

Bioengineering 101, 251-6. 2006.

2) 竹腰正隆, 前田史子: ヒト型モノクローナル抗体の開発, ヘルペスウイルス学—基礎・臨床研究の進歩—日本臨床64: 512-517, 2006

3) 竹腰正隆, 前田史子: 抗体医薬によるウイルス感染症の予防と治療 PHARMSTAGE 6 30-5. 2006.

2. 学会発表

1) 福島永子, 竹腰正隆, 前田史子, 石橋啓, 錫谷達夫. ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) がコードする Fc リセプターの性状 日本ウイルス学会 第54回学術集会 (2006.11.20, 名古屋)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

先天性サイトメガロウイルス感染症による 難聴発生機序の動物実験モデルによる研究

分担研究者：筒井 祥博（浜松医科大学病理学第二）

研究協力者：小杉伊三夫（浜松医科大学病理学第二）

李 立（浜松医科大学病理学第二）

研究要旨

先天性サイトメガロウイルス（CMV）感染症においてなぜ難聴が起きやすいかその病理発生と予防法の確立のために、マウスを用いた実験モデルを確立した。ウイルスの脳内感染と腹腔内感染による内耳のウイルス感染細胞の分布を調べた。その結果2種類の感染経路ともに外リンパに感染しやすく内リンパに感染しにくいことが分かった。血液・内リンパ関門以前の外リンパ内皮および周囲の間葉系細胞に感染しやすく、炎症を伴っていた。感染防御反応に着目し、内耳と脳における TNF- α および INF- γ を測定した。その結果、2種類のサイトカインともに LPS の投与によって低下することが明らかとなった。このことはエンドトキシン耐性による局所の生体防御の低下が感染の促進に関わっていると考えられる。

A. 研究の目的

サイトメガロウイルス（CMV）は胎生期に感染して脳障害を起こす最も頻度の高い病原微生物である。全出産の0.4-1.0%にCMVの胎内感染が報告され、そのうち5-10%は出生時に、小頭症、脳室壁の石灰沈着、大脳皮質の菲薄化、小脳低形成、全身の黄疸、肝脾腫などを示して死亡する場合と、残りの約10%は出生時には無症状で生後数年して精神発達遅滞、視力障害、難聴、てんかん等の脳機能障害が生じてくることが知られている。特に難聴は高頻度に認められ、また小児の難聴の30%近くが先天性CMV感染症による可能性が高いとされている。

本研究の目的は、発育期のCMVの感染による難聴の発生機序を解明するためのマウス実験モデルを作成し、その病理発生に関わる要因を明らかにし、ヒトにおける予防法のための基礎を確立することである。

前年度までに、発育期マウス脳へマウスCMV（MCMV）を直接感染させ、内耳への感染を解析する方法を確立した。さらにMCMVを出生直後に脳へ直接感染すると、内耳へ感染することが明らかになった。より自然な感染系として、MCMVを周産期に腹腔内感染し、同時に細菌のエンドトキシンであるリポポリサッカライド（LPS）を脳内投与することによって内耳に感染することが明らかとなった。

今回はMCMVの脳内感染による内耳の感染と、腹腔内感染による内耳への感染におけるウイルス感染細胞の局在をより詳細に比較した。さらに腹腔内感染において、LPSの脳内投与がCMVの内耳への感染をなぜ促進するかについて、生体防御反応の観点から解析した。脳及び

内耳においてCMVに対する防御反応で最も重要なサイトカイン（INF- γ 及びTNF- α ）の定量を試み、LPSによるCMV感染感受性の増強との関連を検討した。

B. 研究方法

1) 感染方法

(1) 脳内感染：生後2日目のBALB/cマウスの右脳内へMCMVを 2×10^4 PFU投与し、感染6日目（生後8日目）に脳を取り出した。

(2) 腹腔内投与：生後2日目のBALB/cマウスの腹腔内へ 1×10^5 PFU投与した。感染前1日、感染後1日、3日、5日に右脳内Lipopolysaccharide（LPS）を $5\mu\text{g}/5\mu\text{l}$ 投与して感染6日目に脳を取り出した。

2) 内耳における組織標本の作製

エーテル麻酔下で左心室から4%パラフォルムアルデヒド（PFA）を注入して還流固定した。脳と側頭骨部を別々にして2日間固定した。側頭骨部は0.3M EDTAで1週間脱灰した。蝸牛の矢状断と平行に頭部を切り出し、パラフィン包埋し、連続切片によって内耳を同定した。

3) 免疫染色

ウイルス感染細胞はMCMV前初期遺伝子（IE1抗原）に対するモノクローナル抗体を用いた。ウイルス抗原陽性細胞は右側内耳および右側大脳切片あたりで数えた。

4) ウイルス感染価の測定

両側の側頭骨の内耳を含む部分を切り出し、ホモジネートにして、プラークアッセイを行った。ウイルス感染価は臓器あたりで示した。

5) サイトカインの定量

凍結保存した組織を超音波で破碎してホモジネートにし、サイトカインの測定にはホモジネート上清を用い、

Cytometric Bead Array System (BD Biosciences) によって定量した。ウイルス量及びサイトカイン量は両側内耳あたりで換算した。

C. 研究成果

1) 脳内感染と腹腔内感染における内耳におけるウイルス感染細胞の局在の相違

既に報告したように、脳内感染によって内耳へ感染することをウイルス抗原陽性細胞の免疫染色によって示した。腹腔内感染においては脳内へLPSを4回投与することによって、内耳に感染細胞を検出することが出来た。脳より内耳の方が感染細胞数が多く、これはウイルス感染価においても一致した。

今回は内耳におけるウイルス感染細胞の分布を内耳のセクション当たり定量的に調べてみた(表1)。腹腔内感染においては、蝸牛の鼓室階(ST) 8 ± 3 、前庭階(SV)の内皮に 7 ± 12 感染細胞をほぼ同等に認め、その周囲の間葉系細胞にも 19 ± 16 と多く認められた。しかし、内リンパ腔である中央階(SM)、それに接する螺旋靭帯(SL)には感染細胞を殆ど認めなかった。蝸牛神経(CN)に 35 ± 32 、その神経節(G)に 9 ± 8 と比較的多くの陽性細胞を認めた(表1および図1)。

一方脳内感染においては、蝸牛神経(CN)と鼓室階(ST)には比較的多く感染細胞を認めたが、腹腔内感染と同様に内リンパの中央階(SM)、螺旋靭帯(SL)では感染細胞を認めなかった(表1および図1)。

2) 腹腔内感染における内耳及び脳におけるTNF- α およびINF- γ の変化

脳へのLPSの投与によってなぜMCMV感染に対する内耳の感受性が亢進するのかが問題である。私たちは、Cytometric Bead Array System法によって、TNF- α 、INF- γ 、IL-6、IL-10、IL-12を定量した(図2)。非感染状態ではLPSの投与によって内耳のTNF- α の量はやや増加したが、MCMV感染によって有意に促進された。LPS投与されたMCMV感染マウスでは、脳及び内耳の何れにおいてもウイルス量の増加を認めた。この感染増強は内耳において顕著であった。LPS投与された感染マウスでは、内耳ホモジネート上清中のTNF- α 及びINF- γ 濃度は何れも対照に比べ著明に低下していた(図2A、B)。TNF- α は 17.0 ± 2.3 から 10.5 ± 1.7 pg/ml に、INF- γ は 54.1 ± 24.3 から 4.5 ± 1.9 pg/ml に低下し、INF- γ 濃度の低下が顕著であった(図2B)。脳では何れの実験群においてもサイトカイン濃度は内耳に比べ低値であった。また、同様のサイトカイン濃度の低下を認めたが変動は内耳よりも軽度であった。その他のサイトカインであるIL-6、IL-10、IL-12は検出限界以下であった。ケモカインの一種であるMCP-1は高値を示したが、感染、LPS投与によって一定の傾向を示さなかった。

D. 考察

脳内感染およびLPS投与下での腹腔内感染における内耳でのウイルス抗原陽性細胞を比較したが、両感染

ルートにおける内耳での感染細胞の分布に大きな違いは認められなかった。感染ルートがことなっても、外リンパである鼓室階、前庭階の内皮に感染しやすく、内リンパである中央階とそれに接する螺旋靭帯に感染細胞を殆ど認めなかった。螺旋靭帯には血管条 *stria vascularis* を含み、内リンパ産生に関与し、狭い意味での血管・内耳関門 *blood-labyrinth barrier* (BLB) をなしていると考えられる。中央階は蝸牛管 *ductus cochlearis* と呼ばれ、聴覚感覚装置を含む。この部分は感染から強く護られており、簡単には破壊されないように保護されている可能性が考えられる。サイトメガロウイルスによる難聴は、これ以外の部位である神経伝達などの障害による可能性が考えられる。

LPS投与下での腹腔内感染において、鼓室階、前庭階の内皮細胞に感染しやすいことが分かったが、その周囲の間葉系細胞にウイルス抗原陽性細胞が多く認められ、また、これら外リンパ周囲に炎症細胞の浸潤が目立った。このことはLPSの投与によって炎症が喚起され、そのことがMCMVの感染促進に働いていると考えられる。

今回脳及び内耳においてCMVに対する防御反応で最も重要なサイトカイン(INF- γ 及びTNF- α)の定量を試み、LPSによるCMV感染感受性の増強との関連を検討した。INF- γ 及びTNF- α はCMV感染に対する防御反応において重要な役割を担っている(Orange et al, *J Exp Med*, 1995)。MCMV感染に応答して前者は主にNK細胞・Tリンパ球で、後者は単球・マクロファージで産生され、何れも直接ならびに間接的作用によってウイルス増殖を抑制する。本研究においてもMCMVの感染によって脳及び内耳において両サイトカインの発現を認めた。しかし、LPS投与によってこれらサイトカインの発現は感染内耳及び脳の何れにおいても低下し、MCMV増殖の増加を認めた。LPSは通常 *Toll-like receptor* を介して単球・マクロファージを活性化してTNF- α 等の炎症性サイトカインの産生を誘導し、これらのサイトカインがNK細胞・Tリンパ球におけるINF- γ の産生を誘導すると考えられている。一方、本研究の様に致死量以下のLPSの頻回投与では逆にINF- γ 及びTNF- α 産生が抑制され、このような状態は“エンドトキシントランス”と呼ばれている(Varma et al, *Infection and Immunity*, 2001)。従って本研究のLPS投与によるMCMV感染の増強は、エンドトキシントランスに伴ったINF- γ 及びTNF- α 産生の低下がMCMVに対する感染防御能の低下を生じ、結果としてウイルス増殖を促進したことによると推測された。さらに、LPSによるサイトカイン濃度の低下が内耳において顕著であったことから、発育期の内耳はLPSによるCMV感染感受性の増強が脳よりも生じ易いと考えられた。また、ヒト先天性CMV感染症でCMVが脳より内耳に感染し易く、脳障害を伴わない難聴が生じ易いことが示唆された。LPSによって炎症反応が喚起されることがCMVの感染感受性に関連することは、先天性CMV感染症に細菌感染などによる慢性活動性炎症が併発することがCMVへの感受性の増強に繋がる可能性が示

唆された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ishiwata M, Baba S, Kawashima M, Kosugi I, Kawasaki H, Kaneta M, Tsuchida T, Kozuma S, Tsutsui Y: Differential expression of the immediate-early 2 and 3 proteins in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus. *Arch Virol* 151(11): 2181–2196, 2006.
- 2) 小杉伊三夫, 筒井祥博: 脳発達障害のウイルス感染モデル. *細胞工学*26 (1): 35–39, 2007.
- 3) 筒井祥博: 個体の発生と脳形成におけるサイトメガロウイルス感受性. *日本周産期・新生児医学会雑誌*42 (4): 724–732, 2006.
- 4) 筒井祥博: β ヘルペスウイルスの中枢神経系感染. *日本臨牀*64 (Suppl 3): 440–445, 2006.
- 5) 河崎秀陽, Mocarski ES, 筒井祥博: 神経幹細胞におけるシクロスポリンのサイトメガロウイルス感染抑制効果. 免疫の進化—シクロスポリン20年の軌跡(シクロスポリン学術国際シンポジウム編) 医薬ジャーナル社 pp.215–220, 2006.
- 6) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T: Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. *Microbes Infect* 9(2): 183–191, 2007.

2. 学会発表 (国際学会)

- 1) Tsutsui Y: Differential susceptibility to cytomegalovirus between mouse embryonic stem cells and neural stem cells. The 6th China Japan International Conference of Virology, Fudan University, Shanghai, China, 2006. 6. 22-24

3. 学会発表 (国内学会)

- 1) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: Experimental cytomegalovirus infection of mouse inner ear. 第96回日本病理学会総会 2007. 3. 14
- 2) 土田 孝, 金田正昭, 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 筒井祥博: サイトメガロウイルス肺炎における上皮—間葉転換 (EMT) の検討. 第96回日本病理学会総会 2007. 3. 15
- 3) 小杉伊三夫, 李 立, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: 発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス感染と脳障害発症機構の解析. 第96回日本病理学会総会 2007. 3. 13
- 4) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 筒井祥博: Experimental cytomegalovirus infection of mouse inner ear: the suppressed expression of cytokines during the enhancement of infection by LPS. 第54回日本ウイルス学会学術集会 2006. 11. 20
- 5) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 李 立, 韓 桂萍, 筒井祥博: マウスサイトメガロウイルスの大脳神

経細胞への感染指向性を決定する要因の解明: 組換えウイルスを用いた早期遺伝子 (m112/113) プロモーター活性の解析. 第54回日本ウイルス学会学術集会ワークショップ 2006. 11. 19

- 6) 片野晴隆 (感染研感染病理部), 佐藤由子, 筒井祥博, 佐多徹太郎, 前田明彦, 野沢直樹, 井上直樹, 倉田 毅: モルモットサイトメガロウイルスを用いた実験的ウイルス性内耳障害. 第54回日本ウイルス学会学術集会 2006. 11. 19
- 7) 筒井祥博: 個体の発生と脳形成におけるサイトメガロウイルス感受性. 第42回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会教育講演 2006. 7. 9
- 8) 筒井祥博: サイトメガロウイルス感染による脳発達障害の発生機序 Neuropathogenesis of developmental brain disorders by cytomegalovirus infection. 第29回日本神経科学大会 シンポジウム「発達障害の脳科学 Recent Advances in Neurodevelopmental Disorders」 2006. 7. 19
- 9) 李 立, 小杉伊三夫, 韓 桂萍, 河崎秀陽, 筒井祥博: 発育期マウスを用いた先天性サイトメガロウイルス内耳感染モデル. 第46回日本先天異常学会学術集会 2006. 6. 29
- 10) 筒井祥博, 石渡瑞穂, 小杉伊三夫, 河崎秀陽: サイトメガロウイルス前初期抗原 IE2及び IE3の感染培養細胞および発育期脳における発現様式の相違. 第10回日本神経ウイルス研究会学術集会 2006. 6. 9
- 11) 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 李 立, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: 発育期大脳神経細胞におけるサイトメガロウイルス持続感染と脳障害発症機構の解析. 第95回日本病理学会総会 2006. 5. 2
- 12) 李 立, 小杉伊三夫, 河崎秀陽, 韓 桂萍, 筒井祥博: Establishment of experimental cytomegalovirus infection of the developing mouse inner brain. 第95回日本病理学会総会 2006. 5. 1
- 13) 河崎秀陽, 小杉伊三夫, 李 立, 韓 桂萍, 土田 孝, 筒井祥博: サイトメガロウイルス感染におけるシクロフィリンの役割—siRNAを用いた解析. 第95回日本病理学会総会 2006. 5. 1

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 ウイルス感染細胞の内耳における分布

| | CN | G | ST | SV | M | SM | SL |
|-------|-------|-----|-------|------|-------|----|----|
| 脳内感染 | 28±21 | 1±1 | 18±19 | 3±14 | 11±18 | 0 | 0 |
| 腹腔内感染 | 35±32 | 9±8 | 18±13 | 7±13 | 20±16 | 0 | 0 |

CN：蝸牛神経 G：螺旋神経節 ST：鼓室階 SV：前庭階 SM：中央階 SL：螺旋靱帯 M：階周囲間葉系細胞

図1 脳内および腹腔内感染による内耳のウイルス感染細胞の分布

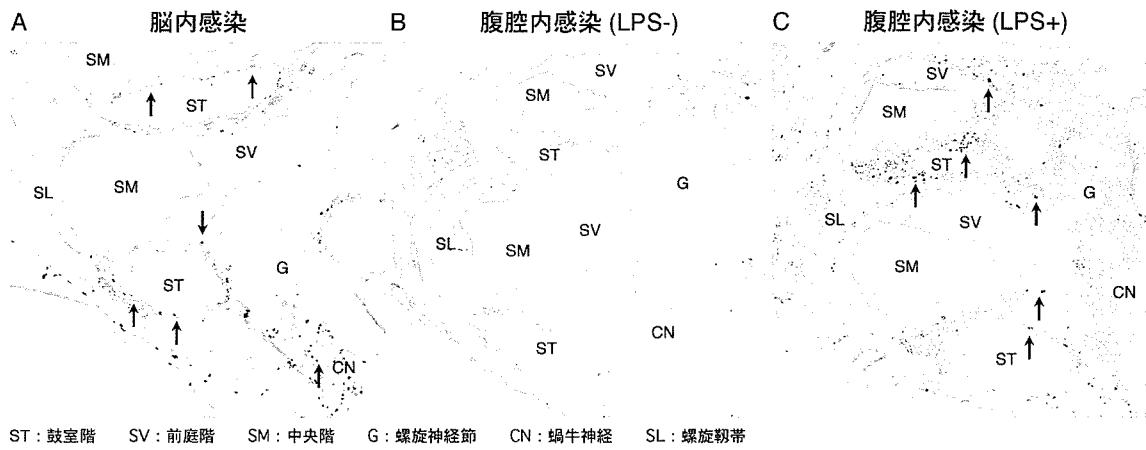
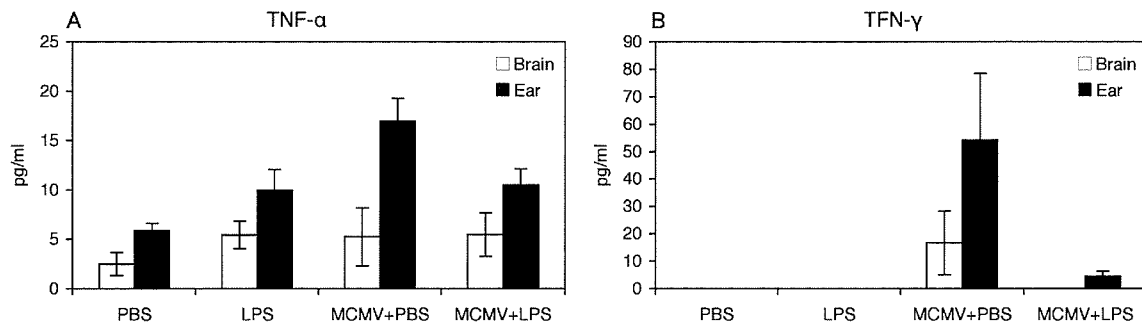


図2 腹腔内感染における脳および内耳の TNF- α および IFN- γ 濃度



モルモットサイトメガロウイルス関連聴覚障害の病理

分担研究者：片野 晴隆（国立感染症研究所感染病理部）

研究協力者：井上 直樹、野沢直樹（国立感染症研究所ウイルス1部）

倉田 毅、佐多徹太郎、佐藤 由子（国立感染症研究所感染病理部）

分担研究者 筒井 祥博（浜松医科大学病理学第二）

研究要旨

モルモットサイトメガロウイルス（GPCMV）を用いたモルモットへの感染実験はサイトメガロウイルスによる先天性難聴の発症機構を解明する上で有用な動物実験モデルである。本年度はGPCMV感染モルモット内の内耳以外の部位におけるGPCMV感染細胞の局在を、抗GPCMV抗体を用いた免疫組織化学で明らかにし、内耳への感染ルートの解明を試みた。皮下への接種実験では、感染1週間で脾臓や肺にGPCMVの早期タンパクの発現が見られた。特に脾臓にはGPCMV感染細胞が高い確率で認められた。感染3週後にはこれら内部臓器でのGPCMV感染細胞はまれで、唾液腺などにわずかに検出されるのみであった。これらのデータは感染初期には血行感染ルートが主であり、その後はウイルスに親和性の高い臓器でのみ増殖することを示している。これらのデータはヒトのサイトメガロウイルスの内耳への感染経路を考える上で重要な示唆を含むものと思われる。

A. 研究目的

昨年度の報告書でわれわれはモルモットサイトメガロウイルス（GPCMV）をモルモットの内耳に直接接種することにより、難聴を誘導し、感染モルモットの内耳におけるGPCMV感染細胞の局在を明らかにした。また垂直感染モデルでは同様に胎児の内耳におけるGPCMVの局在を明らかにした。これらの動物実験モデルではサイトメガロウイルス感染細胞は主に内耳の外リンパ液領域に認められ、一方で、感覚器として重要なコルチ器を含む蝸牛管などの内リンパ液領域にはGPCMV感染細胞はまれであり、このことから、コルチ器周辺の血管が傷害されることによる起こる循環障害と、神経組織がウイルスにより傷害されることにより生ずる神経伝達障害がサイトメガロウイルス関連難聴の本態と推測するに至った。なぜ、内リンパ液領域にウイルスが及ばないのか、なぜ、外リンパ液領域が主たるウイルス増殖の場となるのかは現在のところ不明で、今後の解析が待たれる。

サイトメガロウイルスの感染経路として、胎児では経胎盤感染が知られている。胎児に入ったウイルスはおそらく血行ルートにより、各臓器に分布し、親和性のある臓器でウイルスが増殖する。内耳はその一つと考えられるが、他にどのような臓器にどの程度の量のウイルスが存在するか、感染後のどの程度の時間経過でウイルス感染細胞数が変化していくかは、これまでのところ詳細な研究はない。本年度の研究は内耳までの感染経路を解明する目的で、ウイルス接種後の各臓器におけるGPCMVの分布を明らかにすることを目指した。また、前年度の研究で最も有用なツールとして働いたのはGPCMVに

対する特異抗体g-1であった。病理組織診断におけるサイトメガロウイルス感染症の診断はヘマトキシリンエオジン染色標本における核内封入体を伴った細胞の存在が有名であるが、核内封入体はウイルスが盛んに増殖している細胞でないと見られず、潜伏状態にある細胞などでは見ることができない。抗GPCMV抗体g-1を用いた免疫組織化学ではこうした核内封入体を伴わない感染細胞も陽性になることがあり、あきらかに核内封入体を観察するよりも感度が高い。そこで、本年度の研究でも、抗GPCMV抗体を用いた免疫組織化学により感染後のGPCMV感染細胞の分布を各臓器で検討したが、一方で、抗GPCMV抗体g-1がどのようなタンパクを認識するかは知られていない。本年度の研究では、これまで免疫組織化学で用いた抗GPCMV抗体g-1の性状についてもあわせて解析した。

B. 研究方法

1. モルモットへの感染実験

Hartley系クリーンモルモット（体重200g）の背部皮下、または腹腔に、培養細胞上清から調整した 1×10^6 TCID50のGP-CMVウイルス液を接種した。感染モルモットを感染後1週間後に屠殺するグループと3週間後に屠殺するグループの2群に分け、全身麻酔下で屠殺後、各臓器を摘出した。

2. 病理標本の作製と免疫組織学的検索

各臓器を摘出後、10%緩衝ホルマリンで固定した。パラフィン包埋したブロックから薄切片を作製し、シランコートガラススライドに貼付した。脱パラフィン後、0.25%トリプシン処理にて抗原賦活化処理を行い、リン

酸バッファーで洗浄後、抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体 g-1 を一次抗体として反応させた。洗浄後、免疫組織化学染色ではビオチン標識抗マウスイムノグロブリン抗体を二次抗体として、三次抗体にはペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを順次反応させ、ジアミノベンチジンで発色後、ヘマトキシリンで核染をした後、アルコール脱水、キシレン透徹、封入し、検鏡した。また、免疫染色とは別に各標本はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色で全体の形態変化を観察した。

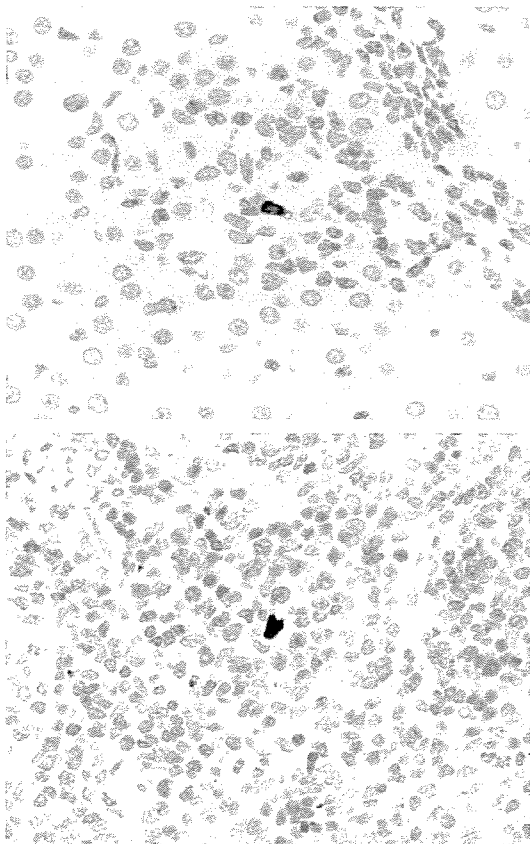
(倫理面への配慮)

動物実験は当該施設 (国立感染症研究所) の承認の後、国立感染症研究所動物実験ガイドラインに沿って行われた。

C. 研究結果

1. 抗 GPCMV 抗体 g-1 の性状

抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体 g-1 は 1986 年に筒井らにより得られた抗体である (Tsutsui Y., et al. Monoclonal antibodies to guinea-pig cytomegalovirus: an immunoelectron microscopic study, 1986 J Gen Virol 67: 107



図：感染 1 週間後に屠殺したモルモットの脾臓における GPCMV に対する免疫組織化学染色。ホルマリン固定後、パラフィンブロックを作成し、薄切片をシランコートガラスに貼付し、LSAB 法で免疫染色を行った。一次抗体は抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体 g-1。上図と下図は別の個体で、それぞれの中央に陽性細胞を認める。

-118)。GPCMV 感染細胞をマウスに免疫して作成されたものであり、g-1 と同時に b-16、b-29、d-13、e-16 などのいくつかの GPCMV に対するクローンが得られている。これらの抗体はいずれも蛍光免疫染色に使用できることが上記の論文に記載されているが、これらの抗体はいずれも異なるタンパクを認識すると考えられる。他のヘルペスウイルスと同様に、GPCMV は多くのタンパクをコードしているが、常に高発現しているタンパクは多くないものと考えられる。GPCMV 感染細胞を免疫組織化学で検出するにはこうした常に高発現するタンパクを標的にすることが望ましいが、上記 5 つの抗体のうち、どの抗体がもっとも免疫組織化学で有用かは、これまで、検討されていなかった。そこで、GPCMV 感染組織に上記 5 つの抗体を用いて免疫組織化学を行った。その結果、検索した上記 5 クローンのうち、GPCMV を特異的に検出したのは g-1 のみであり、他の抗体ではシグナルが微弱であったり、特異的なシグナルが全く見られないものもあった。感染細胞を用いたウエスタンブロットでは g-1 抗体は感染後 48-72 時間で発現する 50kDa のタンパクを認識し、このタンパク発現は phosphonoacetic acid (PAA) では阻害されないが、サイクロヘキシミドでは阻害される。こうしたウイルスタンパクの kinetics から g-1 抗体は GPCMV の早期タンパクを認識しているものと考えられた。

2. 各臓器における GPCMV 陽性細胞の分布

接種後、1 週間、および 3 週間後のモルモットは外見上、大きな変化が見られなかった。屠殺後、各臓器を取り出し、ホルマリン固定後、病理標本を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色標本で観察を行った。いずれの臓器にも核内封入体は認められず、GPCMV 感染を疑わせる所見もなかった。各臓器の標本を抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体 g-1 で染色したところ、感染後 1 週間の群では多くの個体の脾臓に少数ながら、GPCMV 陽性細胞が見られた (図)。GPCMV 陽性細胞は主に赤脾髄領域にみられ、脾腫等の所見は見られない。GPCMV 陽性細胞の種類についてはリンパ球か、線維芽細胞か、マクロファージか、判然としない。陽性細胞は一視野 (×100) に 0 個-数個を認めるのみであり、きわめてまれである。感染細胞は脾臓以外には肺、肝、腎、などでみられたが、いずれも感染細胞はまれで、封入体を伴うものは観察されなかった。

接種後 3 週間後に屠殺した個体の脾臓には GPCMV 感染細胞が見つからず、唾液腺を除く各臓器にも GPCMV の陽性シグナルは認められなかった (表)。唾液腺には一例のみに弱いシグナルを認めた。また、いずれの検体にも GPCMV 感染を示唆するような病変部は見あたらなかった。これにより、GPCMV は感染 1 週間後には血行性に各臓器に感染し、脾臓などの一部の臓器ではウイルスの複製も行われるが、こうした感染は一時的で、3 週間後には各臓器の感染細胞は消失し、唾液腺などの親和性の高い臓器に潜伏感染の状態で存在することが示唆される。

D. 考 察

今年度の成果として、(1)抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体の性状分析を行い、g-1抗体が免疫組織化学に使用可能であり、GPCMV の早期タンパクを認識する抗体であることが明らかになったこと。(2)g-1抗体を用いた免疫組織化学で感染1週後のモルモットの脾臓、肺、肝などに感染細胞を認めたが、これらは3週後に消失することが明らかになったこと、が挙げられる。1週後の感染は血行性感染を示唆し、その後の消失ではウイルスが常在し、増殖するには臓器親和性が必要であることが示唆された。

前年度までの実験と比較するとウイルスの感染性が下がっているのはウイルスを培養細胞から調整したことによる。GPCMV は通常、唾液腺で増殖、複製されたものを動物実験に用いるが、本実験結果から見たように臓器親和性、すなわち、細胞によりウイルスの増殖の仕方に大きな違いがあり、感染性に大きな差が生じたものと考えられる。いずれにせよ、皮下から接種して、脾臓や肺、肝などに GPCMV が分布していたことは血行性ルートを意味するものである。感染1週間後のウイルスの臓器分布は血行性に広がったウイルスが各臓器に到達し、一時的にその場の細胞に感染し、増殖したものと考えられる。3週間後の感染細胞の消失は免疫により排除された結果であろう。唾液腺内の GPCMV は免疫から逃れる機能を有しているのかもしれないが、推察の域を出ない。GPCMV の臓器親和性に関してはウイルス受容体(レセプター)や免疫機構が関与すると考えられる。内耳については内リンパ液、外リンパ液という構造上の特徴もウイルスの臓器親和性に関与するかもしれない。概して、内リンパ液は内耳よりも他の領域との交通がなく、独立したリンパ液として存在しているからである。今後、GPCMV 感染の分子メカニズムや増殖機構が明らかになるにつれ、臓器親和性も解明されていくことを期待したい。

E. 結 論

感染モルモット内の内耳以外の部位における GPCMV 感染細胞の局在を抗 GPCMV 抗体を用いた免疫組織化学で検索した。皮下への接種実験では、感染1週間で脾臓や肺に GPCMV の早期タンパク発現が見られた。感染3週間にはこれら内部臓器での GPCMV 感染細胞はまれで、唾液腺などにわずかに検出されるのみであった。これらのデータは感染初期には血行感染ルートが主であり、その後はウイルスに親和性の高い臓器でのみ増殖することを示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T. Pathogenesis of cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea

pig model. *Microbes Infect.* 9: 183–191, 2007.

- 2) Ueno T, Eizuru Y, Katano H, Kurata T, Sata T, Irie S, Ogawa-Goto K. Novel real-time monitoring system for human cytomegalovirus-infected cells in vitro that uses a green fluorescent protein-PML-expressing cell line. *Antimicrob Agents Chemother.* 50: 2806–2813, 2006.
- ### 2. 学会発表
- 1) Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nomura Y and Kurata T, Pathogenesis of guinea pig cytomegalovirus-associated labyrinthitis in a guinea pig model. 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, Washington, USA. 2006. 7.
 - 2) Ueno T, Eizuru Y, Katano H, Kurata T, Sata T, Irie S and Ogawa-Goto K. Establishment of a novel drug susceptibility test using a GFP-PML imaging assay. 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, Washington, USA. 2006. 7.
 - 3) Ueno T, Katano H, Eizuru Y, Kurata T, Sata T, Irie S, and Ogawa-Goto K. A novel real-time monitoring system for HCMV-infected cells in vitro using a GFP-PML-expressing cell line. 31st International Herpesvirus Workshop, Seattle, Washington, USA. 2006. 7.
 - 4) 片野晴隆, 佐藤由子, 筒井祥博, 佐多徹太郎, 前田明彦, 野沢直樹, 井上直樹, 倉田 毅. モルモットサイトメガロウイルスを用いた実験的ウイルス性内耳障害. 第54回日本ウイルス学会総会(2006.11, 名古屋)
 - 5) 上野智規, 片野晴隆, 佐多徹太郎, 入江伸吉, 後藤希代子. GFP-PML 発現細胞株を用いた HCMV モニタリング法. 第54回日本ウイルス学会総会(2006.11, 名古屋)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

| days | 肝 | 脾 | 子宮 | 肺 | 胸腺 | 腎 | リンパ節 | 唾液腺 |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| 7 | 1 / 11 | 6 / 11 | 0 / 11 | 1 / 11 | 0 / 10 | 1 / 11 | 0 / 7 | 0 / 11 |
| 21 | 0 / 5 | 0 / 5 | 0 / 5 | 0 / 5 | 0 / 5 | 0 / 5 | 0 / 4 | 1 / 5 |

表 GPCMV 感染細胞の分布。GPCMV 接種後 1 週間 (day 7) または 3 週間 (day 21) 後にモルモットを屠殺し、各臓器を取り出し、ホルマリン固定後、病理標本を作製した。抗 GPCMV マウスモノクローナル抗体 g-1 を用いた免疫組織化学により、GPCMV 感染細胞を検出した。表中の数字は陽性匹数 / 検索匹数を表す。

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-------------------------------|---|---------------------------|-----------------------------|--------------|-----|------|---------|
| 河崎秀陽, Mocarski ES, 筒井祥博 | 神経幹細胞におけるシ クロスポリンのサイト メガウイルス感染抑 制効果. | シクロスポリン学 術国際シンポジウ ム | 免疫の進化—シ クロスポリン20 年の軌跡 | 医薬ジャー ナル社 | 大阪 | 2006 | 215~220 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|--------------------------------|---------|---------------|------|
| Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N, Ishibashi K, Fujieda K, Inoue N, Omori K | Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations | J Infect Dis | 195(3) | 782~788 | 2007 |
| Kumar N, McLean K, Inoue N, Moles DR, Scully C, Porter SR, Teo CG | Human herpesvirus 8 genoprevalence in populations at disparate risks of Kaposi's sarcoma | J Med Virol | 79 | 52~59 | 2007 |
| Katano H, Sato Y, Tsutsui Y, Sata T, Maeda A, Nozawa N, Inoue N, Nomura Y, Kurata T | Pathogenesis of cytomegalovirus- associated labyrinthitis in a guinea pig model | Microbes Infect | 9 | 183~191 | 2007 |
| Ogawa H, Baba Y, Suzutani T, Inoue N, Fukushima E, Omori K | Congenital cytomegalovirus infection diagnosed by polymerase chain reaction with the use of preserved umbilical cord in sensorineural hearing loss children | Laryngoscope | 116(11) | 1991 ~1994 | 2006 |
| Ueno T, Eizuru Y, Katano H, Kurata T, Sata T, Irie S, Ogawa-Goto K | Novel real-time monitoring system for human cytomegalovirus-infected cells in vitro that uses a green fluorescent protein-PML-expressing cell line | Antimicrob Agents Chemother | 50 | 2806 ~2813 | 2006 |
| Ishiwata M, Baba S, Kawashima M, Kosugi I, Kawasaki H, Kaneta M, Tsuchida T, Kozuma S, Tsutsui Y | Differential expression of the immediate-early 2 and 3 proteins in developing mouse brains infected with murine cytomegalovirus | Arch Virol | 151(11) | 2181 ~2196 | 2006 |
| Akira Y, Takekoshi M, Morita E, Imai S, Nisizawa T, Hanada N | Production of the Fab fragment corresponding to surface protein antigen of Streptococcus mutans serotype c-derived peptide by Escherichia coli and cultured tobacco cells | J Biosci Bioeng | 101(3) | 251~256 | 2006 |
| Suzuki T, Nomoto Y, Nakagawa T, Kuwahata N, Ogawa H, Suzuki Y, Ito J, Omori K | Age-dependent degeneration of the stria vascularis in human cochleae | Laryngoscope | 116(10) | 1846 ~1850 | 2006 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|-------------------------|----------------------------|-----------------|-------------|---------|------|
| 小杉伊三夫, 筒井祥博 | 脳発達障害のウイルス感染モデル | 細胞工学 | 26(1) | 35~39 | 2007 |
| 筒井祥博 | 個体の発生と脳形成におけるサイトメガロウイルス感受性 | 日本周産期・新生児医学会雑誌 | 42(4) | 724~732 | 2006 |
| 筒井祥博 | β ヘルペスウイルスの中樞神経系感染 | 日本臨牀 | 64 (増刊3) | 440~445 | 2006 |
| 竹腰正隆, 前田史子 | ヒト型モノクローナル抗体の開発 | 日本臨牀 | 64 (増刊3) | 512~517 | 2006 |
| 竹腰正隆, 前田史子 | 抗体医薬によるウイルス感染症の予防と治療 | PHARMSTAGE | 6(5) | 30~35 | 2006 |
| 馬場陽子, 山田奈保子, 大森孝一 | 新生児聴覚スクリーニング後に当科を受診した症例の経過 | Audiology Japan | 49(5) | 425~426 | 2006 |
| 山田奈保子, 馬場陽子, 小川 洋, 大森孝一 | ムンプス両側聾に対し早期人工内耳手術を施行した1例 | Audiology Japan | 49(5) | 719~720 | 2006 |

関連する刊行物

| | |
|------------------------|--|
| 大森孝一, 錫谷達夫, 小川 洋, 馬場陽子 | 厚生労働科学研究・研究成果等啓発事業による成果発表会 (2007.3.11, 福島) 一般公開講座「難聴とウイルス」冊子 |
|------------------------|--|

IV. 研究成果の刊行物・別刷

Etiology of Severe Sensorineural Hearing Loss in Children: Independent Impact of Congenital Cytomegalovirus Infection and *GJB2* Mutations

Hiroshi Ogawa,¹ Tatsuo Suzutani,² Yohko Baba,^{1,3} Shin Koyano,⁴ Naoki Nozawa,⁵ Kei Ishibashi,² Kenji Fujieda,⁴ Naoki Inoue,⁵ and Koichi Omori¹

Departments of ¹Otolaryngology and ²Microbiology, Fukushima Medical University, and ³Department of Otolaryngology, Fukushima Rehabilitation Center for Disabled Children, Fukushima, ⁴Department of Pediatrics, Asahikawa Medical College, Hokkaido, and ⁵Department of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

(See the editorial commentary by Pass, on pages 767–9, and the article by Schleiss et al., on pages 789–98.)

Background. Sensorineural hearing loss (SNHL) is the most common congenital disease. Longitudinal studies of infants with congenital cytomegalovirus (CMV) infection have demonstrated an association between CMV and SNHL. However, because of the lack of suitable neonatally collected specimens, the proportion of CMV-associated SNHL has not been defined, nor has the relationship between CMV and the major genetic causes of SNHL, such as mutations in the *GJB2* gene.

Methods. Sixty-seven children with severe SNHL were analyzed for CMV and human herpesvirus 6 (HHV-6) infections and for *GJB2* mutations. DNA specimens were prepared from dried umbilical cords, which are available for everyone born in Japan. Four children with typical symptomatic infection at birth served as positive control subjects.

Results. Congenital CMV infection and *GJB2* mutations were identified in 15% and 24% of the patients, respectively. HHV-6 was not detected. All children with CMV-associated cases developed SNHL before they were 2 years old. Most children with CMV-associated SNHL had no obvious clinical abnormality at birth, and their viral loads were lower than those of symptomatic children.

Conclusions. Congenital CMV infection is an important cause of severe SNHL, and it has an incidence comparable to that of *GJB2*-associated SNHL.

Sensorineural hearing loss (SNHL) is the most common congenital disease, with an incidence of 1–3 cases/1000 live births, or ~3 times the frequency of Down syndrome [1–4]. Universal hearing screening programs for neonates have been established in several countries and communities on the basis of research findings that early intervention in infants with hearing loss facilitates lan-

guage development to a level comparable to that of their audiologically normal peers. The Joint Committee on Infant Hearing in the United States issued a statement of principles and guidelines to support the implementation of screening and intervention programs for SNHL in newborns [5].

Hereditary and environmental factors are involved in the etiology of pediatric SNHL (reviewed in [6, 7]). More than 20 genes are associated with autosomal-recessive inheritance, and 20 are associated with autosomal-dominant inheritance. Among them, mutations in the *GJB2* gene, which encodes the connexin 26 protein, represent the leading hereditary cause of hearing loss. Among environmental factors, viral infection is thought to play a major role in congenital SNHL. Successful vaccination for rubella in developed countries has virtually eliminated congenital rubella infection as a cause of SNHL; however, a decrease in the seroprevalence of cytomegalovirus (CMV), which may increase the potential of congenital CMV infection, has

Received 2 July 2006; accepted 12 September 2006; electronically published 6 February 2007.

Potential conflicts of interest: none reported.

Financial support: Ministry of Health and Welfare, Japan (Grant-in-Aid for Research on Sensory and Communicative Disorders to H.O., T.S., Y.B., K.F., N.I., and K.O.); Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation, Japanese Human Science Foundation (support to T.S. and N.I.); Fukushima Medical University (support to Y.B. and K.O.).

Reprints or correspondence: Dr. Naoki Inoue, Dept. of Virology I, National Institute of Infectious Diseases, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640, Japan (ninoue@nih.go.jp).

The Journal of Infectious Diseases 2007;195:782–8

© 2007 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1899/2007/19506-0005\$15.00

DOI: 10.1086/511981

been observed in these same countries [8]. SNHL is detected at birth in 5%–10% of neonates with evidence of congenital CMV infection. In addition, longitudinal studies of infants with congenital CMV infection clearly have shown that many infants who are asymptomatic at birth and have normal hearing will develop SNHL during early childhood. Thus, universal newborn screening for hearing loss misses a number of children who will ultimately have late-onset SNHL that is linked to congenital CMV infection [9–13].

Although many studies have reported an association between CMV and hearing loss, the precise proportion of SNHL cases caused by congenital CMV infection has never been measured directly. In addition, to our knowledge, no previous study has compared the prevalences of CMV and any genetic mutations, such as in the *GJB2* gene, in a single cohort. Discrimination of congenital infection from postnatal infection requires specimens obtained immediately after birth. Blood-spot samples routinely collected for phenylketonuria assessment have value for this purpose [14]. However, the limited retention period of the materials and issues related to privacy protection [15, 16] have hampered comprehensive and retrospective studies of the infectious etiology of SNHL. Previously, we demonstrated the feasibility of retrospective diagnosis of congenital CMV infection by using dried umbilical-cord specimens [17], which are traditionally provided by Japanese obstetric hospitals to parents as a precious keepsake. In the present study, we took advantage of this tradition to perform DNA-based assessments of the proportions of congenital CMV infection and *GJB2* mutations in children with early- and late-onset SNHL.

SUBJECTS, MATERIALS, AND METHODS

Study subjects. The collection and use of human materials for the present study were approved by the Ethics Committee on Human Subjects of each institute, and informed consent was obtained from parents of all patients. We enrolled 67 children (28 boys and 39 girls) with severe SNHL who were referred to the Fukushima Rehabilitation Center for Disabled Children and the Department of Otolaryngology, Fukushima Medical University, for early speech therapy, an externally worn hearing aid, or surgical intervention, including cochlear implant. The mean \pm SE of age of the patients at the time of referral was 68 ± 52 months (range, 0 months–16 years).

As a negative control, dried umbilical-cord specimens from 17 healthy children were used. As a positive control, dried umbilical cords were used from 4 infants (subjects 1, 12, 15, and 16) with symptomatic CMV infection who attended the affiliated hospitals of the Asahikawa Medical Colleges. Their clinical manifestations and laboratory findings were as follows: subject 1, pencephaly, intracranial calcifications, positive CMV culture and polymerase chain reaction (PCR) results, normal auditory brain stem response (ABR), and develop-

mental delay; subject 12, small for gestational age, petechia, seizure, hepatosplenomegaly, thrombocytopenia, intracranial calcifications, positive CMV culture and IgM results, developmental delay, and unilateral SNHL; subject 15, small for gestational age, hepatosplenomegaly, intracranial calcifications, positive CMV IgM and antigenemia results, developmental delay, and unilateral SNHL; and subject 16, petechia, intracranial calcifications, and positive CMV IgM and antigenemia results. Because their hearing levels were evaluated at a facility different from the ones at which we enrolled children with SNHL and because any genetic tests were not allowed for them, the results from control subjects were not integrated into the analyses of the SNHL cohort.

Clinical and audiological evaluations. Birth weight, gestational age, any clinical manifestations, and abnormal laboratory findings were identified from medical records. Interviews with family member(s), audiological tests, computed tomography (CT) imaging, and a mental and physical developmental evaluation were performed, if necessary, when patients with SNHL attended our facilities.

Hearing levels of the patients were measured by at least 1 of the following objective audiological tests: ABR and/or auditory steady-state response using Audera (GSI) or Navigator Pro (Biologic). The patients also underwent at least 1 of the following subjective tests: play audiometry, conditioned orientation reflex audiometry, and/or pure-tone audiometry. These tests were performed by audiological experts and were repeated at least twice to confirm measurements. Hearing levels of the patients were classified into 5 categories on the basis of the severity of the worst ear: profound (>90 dB), severe (71–90 dB), moderate to severe (56–70 dB), moderate (41–55 dB), and mild (20–40 dB). The onset of SNHL was estimated from the medical records and the interview. Cerebral palsy, autism, and other disorders were clinically evaluated by appropriate specialists.

DNA extraction. Dried umbilical cords were cut into 5-mm squares with a disposable scalpel. Genomic DNA was isolated using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) in accordance with the manufacturer's directions, except that specimens were incubated in the presence of proteinase K overnight. From 5-mm-square specimens, 5–10 μ g of DNA was recovered. DNA specimens were coded to ensure that assay operators were blinded to clinical information.

Analysis of the *GJB2* gene. A 0.9-kb DNA fragment containing the entire coding region of *GJB2* was obtained by PCR using *PfuI* polymerase (Promega). Primer sets 5'-TCTTTTCCAGAGCAAACCGC-3' and 5'-GGGCAATGCGTTAAACTGGC-3' or 5'-TCCAGAGCAAACCGCCCAGAGTAG-3' and 5'-TTGCCTCATCCCTCTCATGCTGTC-3' were used for PCR amplification. The PCR products were separated on agarose gels and purified by using a DNA extraction kit (QIAEX II; QIAGEN). The purified DNA fragments were sequenced with

the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE Applied Biosystems).

Diagnostic PCR assays. To detect CMV DNA, a 451-bp fragment derived from the conserved region of the CMV glycoprotein H gene was amplified from the DNA specimens by a nested PCR with primer sets as follows: outer primers 5'-TCTAAACAGAATCAGCAACATCTC-3' and 5'-CCTTGC GTGTCGTCGTATTCTA-3' and inner primers 5'-CAAGAACTCT-ACCTCATGGG-3' and 5'-ATGATGAGGCTCTGGCCTAC-3'. Cycle conditions for the first round were as follows: 1 cycle of 2 min at 95°C and 40 cycles of 20 s at 95°C, 1 min at 53°C, and 40 s at 72°C, followed by 1 cycle of 10 min at 72°C. Conditions for the second round were the same, except for 1 min at 48°C in place of 1 min at 53°C.

Real-time PCR was performed using TaqMan Universal PCR Master Mix (PE Applied Biosystems). Twenty-five microliters of reaction mixture contained 0.2–1.0 µg of umbilical-cord DNA, 1× TaqMan universal master mix, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 µmol/L each primer, and 0.25 µmol/L TaqMan probe. The PCR conditions consisted of 1 cycle of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 50 cycles of 30 s at 95°C and 1 min at 60°C for human albumin and CMV UL83 genes and 1 min at 58°C for human herpesvirus 6 (HHV-6) UL67. The reaction and data analysis were performed using the ABI PRISM 7500 system. For human albumin gene, primers and a probe described elsewhere [18] were used. DNA extracted from a human B cell line was used as a standard for quantification. For CMV, primers 5'-CGCAACCTGGTGCCCATGG-3' and 5'-CGTTTG-GGTTGCGCAGCGGG-3' [19] and the probe 5'-TTCGGCGA-AGATGC-3' were used. The entire UL83 open reading frame (ORF) of CMV strain AD169 was amplified by PCR and cloned into pcDNA3 (Invitrogen), and dilutions of the resulting plasmid were used as the quantitative standard. For HHV-6, primers and a probe were used as described elsewhere [20], except for 1 nucleotide alteration in the primer TAQ6 (AG-GAT→AGAAT). pH6Z-802 [21] containing the HHV-6B U67 gene was used as the quantitative standard. Cutoff values for positive detection of CMV and HHV-6 were defined to be 5 copies/reaction on the basis of detection of standard plasmid DNA.

Determination of CMV UL144 genotypes. A 577-bp DNA fragment containing the entire UL144 ORF was obtained by a nested PCR using *PfuI* polymerase. The following primer sets were used: outer primers 5'-TCTCGTATTACAAACCGCGGA-GAGGATG-3' and 5'-ACTCAGACACGGTTCCGTAAGTGC-TTC-3' and inner primers 5'-TTCCGGTAGGAGGCATGAAG-3' and 5'-GTGACTTCATCGTACCGTGA-3'. The first-round PCR cycle parameters were 1 cycle of 5 min at 96°C, 40 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 2 min at 72°C, followed by 1 cycle of 10 min at 72°C. The second-round PCR parameters

were 1 cycle of 3 min at 94°C, 45 cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 55°C, and 80 s at 72°C, followed by 1 cycle of 10 min at 72°C. The PCR products were purified and sequenced as described for the *GJB2* gene. The obtained sequences were analyzed using the ClustalW program (available at: <http://www.ddbj.nig.ac.jp/search/clustalw-e.html>).

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated using the χ^2 test.

RESULTS

Clinical and audiological assessment of SNHL cohort. All cases of SNHL analyzed were nonsyndromic, and there were no familial cases. Sixty-three case patients had bilateral SNHL, and 4 had unilateral SNHL. Cases of bilateral SNHL were categorized into profound ($n = 36$), severe to moderately severe ($n = 19$), and moderate to mild ($n = 8$). All 4 cases of unilateral SNHL were profound or severe.

CT imaging of temporal bones identified 2 cases of Mondini malformation and 1 case of malformation of the external auditory canal and middle ear among 28 patients with SNHL for whom the test was performed. Two patients had Down syndrome, and 1 had a chromosomal abnormality. Of the 67 cases, mental retardation was diagnosed in 31, cerebral palsy in 4, and autism in 3.

Prevalence of congenital infection with CMV and HHV-6. All 4 umbilical-cord DNA specimens from infants with symptomatic CMV infection at birth, but none of 17 healthy infants were CMV positive both by the nested PCR and by real-time PCR, which confirmed the accuracy of PCR using umbilical-cord DNA. Ten (15%) of 67 patients with SNHL were CMV positive by both assays. All CMV-positive cases had unique CMV UL144 gene sequences (data not shown), indicating that the positive PCR results were not due to laboratory contamination. Medical records indicated that 2 of these CMV-positive patients had intrauterine growth retardation (IUGR). One of the patients with IUGR had thrombocytopenia, ventricular dilation, and slight intracranial calcification at birth, although there was no laboratory confirmation of congenital CMV infection. Congenital CMV infection was confirmed by laboratory tests in the other patient. In addition to the patients with IUGR, 1 patient had cerebellar dysplasia, hydrocephalus, ventricular dilation, and intracranial calcification at birth, with laboratory confirmation of CMV involvement both by PCR of blood and urine specimens and by detection of anti-CMV IgM. The remaining 7 CMV-positive patients with SNHL had no clinical manifestations at birth; therefore, no laboratory examination was conducted. HHV-6 DNA was not detected in any of the 88 umbilical-cord specimens analyzed from our collection.

Incidences of the GJB2 defect. Connexin 26-inactivating mutations in the *GJB2* gene were present in 16 (24%) of 67

patients with SNHL. Eleven had homozygous mutations, including a 1-bp deletion at nt 235 (235delC) ($n = 10$) and a 16-bp deletion between nt 176 and 191 (176–191del16) ($n = 1$). Five patients had compound heterozygous mutations, including 235delC plus an alteration of G→A at nt 134 (G134A) ($n = 2$), G401A ($n = 1$), or 176–191delC ($n = 1$), and 176–191delC plus a 2-bp deletion at nt 299 and 300 ($n = 1$). Most of these mutations have been reported elsewhere [22]. Non-pathological polymorphic changes, including G79A, G341A, and T608C, were detected in more than one-third of patients. All CMV-positive patients had normal *GJB2* genes.

Possible etiologies other than CMV infection and *GJB2* defects. Other than CMV infection and *GJB2* defects, there were 5 patients with obvious genetic problems, including Down syndrome ($n = 2$), Mondini malformation ($n = 2$), and a chromosomal abnormality ($n = 1$). The group with unknown etiology included infants with extremely low birth weight (<1600 g) ($n = 4$) and those with a malformation of the external auditory canal and middle ear ($n = 1$), hyperbilirubinemia ($n = 2$), and the use of extracorporeal membrane oxygenation ($n = 2$). No cases were associated with rubella infection or meningitis. The group with unknown etiology may have contained patients with genetic mutations other than in *GJB2*, such as those in *GJB6* and in mtDNA.

Factors related to the etiology of SNHL. SNHL developed before age 2 years in all but 1 of the CMV-positive or *GJB2*-deficient patients with SNHL, whereas more than one-quarter of the patients with unknown etiology developed SNHL after age 2 years (table 1; CMV, $P < .05$). Importantly, at least 5 of the CMV-positive patients lost their hearing capability after age 6 months. Because there was some ambiguity of the onset age because of gaps in records and recollections, to verify the earlier onset of CMV- or *GJB2*-associated SNHL, we examined the ages when the patients were referred to our facilities for thorough audiological examinations and language therapy. Means and SDs of the ages at referral were 39 ± 20 , 46 ± 38 , and 83 ± 56 months for the CMV-positive, *GJB2*-deficient, and unknown etiology groups, respectively, which indicates that the patients with CMV- and *GJB2*-associated SNHL were referred earlier. The CMV- or *GJB2*-associated cases were characterized by more-severe hearing impairment than that in patients with unknown etiology (table 2; CMV and *GJB2*, $P < .005$).

Comparison of CMV loads. Viral loads of CMV-positive patients were measured and expressed as CMV DNA copy numbers per microgram of cellular DNA. As shown in figure 1, the patients with CMV-associated SNHL had substantially lower viral loads than the 4 positive control subjects—that is, children with typical symptomatic infection at birth. Because of the small number of CMV-positive patients, it was impossible to find

any significant relationship between CMV copy numbers and either estimated onset age or degree of hearing impairment.

DISCUSSION

In the present retrospective study of the etiology of SNHL, congenital CMV infection was associated with a substantial number of severe cases of SNHL. One-fifth of cases of SNHL with onset before 2 years of age were ascribed to congenital CMV infection, a proportion similar to that attributable to hereditary mutations in *GJB2*.

Previously, population-based rates of SNHL caused by congenital CMV infection were indirectly estimated from the following 3 components: population-based rates of congenital infection, rates of SNHL in cohort studies of infants with congenital CMV infection, and population-based rates of SNHL. Because the population-based rates of SNHL caused by congenital infection and of overall SNHL were estimated to be 0.2–0.6 and 1–3 cases/1000 live births, respectively, simple algebra yields an estimate that congenital CMV infection may account for 10%–60% of cases of SNHL (reviewed in [23]). Barbi et al. [14] reported that dried blood spots were positive for 9 (10%) of 87 infants with SNHL who had hearing loss at >40 dB. This prevalence may have been an underestimate, because (1) the relatively small amount of DNA that was extracted from the blood spots and (2) testing was conducted only for children whose SNHL was diagnosed at age <2 months. By contrast, we used specimens that afforded greater analytic sensitivity and enrolled patients spanning a wide range of age, from birth to age 16 years. Therefore, our retrospective study is the first comprehensive study that substantiates the estimates based on population-based studies.

A survey conducted by the Japanese government in 2002

Table 1. Etiology of sensorineural hearing loss (SNHL) and estimated age at onset.

| Estimated age at onset ^a | Congenital CMV ($n = 10$) | Genetic defects | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| | | <i>GJB2</i> mutation ($n = 16$) | Others ^b ($n = 5$) | Unknown ($n = 36$) |
| <2 years | 10 | 15 | 5 | 25 |
| Birth | 2 | 7 | 2 | 5 |
| <6 months | 3 | 1 | 0 | 7 |
| 6–12 months | 2 | 2 | 3 | 3 |
| 12–24 months | 3 | 2 | 0 | 2 |
| Not clear ^c | 0 | 3 | 0 | 8 |
| After 2 years | 0 | 1 | 0 | 11 |

NOTE. CMV, cytomegalovirus.

^a Based on medical records and interviews with family members

^b Mondini malformation ($n = 2$), Down syndrome ($n = 2$), or chromosomal abnormality ($n = 1$).

^c Age at onset known to be <2 years but could not be specified.

Table 2. Severity of sensorineural hearing loss (SNHL) and etiology.

| Etiology | Bilateral SNHL | | | Unilateral SNHL, profound and severe (n = 4) |
|-----------------------------------|-------------------|---------------------------------------|---------------------------|--|
| | Profound (n = 36) | Severe and moderately severe (n = 19) | Moderate and mild (n = 8) | |
| Congenital CMV infection (n = 10) | 8 (22) | 1 (5) | 0 | 1 |
| Genetic defects | | | | |
| <i>GJB2</i> (n = 16) | 14 (39) | 2 (11) | 0 | 0 |
| Others (n = 5) | 4 (11) | 0 (0) | 0 | 1 |
| Unknown (n = 36) | 10 (28) | 16 (84) | 8 (100) | 2 |

NOTE. Data are no. (%) of subjects. CMV, cytomegalovirus.

reported that 15,200 children with severe (>70 dB) hearing loss were officially registered as “disabled.” Because ~90% of them had SNHL, the incidence of severe SNHL was estimated to be 0.6 cases/1000 children <18 years old. Two-thirds of these children with SNHL had profound hearing loss (>90 dB). In the area with a population of 369,000 children from which our facilities have accepted referred cases, ~180 cases of SNHL have been officially registered. More than one-third of these were referred to us, and most of them were enrolled without any bias in the study. The enrolled cases had a spectrum of severities similar to that in Japan as a whole. Because only cases with hearing loss at >40 dB were referred, our study could not assess cases of mild SNHL. Further study is needed to evaluate congenital CMV infection in such cases.

The use of dried umbilical cords had 2 advantages: (1) Japanese tradition has made dried umbilical cords a specimen that is available for almost every person born in Japan, and (2) these are large specimens that provide much more DNA (5–10 µg) than can be recovered from conventional dried blood spots (~30 ng of DNA from a disc of 3 mm in diameter). The latter factor permitted us to perform a wider variety of tests for the patients with SNHL with a higher sensitivity than would have been possible using dried blood-spot specimens. As a result, we were able to compare the relative contributions of congenital CMV and HHV-6 infections and *GJB2* gene defects on the SNHL disease burden in the same population.

The progressive nature of congenital CMV-associated SNHL has been carefully described [11, 24, 25]. Consistent with prior descriptions, we found that all cases of CMV-associated SNHL occurred before age 2 years, but, in 5 of 10 cases, CMV-related SNHL was not detected before 6 months of age. In another study, congenital CMV infection was detected in only 1 of 20 cases of SNHL identified through newborn hearing screening, although the rate of *GJB2*-related cases (30%) was equivalent to what we observed in the present study (24%) [26]. Collectively, these findings demonstrate that the identification of infants at risk for SNHL will require a combination of universal auditory screening and newborn CMV screening. Screening for congenital CMV infection might lead to new treatment options

for CMV-infected infants with antiviral agents such as ganciclovir [27]. Importantly, CMV loads in patients with delayed-onset SNHL tended to be lower than those in positive control subjects (i.e., 4 children with symptomatic infection at birth). Although further study with a bigger sample size is required to confirm this finding, our finding is consistent with that of a previous report that demonstrated higher CMV loads in infants with symptomatic infection [28]. Thus, a sensitive assay for CMV detection is required for newborn CMV screening to identify asymptomatic patients who might develop SNHL later on. From this point of view, blood specimens may not be the best choice of specimens for the screening, because viral loads in blood specimens are >2 logs lower than those in urine specimens [29] (N.I. and S.K., data not shown). Because the use of dried umbilical-cord specimens is not practical for screening,

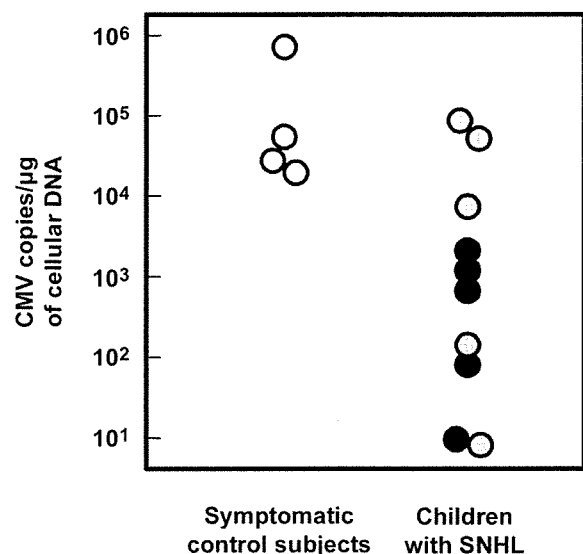


Figure 1. Comparison of cytomegalovirus (CMV) loads. White circles indicate the positive control children with symptomatic CMV infection at birth. Shaded and black circles indicate the CMV-positive children identified in the sensorineural hearing loss (SNHL) cohort with their estimated onset before and after the age of 6 months, respectively.

the development of rapid and convenient methods for the detection of CMV in urine specimens would be essential.

It is noteworthy that congenital CMV infection and *GJB2* mutations appear to be independently associated with SNHL. However, because CMV infection is known to increase the risk of chromosomal abnormality (reviewed in [30]), this does not exclude possible association between CMV infection and mutations in genes other than *GJB2*.

Like CMV, HHV-6 belongs to the betaherpesvirus subfamily, and the viruses have a similar genomic structure. A recent study demonstrated asymptomatic congenital infection with HHV-6 but not HHV-7 at a frequency of 1% [31]. In addition, it is well known that HHV-6 is neurotropic and that it causes neurological diseases [32]. Therefore, it would be interesting to determine whether HHV-6 causes SNHL, as CMV does. However, we found no evidence for congenital HHV-6 infection in any of the patients with SNHL. There are 2 possible explanations: congenital HHV-6 infection rarely causes SNHL and/or there is a lower frequency of congenital HHV-6 infection in our general population that hampered our attempts to identify HHV-6-associated SNHL in our sample size. Because HHV-6 DNA can be detected in maternal blood, our negative data on HHV-6 suggest the specificity of our assay using dried umbilical cords.

In conclusion, our retrospective analysis of the etiology of SNHL demonstrates directly that congenital CMV infection is responsible for a substantial proportion of early-childhood SNHL and that almost half of the infants at risk for the development of late-onset CMV- or *GJB2*-associated SNHL show no clinical and audiological indications at birth. Our results support the results of previous studies that advocated the need for neonatal screening programs for both CMV and the prevalent genetic causes of SNHL.

Acknowledgments

We thank all the children who participated in the study and their parents. We also thank Naoko Yamada, Kiwa Ohotomo, Yumiko Yamamoto, Yuhki Inami, and Hitomi Komura for technical assistance; Ichiro Kurane, Phil Pellett, and D. Scott Schmid for intellectual input; and Felicia R. Stamey for English editing.

References

1. Infants tested for hearing loss—United States, 1999–2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2003; 52:981–4.
2. Finitzo T, Albright K, O'Neal J. The newborn with hearing loss: detection in the nursery. *Pediatrics* 1998; 102:1452–60.
3. Iwasaki S, Hayashi Y, Seki A, et al. A model of two-stage newborn hearing screening with automated auditory brainstem response. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2003; 67:1099–104.
4. Mason JA, Herrmann KR. Universal infant hearing screening by automated auditory brainstem response measurement. *Pediatrics* 1998; 101:221–8.
5. Year 2000 position statement: principles and guidelines for early hearing detection and intervention programs. Joint Committee on Infant Hearing, American Academy of Audiology, American Academy of Pediatrics, American Speech-Language-Hearing Association, and Directors of Speech and Hearing Programs in State Health and Welfare Agencies. *Pediatrics* 2000; 106:798–817.
6. Morton CC, Nance WE. Newborn hearing screening—a silent revolution. *N Engl J Med* 2006; 354:2151–64.
7. Smith RJ, Bale JF Jr, White KR. Sensorineural hearing loss in children. *Lancet* 2005; 365:879–90.
8. Numazaki K, Fujikawa T. Prevalence of serum antibodies to cytomegalovirus in pregnant women in Sapporo, Japan. *Int J Infect Dis* 2002; 6: 147–8.
9. Boppana SB, Fowler KB, Vaid Y, et al. Neuroradiographic findings in the newborn period and long-term outcome in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1997; 99:409–14.
10. Fowler KB, Dahle AJ, Boppana SB, Pass RF. Newborn hearing screening: will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed? *J Pediatr* 1999; 135:60–4.
11. Fowler KB, McCollister FP, Dahle AJ, Boppana S, Britt WJ, Pass RF. Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *J Pediatr* 1997; 130:624–30.
12. Kumar ML, Nankervis GA, Jacobs IB, et al. Congenital and postnatally acquired cytomegalovirus infections: long-term follow-up. *J Pediatr* 1984; 104:674–9.
13. Yow MD, Williamson DW, Leeds LJ, et al. Epidemiologic characteristics of cytomegalovirus infection in mothers and their infants. *Am J Obstet Gynecol* 1988; 158:1189–95.
14. Barbi M, Binda S, Caroppo S, Ambrosetti U, Corbetta C, Sergi P. A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:39–42.
15. Therrell BL, Hannon WH, Pass KA, et al. Guidelines for the retention, storage, and use of residual dried blood spot samples after newborn screening analysis: statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services. *Biochem Mol Med* 1996; 57:116–24.
16. Therrell BL, Johnson A, Williams D. Status of newborn screening programs in the United States. *Pediatrics* 2006; 117:S212–52.
17. Koyano S, Araki A, Hirano Y, et al. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection using dried umbilical cords. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23:481–2.
18. Gault E, Michel Y, Dehee A, Belabani C, Nicolas JC, Garbarg-Chenon A. Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39:772–5.
19. Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, Causey DM, Leedom JM, Arnheim N. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1988; 158:1185–92.
20. Locatelli G, Santoro F, Veglia F, Gobbi A, Lusso P, Malnati MS. Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA. *J Clin Microbiol* 2000; 38:4042–8.
21. Lindquester GJ, Inoue N, Allen RD, et al. Restriction endonuclease mapping and molecular cloning of the human herpesvirus 6 variant B strain Z29 genome. *Arch Virol* 1996; 141:367–79.
22. Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, et al. *GJB2* deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003; 112:329–33.
23. Pass RF. Congenital cytomegalovirus infection and hearing loss. *Herpes* 2005; 12:50–5.
24. Williamson WD, Demmler GJ, Percy AK, Catlin FI. Progressive hearing loss in infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 1992; 90:862–6.
25. Williamson WD, Percy AK, Yow MD, et al. Asymptomatic congenital cytomegalovirus infection: audiological, neuroaudiologic, and neurodevelopmental abnormalities during the first year. *Am J Dis Child* 1990; 144:1365–8.
26. Dent KM, Kenneson A, Palumbos JC, et al. Methodology of a multistate

- study of congenital hearing loss: preliminary data from Utah newborn screening. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* **2004**;125:28–34.
27. Kimberlin DW, Lin CY, Sanchez PJ, et al. Effect of ganciclovir therapy on hearing in symptomatic congenital cytomegalovirus disease involving the central nervous system: a randomized, controlled trial. *J Pediatr* **2003**;143:16–25.
 28. Revello MG, Zavattoni M, Furione M, Baldanti F, Gerna G. Quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid of mothers of congenitally infected fetuses. *J Clin Microbiol* **1999**;37:3350–2.
 29. Halwachs-Baumann G, Genser B, Pailer S, et al. Human cytomegalovirus load in various body fluids of congenitally infected newborns. *J Clin Virol* **2002**;25(Suppl 3):S81–7.
 30. Fortunato EA, Spector DH. Viral induction of site-specific chromosome damage. *Rev Med Virol* **2003**;13:21–37.
 31. Hall CB, Caserta MT, Schnabel KC, et al. Congenital infections with human herpesvirus 6 (HHV6) and human herpesvirus 7 (HHV7). *J Pediatr* **2004**;145:472–7.
 32. Yamanishi K. Human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2001**:2785–801.

Human Herpesvirus 8 Genoprevalence in Populations at Disparate Risks of Kaposi's Sarcoma

Navdeep Kumar,^{1,5*} Ken McLean,² Naoki Inoue,³ David R. Moles,⁴ Crispian Scully,¹ Stephen R. Porter,¹ and Chong Gee Teo⁵

¹Oral Medicine and Special Needs, UCL Eastman Dental Institute, University College London, University of London, London, UK

²Genitourinary Medicine, Charing Cross Hospital, London, UK

³Herpesvirus Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, National Center for Infectious Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia

⁴Health Services Research, UCL Eastman Dental Institute, University College London, University of London, London, UK

⁵Virus Reference Department, Centre for Infections, Health Protection Agency, London, UK

The prevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in populations at different risks of developing Kaposi's sarcoma (KS) was assessed using a protocol involving immunomagnetic fractionation of CD45+ blood cells prior to detection of the HHV-8 genome by nested PCR. Preliminary studies using blood of eight gay men infected by human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) revealed that, for the detection of HHV-8 DNA derived from open reading frame (ORF) 26 of the HHV-8 genome, this protocol provided substantially higher rates (100%) compared to one involving red blood cell (RBC) lysis (0%) and to another requiring double density gradient centrifugation (DDGC) of leukocytes (13%). When the CD45+ fractionation protocol was applied to samples from 103 other HIV-1-infected patients (the vast majority of whom were gay men) and 100 blood donors, the ORF 26 DNA detection rates obtained were 37% and 8%, respectively. When DNA from the variable region 1 of ORF K1 was additionally amplified from samples of the blood donors, a detection rate of 9% was achieved. This rate was highly concordant with the ORF 26 DNA detection rate. Furthermore, the ORF K1 sequences were predominantly unique, assignable to genotypes A1, A4, and C3. When assays for anti-HHV-8 and anti-herpes simplex viruses (HSV) 1 and 2 were applied, significant concordances between HHV-8 DNA detection rates and those relating to anti-HHV-8 and to anti-HSV 1 and 2 were more frequently observed for HIV-1-infected patients than for blood donors. The higher-than-expected HHV-8 genoprevalence rate in blood donors requires further confirmation in view of its implications for post-transfusion HHV-8 transmission. **J. Med. Virol.** 79:52–59, 2007. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

KEY WORDS: human herpesvirus 8; blood transfusion; human immunodeficiency virus; Kaposi's sarcoma; AIDS

INTRODUCTION

The epidemiology of human herpesvirus 8 (HHV-8) has been much clarified by the availability and wide application of serological tests for estimating the prevalence of infection [Chatlynne and Ablashi, 1999; Martin, 2003]. More accurate estimations of HHV-8 prevalences may be made when seroprevalence data are complemented by data generated from the detection of the HHV-8 genome. When the HHV-8 genome is examined, an improvement in specificity would be expected, since by identifying the genome rather than the antibody a more direct marker of HHV-8 infection is sought. Better sensitivity may also be achieved, as infection can be identified in the early stages before the host mounts a detectable humoral response [Cook et al., 2002].

In peripheral blood, β - and γ -herpesviruses can be present in quantities below the threshold of detection, reflecting viral persistence in the latent state. Innovative approaches have been devised to identify and characterize the viremic state of infected hosts. Thus, for human cytomegalovirus (HCMV), peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of blood donors were

*Correspondence to: Navdeep Kumar, Oral Medicine and Special Needs, UCL Eastman Dental Institute, 256 Gray's Inn Road, London WC1X 8LD, UK.

E-mail: n.kumar@eastman.ucl.ac.uk

Accepted 4 September 2006

DOI 10.1002/jmv.20728

Published online in Wiley InterScience
(www.interscience.wiley.com)