的に予後や治療法に影響を与えるため大変

重要で期待されている。そこで本研究では、この技術を標準化できるようにし、原因が明らかになっていない難聴児について、ウイルス胎盤感染を証明することを検討することにした。

2. 研究の目的

原因が明らかではない先天性・進行性難聴症例における胎盤ウイルス感染関与について検討することを目的とする。特に RNA ウイルスである風疹の胎盤感染を証明すること、この技術を標準化することを目的とした。

3. 研究の方法

先天性風疹症候群と臨床的に診断されている患者様から臍帯を CRS 患者および比較対象の対照症例に対して同意を得た上で、乾燥保存臍帯または臍帯血濾紙の供与を受け、その一部 (5mm 四方) を検体とし、mRNA を抽出し、精製した。さらに、国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアルの記載を参考に含有量が極微量の風疹ウイルス特異的遺伝子の検出に対応した、real-time RT-PCR 法及び conventional RT-nested PCR 法での検出を行った。得られた RNA の遺伝子型を決定して、風疹ウイルス感染の有無を検討した。この方法を用いて、臨床的に先天性風疹症候群と診断されている 15 人の患者より保存臍帯の一部を採取し、保存臍帯の風疹ウイルス RNA を測定した。また、遺伝子検査などで原因が明らかになっていない難聴児 29 人 (多くは風疹が流行した 2013 年前後に出生) から臍帯を供与してもらい、検査を行った。

4. 研究成果

先天性風疹症候群 15 症例の臍帯を検討したところ、Real time PCR にて 12 症例は陽性が得られた。この 12 症例に対して Nested PCR も行ったが、これは 3 例が陽性となったのみであった。また 4 例は遺伝子の同定も可能で

あり、そのうち 1 例は 30 年以上前の臍帯であった。この結果より、本手法による検査の感度は 80%、特異度は 100%と考えられた。陰性となった 3 例の臍帯はいずれも 30 年以上前のものであった。この方法を用いて、原因が明らかになっていない難聴児 29 例の臍帯も検査したが、今のところ陽性は認められていない。

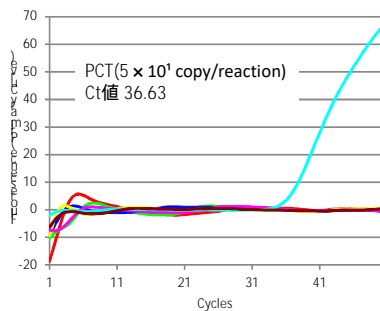
1. 手技の確立

1) サンプルング：臍帯の血液が混じている部位よりも、血管壁の方がウイルス RNA は得やすいことが明らかになった。

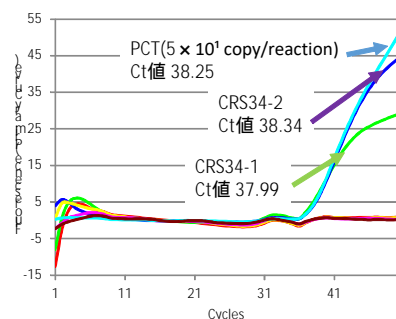
2) ホモジナイズ：ビーズビート法からディスポーザブルな器具を用いたモルタル・ペッセル法が効率がよかった

3) 総 RNA 抽出：AGPC 法に、多糖類を主とした夾雑物の除去工程、RNA の回収率を向上させる工程を追加することで効率の良い総 RNA 抽出が可能になった。

図 real-time RT-PCR 法を用いた風疹ウイルス NS 領域の検出



対照群



先天性風疹症候群

4) 風疹ウイルス特異的遺伝子の検出法：加水分解プローブを用いた real-time RT-PCR 法は、加水分解プローブの塩基配列のミスマッチによる特異的遺伝子の検出力の急激な低下や、one-step RT-PCR が基本原理であるため、検体由来の夾雑物による逆転写反応や PCR の阻害を受けやすいといった欠点がみられた。このため、Real-time RT-PCR 法による測定において風疹ウイルス特異的遺伝子が検出限界以下であった検体に対し、開発した conventional RT-nested PCR 法による追加測定を行うことで改善が認められた。

臍帯で風疹ウイルス RNA を検出する技術の難しさは、DNA と比較して、RNA は不安定であることにつける。感度や特異度も高く、陽性と得られた場合は風疹の母胎感染があったと診断できる。しかし、陰性であったからといって母胎感染がなかったとはいえないだろう。

偽陰性となった理由としては、ほとんどの検体が 30 年以上の古いものであったため、技術の限界、臨床診断の違い、などが考えられた。

技術の限界

RNA が壊れており、検出が困難だった可能性がある。検出する NS 領域を短くすれば、それだけ検査で陽性となる可能性は高くなる都考えられたが、digital PCR を用いて検査しても擬陽性が増加してきたため、精確性に支障をきたすことが懸念された。

臨床診断の違い

実際に母が風疹に罹患しても必ずしも胎盤感染するわけではないため、PCR などで確認されていない 30 年前の診断が曖昧である可能性も指摘された。

出は 5 例中 2 例で可能であったことから、検出されにくいものの、検査が不可能であるわけではない。逆に 2013 年などの比較的新しい臍帯ではかなり高精度にウイルス RNA を検出できることが判明した。小児の進行性難

聴例など、出生直後には風疹感染などが疑われなかった患者に対して、確定診断をつけた場合この検査方法は有用であると考えられた。このように疑わしい症例を重ねていくうちに、潜在性の未診断先天風疹症候群を診断することができるのではないかと考えている。

本法は、臍帯を保存する文化のある日本だからこそ可能であった。しかし、近年では感染などの配慮から臍帯を廃棄してしまう医療施設もある。風疹は30%に不顕性感染があるため、未診断例はあると考えられる。妊娠中に何があったのか、未診断例を発見することで、原因が明らかになるだけではなく、先天性風疹症候群やその他のウイルス母胎感染に付随してみられる将来の障害の予防につなげられることを期待することができる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 5 件)

守本倫子: ウイルス感染の動向 風疹ウイルス. 日耳鼻 2015; 118(7): 907-910

守本倫子: 病原微生物検出情報. 国立感染症研究所 2015;36(7):7-9

守本倫子: 母子感染 TORCHZ 症候群 耳鼻咽喉科からみた先天性風疹症候群 Aizawa Y, Yamanaka T, Watanabe K, Oishi T, Saitoh A. Asymptomatic Children Might Transmit Human Parechovirus Type 3 to Neonates and Young Infants. J Clin Virol 2015;70:105-8.

Nirei J, Aizawa Y, Okazaki M, Kobayashi A, Onozuka J, Numata O, Oishi T, Saitoh A. Human Parechovirus Type 3 Infection: A Cause of Apnea in Premature Infants. Pediatr Int

〔学会発表〕(計 9 件)

守本倫子, 小森学, 仲野敦子: 臍帯を用いた風疹ウイルスの診断. 日本耳科学会, 長崎, 2015.10.9

守本倫子: 小児耳鼻咽喉科領域における感染症の取扱い—予防できたかもしれない感染症をどうみるか. 宮崎小児感染症研究会, 宮崎, 2016/7/7

難聴を認めた先天性サイトメガロ感染症 14 症例の検討、口頭、仲野敦子、有本友季子、工藤典代、松永達雄、第 60 回日本聴覚医学会, 2015/10/21

風疹感染、口頭、守本倫子、第 28 回日耳鼻専門医講習会、2014/11/22、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、2014/11/28

2012 - 2013 年の風疹に伴う先天性風疹症候群の経過および指導について。口頭、柳澤 瞳、守本倫子、日本聴覚医学会、東京、2015/10/22

2012 2013 年の風疹流行に伴う先天性風疹症候群の実態に関する調査。柳澤瞳、藤井可絵、吉浜圭祐、小森学、守本倫子。小児耳鼻咽喉科学会 2016/6/30

耳鼻咽喉科からみた先天性風疹症候群 守本倫子、生殖免疫学会 東京 2017/12/2 日

Morimoto N, Komori M, Yoshihama K, Fujii K, Kashii H, Nakamura H: Hearing impairment associated with asymptomatic cCMV. ESPO Lisbon, 2016/6/18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

守本倫子（MORIMOTO, Noriko）
国立成育医療研究センター耳鼻咽喉科・医長
研究者番号：40286555

(2)研究分担者

宮入烈（MIYAIRI, Isao）
国立成育医療研究センター感染科・医長
研究者番号：10296626

齋藤昭彦（SAITO Akihiko）

新潟大学医学部小児科学・教授
研究者番号：30531389

(3)連携研究者

中村浩幸（NAKAMURA Hiroyuki）
国立成育医療研究センター・母児感染研究室
長
研究者番号：70256866

(4)研究協力者

泉田亮平（IZUMITA Ryouhei）
新潟大学医学部小児科学・大学院生

枝吉美奈（EDAYOSHI Mina）

国立成育医療研究センター感染科・研究助手