

れば臨床的には両者を区別する必要性は少ないといえる。

本邦報告例で聴力改善手術について触れたものは少ない。草野らは1997年の報告にて、それまでの中耳所見報告例12例14耳と自験例3耳について、術後聴力成績が明記された13耳について聴力レベルでまとめているが、20dB以上の改善は4耳に過ぎず、6耳で10dB未満の改善にとどまっている。15dB以上の聴力レベル改善を成功とするなら成功率は31～54%の間ということになる。本報告では成功は9耳中3耳、33%と過去の報告と同様といえる。ただし、文献では術後聴力評価の時期が不明のものや術後2ヶ月での判定としているものなどが混在しており、単純な比較は出来ない。

いずれにせよ従来の伝音再建術による聴力成績は芳しくない点では共通であり、本疾患に対する外科的介入の問題点である。要因としては内耳奇形も含めた多様な聴器奇形のパターンがあげられる。中耳においては、ツチ骨骨性癒着、ツチキヌタ骨癒合、キヌタ骨長脚形成不全、アブミ骨固着、欠損、正円窓欠損など、内耳においては蝸牛低形成、半規管低形成などが報告されている。一般に耳小骨奇形に対する伝音再建手術は成績良好であり、とくに固着を伴わない連鎖離断型のほうが固着型より成績がよい。本例では離断は1耳のみで9耳はすべて固着病変であった。これは奇形のパターンに一定の傾向はないとする過去の報告と若干異なっている。内耳奇形では蝸牛低形成を10耳中6耳と高率に合併していた。こ

れには高分解能CTによる画像診断精度向上の寄与するところが大きい。内耳奇形の有無は、同じく高率に合併するアブミ骨固着に対するアブミ骨手術の適否について重要な情報となる。すなわち stapes gusher のリスクについて考慮しなければならず、手術適応の判断には慎重にならざるを得ない。同じアブミ骨固着病変であっても、耳硬化症の成績は90%以上であるのに対し、先天性アブミ骨固着症例の成績は劣る。

しかしながら、本症例では成功3耳のうち2耳がアブミ骨手術であった。アブミ骨手術施行4耳の50%が成功であり、いずれも蝸牛低形成を伴っていたこと、stapes gusher 症例は無かったことを考慮すると、必ずしも避ける必要はないのではないかと思われる。

従来の伝音再建術に加え聴力改善の strategy は増えており、人工中耳、BAHAなどが候補に挙がる。今回の検討例では一側性は10耳中3耳のみであったが、外耳奇形を伴う例、伝音再建術の非成功例などでこれら新しい device の適応が広がる可能性があると思われる。

E. 結論

B0あるいはB0R症候群に対する伝音再建術の聴力成績は30%程度の成功率であった。中耳における固着病変と内耳奇形の合併が不良の要因と思われた。ただしアブミ骨手術については必ずしも忌避すべき術式ではないと考えられる。今後の治療成績向上のため、BAHAや人工中耳など新しい治療手段

の手術適応についての検討、さらに症例の蓄積と術後長期成績の検討が必要と思われる。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

当科における優性遺伝形式をとる遺伝性難聴症例の検討

分担研究者 内藤 泰 (神戸市立医療センター中央市民病院)

共同研究者 山崎 博司 (神戸市立医療センター中央市民病院)

研究要旨

当科を受診した優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の患者、7家系8名を対象として検討を行った。オーディオグラムは高音漸傾型が1家系2名、高音急墜型3家系3名、皿型が1家系1名、低音障害型が2家系2名で、平均聴力レベルは正常範囲が1名、軽度難聴が1名、中等度難聴が5名、高度難聴が1名であった。軽度のめまいの自覚は2家系2名(いずれも高音急墜型)であったが、それ以外では明らかなめまいの自覚は認めなかった。側頭骨CT、頭部MRIは6家系6名で施行されており、いずれも明らかな異常を認めなかった。患者の年齢層は20代が3名、30代が3名、60代が1名と、20~30代が中心であり、糖尿病などの症候性難聴を疑わせる所見は認めなかった。現時点で5家系6名に対し遺伝子検査を行い、現在解析中である。7家系の中で、血縁関係がある難聴者のオーディオグラムを実際に検査し得たのは1家系のみであり、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴をより正確に評価するためには、家族に聴力検査に協力していただくことが不可欠と考えられた。

A. 研究目的

非症候性難聴の約10%が優性遺伝形式をとる遺伝性難聴とされるが(Kimberling, 1999)、難聴の程度や難聴の型、発症時期や随伴症状は家系によって様々である。しかし、現在、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴に関して不明な点は多く、原因遺伝子もごく一部しか同定されていない。

本研究の目的は、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴者の臨床像を詳細に検討すると同時に遺伝子検査で原因遺伝子を同定し、原因遺伝子ごとに予後や随伴症状を予測可能にすることである。また、本研究で優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の発症メカニズムが明らかになれば、治療法の開発につなが

ると期待される。

B. 研究方法

平成22年4月から平成23年1月に当科を受診した7家系8名の優性遺伝形式をとる遺伝性難聴患者を対象に、聴力像(純音聴力検査)、めまいの有無、他の随伴疾患の有無を検討した。さらに、CT、MRIを用いた画像検査で内耳・内耳道奇形の有無を検討した。また、遺伝子カウンセリングを行い、同意を得られた患者に対して遺伝子検査を行った。

C. 研究結果

1) 患者の年齢層と性別

20代が3名、30代が3名、60代が1名

と、20~30代が中心であり、男性2名、女性6名であった。父、母が難聴である患者はそれぞれ5名、3名で、2代以上母系遺伝形式をとる患者は1名（Pt3）であった。

2) 難聴と聴力像

オージオグラムのパターンは、高音急墜型が3家系3名（Pt1、2、3）、高音漸傾型が1家系2名（Pt4、5）、皿型が1家系1名（Pt6）、低音障害型が2家系2名（Pt7、8）であった。また、純音聴力検査における平均聴力レベル（3分法）は正常範囲が1名、軽度難聴が1名、中等度難聴が5名、高度難聴が1名であった（表1）。また、いずれの症例も難聴の自覚は10歳代以降であった。

8名中10年以上聴力をフォローし得たのは3家系4名で、いずれも平均的な加齢性変化に比べて急速に難聴が進行した（表2）。

3) めまいと前庭機能

2家系2名（Pt1、Pt3：いずれも高音急墜型）でめまいの自覚を認めたが、いずれも頭位変換時に数秒の発作が時々起る程度であり、明らかな前庭機能障害を疑わせるものではなかった。それ以外の患者では明らかなめまいの自覚は認めなかった。

4) 画像検査

側頭骨CT、頭部MRIは6家系6名で施行されており、いずれも内耳・内耳道に奇形を認めなかった（表1）。

5) 随伴疾患

8名全員で糖尿病などの症候性難聴を疑わせる所見は認めなかった。

表 1

	年齢	性別	難聴の家族歴	聴力型	右聴力 (dB)	左聴力 (dB)	CT	MRI
Pt1	36	女	父	高音急墜型	95.7	87.5	異常なし	異常なし
Pt2	33	男	母	高音急墜型	63.8	67.5	異常なし	未施行
Pt3	31	女	母、祖母	高音急墜型	21.3	20	未施行	異常なし
Pt4	64	男	娘、姉、母	高音漸減型	76.3	81.3	未施行	未施行
Pt5	29	女	父、祖母、叔母	高音漸減型	51.3	50.0	異常なし	未施行
Pt6	21	女	父、祖母	皿型	61.3	67.5	異常なし	異常なし
Pt7	22	女	父、母	低音障害型	31.3	28.8	未施行	異常なし
Pt8	34	女	父	低音障害型	112.5	97.5	異常なし	異常なし

*Pt4 と Pt5 は親子

表 2

	年齢	性別	観察年数	右聴力 (dB)	左聴力 (dB)
Pt1	36	女	25 年	36.3→95.7	38.8→87.5
Pt4	64	男	20 年	40.0→76.3	42.5→81.3
Pt5	29	女	10 年	28.8→51.3	27.5→50.0
Pt8	34	女	10 年	68.8→112.5	61.3→97.5

D. 考察

今回の検討では、純音聴力検査は行ったが、語音聴力検査、DPOAE 等は未施行であった。また、問診上、前庭機能障害は否定的であったが、カロリックテストや眼振検査等の平衡機能検査は行っておらず、内耳機能をより詳細に検討するためにはこれらの検査を追加することが必要と考えられた。

今回検討した 8 症例はいずれも 10 代以降に難聴が出現し、さらに 10 年以上聴力をフォローし得た 4 名では、いずれも平均的な加齢性変化に比べて急速に難聴が進行した。これらの特徴的な聴力悪化パターンが、ある特定の遺伝子変異のタイプで引き起こされている可能性があり、今後の遺伝子解析の結果が待たれる。

7 家系の中で、血縁関係がある難聴者のオージオグラムを実際に検査し得たのは 1 家系のみであった。それ以外の患者では、両親のいずれかに同じ型の難聴を認めることを確認できておらず、優性遺伝形式の難聴かを判断するにはデータが不十分である。優性遺伝形式をとる遺伝性難聴をより正確に評価するためには、家族に聴力検査や平衡機能検査、遺伝子検査に協力していただ

くことが不可欠である。

E. 結論

優性遺伝形式をとる難聴の内耳障害を正確に把握するには、より詳細な聴力検査や平衡機能検査を行う必要がある。また、優性遺伝形式をとる難聴であることを確認したり、新たに同定された遺伝子変異が無症候性の多型ではなく難聴の原因遺伝子であることを証明するためには、血縁関係がある難聴者のみならず健聴者にも聴力検査と遺伝子検査に協力していただくことが不可欠である。

今回検討した症例の様に、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴の中には成人後に比較的短期間で急速に難聴が進行するものがあり、遺伝子検査を行うことで難聴が進行する前から予後を予測できる可能性がある。

【参考文献】

1. Kimberling WJ. Am J Med Genet, 89: 121-2, 1999.

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

当院における優性遺伝性難聴の診断・カウンセリング

分担研究者 武市紀人（北海道大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科分野）

研究要旨

平成 22 年に「先天性難聴の遺伝子診断」が厚労省の先進医療に認可を受けたことをきっかけに今後、難聴に関する相談、診察の需要が増加するものと予想される。難聴遺伝子における診療は通常の臨床診療と異なり倫理的な配慮が必要なばかりでなく、臨床遺伝専門医等の専門知識を持つ医師や耳鼻科以外を専門とする複数の医師の協力により成り立ち、遺伝カウンセリングと呼ばれる専門的な診療を要する。当院における難聴遺伝診療の現況を報告し、今後の展望について考察した。

A. 研究目的

先天性難聴の発生は出生約 1000 人に一人の頻度と言われている。かつては先天性難聴に対して有効な治療手段は無かったが、現在では補聴器、人工内耳の発達および言語訓練指導など乳幼児期の早期からの取り組みによりコミュニケーション手段の獲得が可能となる場合も増えた。早期に難聴の診断を行うことは意義の高いこととなり、遺伝性難聴の診断もその手段の一つとなった。その一方、遺伝に関する情報は本人のみならず家族や子孫にも影響があり、倫理的にも十分な注意が払われる必要がある。また、検査前はもちろんのこと検査後も専門的な遺伝カウンセリングが必要となる場合があり、病院として充実したシステムの構築が不可欠である。今回当院におけるシステムについて検討した。

B. 研究方法

北海道大学病院では 2004 年に臨床遺伝子診療部が発足して以来、遺伝子に関わる診療は臨床遺伝子診療部が窓口となり診療に当たっている。そこで、優性遺伝性難聴が疑われる過去の症例・家系について受診の経緯およびその後の状況について臨床遺伝子診療部のカルテを元に後方視的な検討をした。

（倫理面への配慮）

症例について性別、年齢、検査・治療経過のみを用い、個人が特定される情報は用いられていない。また、遺伝子診断に関するカルテは独立した部署である遺伝子診療部に属しており、遺伝子診療部に所属しない医師はアクセスできないため匿名性が保たれているものとする。

C. 研究結果

北海道大学病院臨床遺伝子診療部には医師 12 名（内、認定指導医 3 名、臨床遺伝専門医 8 名）、助産師 1 名、臨床心理士 3 名が所属している。活動内容としては月 1 回の定例会議・症例カンファレンス、ほぼ毎週行われている遺伝カウンセリングを主に行っている。

当院における難聴遺伝子診断の流れを図 1 に示す。難聴遺伝子に関する相談は遺伝子診療部の定例カンファレンスにて討議され、検査を含めた方針を決定する。検査の適応有りと判定された場合は臨床遺伝専門医の資格のある耳鼻科医を含む医師 2 名以上の臨床遺伝診療部スタッフで検査前カウンセリングを行い、承諾が得られた場合は検査を行う。遺伝カウンセリングは自由診療であり、当院では費用は初回時は 5,250 円/時、二回目以降は 2,350 円/30 分となっている。検査の結果は遺伝子診療部で受け、カンファレンスにて内容・検査後の方針を討議し、あらためて検査後のカウンセリングを行っている。通常の耳科学的検査は遺伝学的検査、診療とは別個に耳鼻咽喉科にて行われている。

これまで、優性遺伝性難聴の疑いで遺伝子診療部に相談があった事例は 5 件であった。2 件は当院新生児グループ、2 件は当院耳鼻咽喉科、1 件は他院耳鼻咽喉科より紹介された。新生児グループの 2 件はいずれも母親と兄弟が同様の表現型を示しており、出生した次子の聴力予後に関する相談であった。それぞれ、最終診断は前庭水管拡張症（Pendred 症候群疑い）、Waardenburg 症候群であった。他の 3 件については遺伝子検査で明らかな難聴の原因

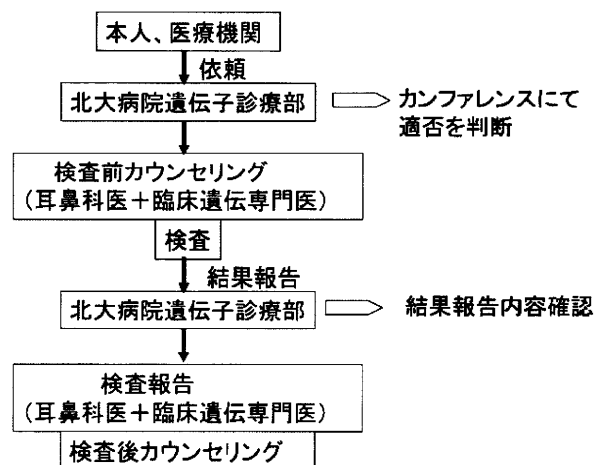


図 1 当院における難聴遺伝子診断の流れ

となる遺伝子変異は認めなかった。

最終的に確定診断に至らなかった例も含めて全例においてクライアントは遺伝カウンセリングの内容に満足していた。

D. 考察

難聴は耳鼻咽喉科に特化した疾患であり、診断・治療を含む全ての領域に耳鼻科医が中心となって関わる。しかしながら、遺伝子診療に関する場合は遺伝子診療に習熟した専門知識を有する医療従事者の協力が不可欠である。当院では 1995 年に国内初の遺伝子治療を実施した経緯より厚労省より遺伝子診療に関するガイドラインが発表されると同時に臨床遺伝子診療部が発足した。遺伝子診療に専門知識を有する医師の参加により高度な判断や匿名性を守った診療の実現が可能となっている。その一方、耳鼻咽喉科が主体とはならないために本来の診療科である耳鼻咽喉科の関与が少なくなり、臨床症状に即した迅速な対応が困難になることもある。今後、遺伝子診療の需要が増加すると予想されるためその対処法については検討していく問題と考える。

E. 結論

今後、増加が予想される遺伝の問題について、通常の臨床とは異なる対応が必要となるため、システムの確立に向けた検討が必要と考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 武市紀人、小原修幸、藤原圭志、赤澤茂、福田諭:「人工内耳が有用であったミトコンドリア625G>A変異の1症例」急性高度難聴に関する調査研究 平成21年度総括・分担研究報告書; p81-84, 2010

2. 学会発表

1) 「人工内耳が有効であったミトコンドリア

625G>A変異の1症例」

武市紀人、小原修幸、藤原圭志、赤澤茂、福田諭

平成21年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、急性高度難聴に関する研究調査班研究報告会、2010.2.13、東京

2) 「Waardenburg 症候群の一家系」

武市紀人、福田諭

平成21年度厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業、優性遺伝形式をとる遺伝性難聴に関する調査研究班研究報告会、2010.2.28、東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

片側性難聴で発見された Waardenburg syndrome の一例

分担研究者：福島邦博（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科）

研究要旨

Waardenburg 症候群 (WS) は、およそ42000人に一人で発生すると言われ、比較的頻度の高い遺伝性難聴の原因であると考えられている。この症候群では、多くは両側性の高度難聴を呈するが、全身症状はしばしば左右非対称であることが多く、聴力も左右非対称であることも少なくない。今回片側性の難聴で発見されたWSの一例を経験したので報告する。

A. 研究目的

Waardenburg 症候群 (WS) は、およそ42000人に一人で発生すると言われ、比較的頻度の高い遺伝性難聴の原因であると考えられている。特に、常染色体優性遺伝性難聴の中では、比較的頻度の高い症候群性難聴の原因であり、先天性難聴者の2-3%をしめると考えられている。

この症候群では、多くは両側性の高度難聴を呈するが、全身症状はしばしば左右非対称であることが多く、聴力もまた、左右非対称であることも少なくない。今回片側性の難聴で発見されたWSの一例を経験したので報告する。

B. 研究方法

1) 症例

29歳 男性

- ・小児期より右難聴あり、中学まで精査加療するも改善無く原因不明のまま経過

観察となる。平成21年11月頃より左聴力低下を自覚して受診となる。初診時に左低音部に40 dB程度の難聴を認め、右耳は聾であった。

- ・平成21年12月他院入院の上、プレドニンとグリセオールの投与を行うが聴力は不変であったため、当院紹介となる。
- ・CT MRIでは異常を認めない。
- ・父方のいところに片耳の難聴の人がいる
- ・初診時から、典型的な内眼角解離を認める。前額部の部分的な白髪は無いが、年齢の割には白髪が多い。

2) 検査所見

純音聴力検査では、右耳の高度難聴と、左耳の低音域に局限した難聴を認めた(図1)。

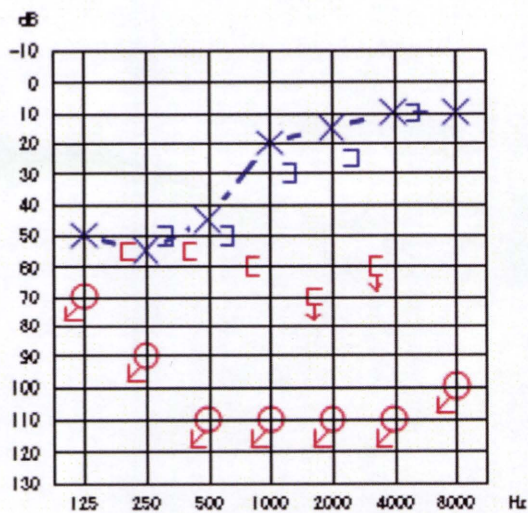


図1 片側WS患者の聴力

SISI検査は右耳は施行不能であり、左耳は、低音域に強いリクルートメント現象を認めた。

	右	左
500 Hz	— %	100 %
1000	—	15
2000	—	0
4000	—	5

図2 SIS検査の結果

OAEでは、左耳の高音域には良好な反応を認めた。少なくとも今回の検討では、右耳の低音域には、DPOAEでの反応が認められ、他の検査で確認できる高度難聴との間で解離が認められた。

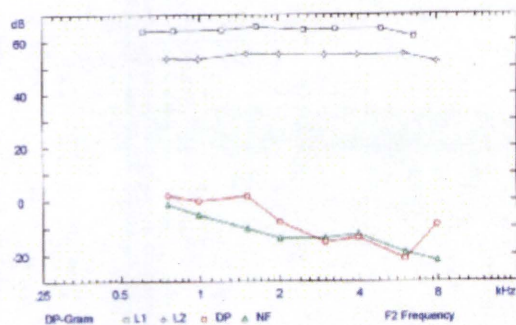


図3 OAEの結果

C. 研究結果

WSでは、メラニン細胞の遊走異常が生じる為に全身の不均等な（しばしば左右非対称な）色素異常が生じ、また感音難聴が生じる。このため、感音難聴そのものも左右不均等に生じることが考えられる。

モデル動物であるws/ws変異ラットの場合、蝸牛血管条が一度形成された後に生後8週までに変性が進むことが報告されており、蝸牛におけるメラニン細胞である中間細胞の存在が、血管条とそこに存在する血管網の成熟と維持に欠かせないことが報告されている。こうした経過からは、内耳血管条の変性がWSの難聴病態の中心的な働きであることが想定できる。Oysuらは、検討した80%以上の症例で、高度な難聴があったものの、その半数近い症例で低音域にはDPOAEで反応が確認できたことを報告している。今回の我々の検討でも同様のDPOAEの反応が確認できたが、これはWSの難聴が基本的には血管条の機能低下に起因すると考えられることと関係があるのかもしれない。こうした知見は、WSの難聴の発症機序を知るだけでなく、現在もまだ不明な点の多い、Auditory neuropathy spectrum disease (ANS)の病態を解明することに役立つ可能性がある。

D. 結論

WSを初めとして特徴的なStigmataを有する常染色体優性遺伝性難聴症候群は様々な存在する。こうした疾患の病態を精査し、またその原因遺伝子について検討することは、こうした難聴の病態を理解するだけで

WSの臨床分類

WS1	Dystopia Canthorum	Autosomal Dominant de Novo		PAX3 (encoding the paired box 3 transcription factor)
WS2	DCが見られない	Autosomal Dominant		MITF Unknown (1q)
WS3	拘縮		Klein-Waardenburg syndrome	PAX3
WS4	Hirschsprung disease	Heterogeneous	Waardenburg-Shah syndrome	endothelin-3 (EDN3) or the endothelin-B receptor (EDNRB) SOX10

なく、非症候性の難聴の原因についての insightを与えるため、極めて重要である。

2. 学会発表
なし

E. 研究発表

1. 論文発表
なし

F. 知的財産権の出願・登録状況
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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

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
Tsukada K, Nishio S, Usami S.	A large cohort study of GJB2 mutations in Japanese hearing loss patients.	Clin Gent	78	464-470	2010
Usami S, Miyagawa M, Suzuki N, Moteki H, Nishio S, Takumi Y, Inwasaki S	Genetic backbrond of candidates for EAS (Electric-Acoustic Stimulation)	Audiological Medicine.	8	28-32	2010
宇佐美真一	先天性難聴の遺伝子診断—専門医に必要な難聴遺伝子に関する知識—	日本耳鼻咽喉科学会会報	113	34-37	2010
小林有美子、佐藤宏昭、岩井詔子、村井盛子、宇佐美真一	当科小児難聴外来の過去10年間における難聴の遺伝学的検討	Audiology Japan	53	192-198	2010
宇佐美真一	疾患群の遺伝学的検査 (Genetic Testing) と遺伝子検査 (Gene-Based Testing)	日本臨床	68	417-422	2010

V. 研究成果の刊行物・別刷

Short Report

A large cohort study of *GJB2* mutations in Japanese hearing loss patients

Tsukada K, Nishio S, Usami S, and the Deafness Gene Study Consortium. A large cohort study of *GJB2* mutations in Japanese hearing loss patients. Clin Genet 2010; 78: 464–470. © John Wiley & Sons A/S, 2010

GJB2 is the gene most frequently associated with hereditary hearing loss, and the *GJB2* mutation spectrums vary among different ethnic groups. In this study, the mutation spectrum as well as clinical features of patients with *GJB2* mutations as found in more than 1000 Japanese hearing loss families are summarized. The present results show that the frequency of *GJB2* mutations in the Japanese population with hearing loss is 14.2% overall and 25.2% in patients with congenital hearing loss. *c.235delC* was the most frequent allele (49.8%), was associated with a more severe phenotype, and was mainly found in patients who were diagnosed by the age of 3. In contrast, the second most frequent was *p.V37I* (16.5%), which has a milder phenotype and was mainly found in patients diagnosed at a higher age. Additional clinical features in hearing loss patients with *GJB2* mutations in this study were the near absence of tinnitus, vestibular dysfunction and inner ear malformations.

**K Tsukada, S Nishio,
S Usami and the Deafness
Gene Study Consortium**

Department of Otorhinolaryngology,
Shinshu University School of Medicine,
3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621,
Japan

Key words: clinical features – genotype
– phenotype correlations – *GJB2* –
hearing loss – mutation

Corresponding author: Shin-ichi Usami,
MD, PhD, Department of
Otorhinolaryngology, Shinshu University
School of Medicine, 3-1-1 Asahi,
Matsumoto 390-8621, Japan.
Tel.: +81 263 37 2666;
fax: +81 263 36 9164;
e-mail: usami@shinshu-u.ac.jp

Received 27 November 2009, revised
and accepted for publication 15
February 2010

Mutations in the *GJB2* gene have recently been of particular interest because *GJB2* is the commonest causative gene for hereditary hearing loss in all populations. To date, more than 100 variations have been reported worldwide (see the Connexin-deafness homepage: <http://www.davinc.crg.es/deafness>) and the mutation spectrums vary among different ethnic groups. There have been many papers describing the frequency of *GJB2* mutations among hearing loss populations, but most studies have been based on small numbers of patients from a single center. A large cohort study may prevent bias and provide a more precise estimate of mutation frequencies. Therefore, with the goal of establishing a database of the mutations found in the East Asian populations, we estimated the *GJB2* mutation frequency and spectrum as well as associated clinical features using more than 1500 Japanese hearing loss families collected from multiple centers.

Subjects and methods

Subjects

Data on 3056 Japanese subjects of 1511 independent families were collected from 33 ENT departments nationwide in Japan. All subjects gave prior informed consent for participation in the project, which was approved by the ethical committee of each hospital. Of the 1511 probands, 1343 had bilateral sensorineural hearing loss and 168 had unilateral sensorineural hearing loss. The control group consisted of 252 unrelated Japanese individuals without any noticeable hearing loss evaluated by auditory testing.

Mutation analysis

To identify *GJB2* mutations, a DNA fragment containing the entire coding region was sequenced as described elsewhere (1). Screening for the known

large DFNB1 deletions was performed in the patients with a single heterozygous allele without the presence of a second pathogenic mutant allele, but none were detected (data not shown).

Computational analysis

To evaluate the importance of each amino acid affected by novel missense mutations found in this study, we used a computational analysis program for identification of functionally and structurally important residues in protein sequences: CONSEQ (<http://conseq.tau.ac.il/index.html>).

Clinical evaluations

Hearing levels were determined by pure-tone audiometry. For the young patients, conditioned orientation response audiometry (COR) or auditory steady-state response (ASSR) were used. Clinical data, including hearing loss progression, episodes of tinnitus and vestibular dysfunction (vertigo, dizziness, faintness), were collected by anamnestic evaluation. Thin section temporal bone computed tomography (CT) was used to investigate inner ear malformations.

Results

GJB2 mutation spectrum in hearing loss probands

There were a total of 26 *GJB2* variants observed in the ascertained probands with bilateral hearing loss (Table 1). Fourteen of those were missense mutations. To evaluate the evolutionary conservation of the amino acids affected by these missense mutations, we used a computational alignment program CONSEQ (not shown). On the basis of this alignment program, all missense mutations had changed evolutionary conserved amino acids, except for p.T123N and p.Y68C. Because p.N54S and p.M195V were found in the compound heterozygous state, they are likely to be pathogenic. Eight of the mutations were found in the control group (Table 1). p.V27I, p.E114G, p.I203T (1, 2), and p.T123N (3), frequently found in both probands and controls, were thought to be non-pathological polymorphisms. The c.235delC and p.V37I mutations found in the control group most likely represent the detection of carriers.

Frequency of *GJB2* mutations in hearing loss probands

With regard to the frequency of *GJB2* mutations in the 1343 independently ascertained probands with bilateral hearing loss, 191 (14.2%) had at least

Large cohort study of Japanese *GJB2* mutations

one pathogenic *GJB2* mutant allele (Table 2). The most prevalent mutation was c.235delC (49.8% of all pathogenic mutant alleles) and the second most frequent was p.V37I (16.5%) (Fig. 1).

The frequency of *GJB2* mutations was significantly higher in probands who were diagnosed at an earlier age: 25.7% (108/420) in those diagnosed at age 0–3, 14.9% (15/101) in those diagnosed at age 4–5, and 7.8% (49/627) in age 6 or over (Table 2). c.235delC was also significantly higher in probands diagnosed at an earlier age (58.5%) compared to those who were diagnosed at the age of 6 and over (19.6%) ($p < 0.001$; χ^2 test). In contrast, p.V37I was significantly more frequent in probands who were diagnosed at the ages of 4–5 (36.4%) or 6 and over (41.1%) than in prelingual hearing loss probands (6.9%) ($p < 0.001$; χ^2 test) (Fig. 1).

Audiologic studies

Of the total 3056 subjects, 134 with bilateral hearing loss and biallelic *GJB2* mutations were selected for audiologic studies. We excluded 22 subjects who were from a family with another subject who had the same mutation. In the remaining 112 subjects, audiometric results were available for 105 probands, of 23 different genotypes. Figure 2 shows a collection of overlapping audiograms from those 105 subjects. We compared the hearing levels in the six genotypes that were shared by five or more subjects. The subjects with the p.V37I allele had significantly milder hearing loss ($p < 0.027$; Mann–Whitney *U* test).

p.V37I/p.R143W showed a significantly worse hearing level than p.V37I/p.V37I ($p = 0.025$; Mann–Whitney *U* test) and also tended to be worse than p.V37I/c.235delC ($p = 0.076$; Mann–Whitney *U* test). Moreover, comparison of c.235delC/c.235delC ($n = 35$) and c.235delC/p.R143W ($n = 13$) revealed that subjects with the p.R143W allele had a significantly worse hearing level than homozygotes ($p = 0.025$; Mann–Whitney *U* test).

Twenty-six subjects with biallelic *GJB2* mutations were followed at least two years by audiometric testing with progression of hearing loss seen in four subjects (15%), two (7%) of those being unilateral progression and two (7%) being bilateral progression.

Clinical findings

Based on the data availability, clinical findings were statistically evaluated. Episodes of tinnitus in patients with *GJB2* mutations were at a

Table 1. GJB2 variants in deafness patients and controls

Amino acid change	Nucleotide change	Patients				Controls				Reference	
		Allele frequency (%) (n = 2686)	Allele frequency (%) (n)	Compound heterozygous (n)	Homozygous (n)	Allele frequency (%) (n = 504)	Alleles (n = 252)	Carrier rate (%)	Evolutionary conservation		
—	c.235 delC	142	5.29	45	34	28	2	0.40	2	NA	Fuse et al. (19)
p.V37I	c.109G>A	47	1.75	11	3	30	3	0.60	3	Yes	Abe et al. (1)
p.G45E ^c	c.134G>A										
p.Y136X ^c	c.408C>A	34	1.27	22	1	10				Yes	Fuse et al. (19)
p.R143W	c.427C>T	18	0.67	16	0	2				Yes	Brobbly et al. (20)
—	c.176_191 del16bp	15	0.56	10	0	5				NA	Abe et al. (1)
—	c.299-300 delAT	11	0.41	8	0	3				NA	Abe et al. (1)
p.T86R	c.257C>A	8	0.30	5	0	3				Yes	Ohtsuka et al. (2)
—	c.512insAACG	3	0.11	3	0	0				NA	Hismi et al. (21)
—	c.359insG	2	0.07	2	0	0				NA	Estivill et al. (22)
p.I71T ^b	c.212T>C	2	0.07	0	0	2				Yes	Ohtsuka et al. (2)
p.T8M	c.23C>T	1	0.04	0	0	1				Yes	Kenna et al. (23)
p.I33N ^b	c.98T>A	1	0.04	0	0	1				Yes	This study
p.A49V ^b	c.146C>T	1	0.04	0	0	1				Yes	Ohtsuka et al. (2)
p.N54S	c.161A>G	1	0.04	1	0	0				No	This study
p.Y68C ^a	c.203A>G	1	0.04	0	0	1				Yes	Wu et al. (24)
p.M93I	c.276G>A	1	0.04	1	0	0				Yes	This study
p.K112M ^b	c.335A>T	1	0.04	0	0	1				Yes	This study
—	c.376-377 delAA ^a	1	0.04	0	0	1				NA	This study
p.W133X	c.398G>A	1	0.04	1	0	0				NA	Primignani et al. ⁱ
p.K168R ^b	c.503A>G	1	0.04	0	0	1				Yes	This study
p.M195V	c.583A>G	1	0.04	1	0	0				Yes	This study
—	c.605ins46bp	1	0.04	0	0	1				NA	Yuge et al. (25)
p.F191L	c.571T>C	0	0	0	0	0	1	0.20	1	yes	Feng et al. (26)
p.R127H	c.380G>A	0	0	0	0	0	1	0.20	1	yes	Seeman et al. ^f
Polymorphism											
p.V27I	c.79G>A	865	32.20	—	—	—	196	38.90	158	Yes	Kelley et al. (8)
p.E114G	c.341A>G	259	9.64	—	—	—	64	12.70	62	No	Fuse et al. (19)
p.T123N ^d	c.368C>A	18	0.67	3	0	15	2	0.40	2	No	Park et al. (3)
p.I203T	c.608T>C	112	4	—	—	—	21	4.10	21	No	Abe et al. (1)

^aVariant probably representing polymorphism because no evolutionary conservation was observed.

^bVariants with unproven pathogenic nature.

^cp.G45E and p.Y136X(c.134G>E) mutations are on the same parental allele.

^dp.T123N was found with equal frequency in the probands and controls, and three out of eight subjects with compound heterozygous state did not have any hearing loss, suggesting the polymorphic nature of p.T123N.

^ec.376-377 delAA is thought to be a pathogenic mutation, but it was present as a single heterozygous allele without the presence of a second pathogenic mutant allele, therefore it could not clearly be classified as pathogenic in this study.

^fBallana E, Ventayol M, Rabionet R et al. Connexins and deafness Homepage. World wide web URL: <http://www.org.es/deafness>.

Large cohort study of Japanese *GJB2* mutations

Table 2. The frequency of *GJB2* mutations and diagnostic age

	<i>GJB2</i> mutations	Homozygote	Compound heterozygote	Heterozygote
Total (<i>n</i> = 1343)	191 (14.2%)	38 (2.8%)	63 (4.7%)	90 (6.7%)
0–3 y.o. (<i>n</i> = 420)	108 (25.7%)	32 (7.6%)	47 (11.2%)	29 (6.9%)
4–5 y.o. (<i>n</i> = 101)	15 (14.9%)	1 (0.99%)	6 (5.9%)	8 (7.9%)
≥6 y.o. (<i>n</i> = 627)	49 (7.8%)	3 (0.48%)	4 (0.64%)	42 (6.7%)
Unknown (<i>n</i> = 195)	19	2	6	11

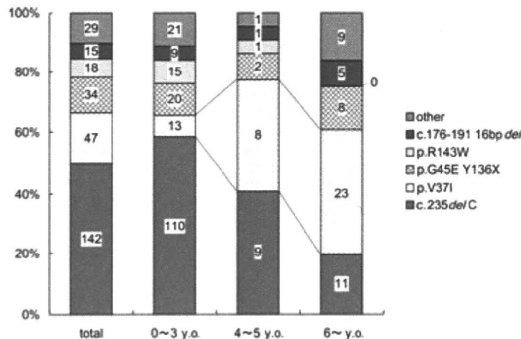


Fig. 1. Frequency of mutant *GJB2* alleles in different diagnostic age groups. *c.235delC* was mainly found in the group diagnosed at up to 3 years, where it was significantly higher than in age 6 and over ($p < 0.01$; χ^2 test). On the contrary, *p.V37I* was mainly found in the diagnostic age groups of 4–5, and 6 and over, at a rate significantly higher than in up to age 3 ($p < 0.01$).

significantly lower rate (7/75: 9.3%) than in all bilateral hearing loss probands (520/1022: 50.9%) ($p < 0.001$; χ^2 test). Concerning episodes of vestibular dysfunction, only 4% (3/75) of those with biallelic *GJB2* mutations had vertigo, dizziness, or faintness, while 25.1% of all hearing loss probands (258/1029) had vertigo ($p < 0.001$; χ^2 test). Inner ear abnormalities were significantly lower in patients with biallelic *GJB2* mutations (5/62: 8.1%) than in all bilateral hearing loss probands (126/599: 21%) ($p = 0.014$; χ^2 test). In the five patients with biallelic *GJB2* mutations who had inner ear abnormalities, enlarged vestibular aqueduct (EVA) was found in three and the other two had hypoplasia of the cochlea and semicircular canals.

Discussion

GJB2 mutations were found in 14.2% of our bilateral hearing loss probands and 25.2% of those diagnosed at age 0–3 (for practicality categorized as congenital hearing loss). In previous studies in East Asia (1–6), frequency of *GJB2* mutations ranged from 10% to 38% in smaller cohorts. In the present large study using Japanese hearing

loss patients collected from multiple centers, we could more accurately estimate the frequency of *GJB2* mutations in Japan and the mutation spectrum. We also found two novel mutation candidates, *p.N54S* and *p.M195V*, which cause non-conservative amino acid changes.

In Asian populations, *c.235delC* is the most common *GJB2* mutation, and its allele frequency in patients ranges from about 5% to 22% (1–7). The present study reconfirmed this mutation's high frequency in the Japanese hearing loss population. *c.235delC* accounted for 5.3% of the deafness alleles in all patients and 13.1% of those in patients diagnosed at age 0–3.

The *p.V37I* mutation was originally reported as a polymorphism (8); however, recent reports tend to consider it pathogenic with a milder phenotype (9–12) and this was supported by our results.

Only four out of twenty-six probands showed progressive hearing loss, and bilateral progression was found in only two of those, with a deterioration of less than 20 dB. Therefore, our study supports the previously reported notion that hearing loss due to *GJB2* mutations is typically non-progressive (13–15). With regard to the milder phenotype of *p.V37I*, none of the five patients with this mutation showed progression. We conclude that this mutation causes milder congenital hearing loss which may not be noticed until age 4 or older.

However, even though it was the second most frequent allele in the hearing loss patients, the *p.V37I* allele was the most frequent in the control subjects. This may be due to the milder phenotype and non-progression of patients with *p.V37I* mutation, who therefore either do not visit ENT clinics or do not receive a recommendation for genetic testing from clinicians. Therefore, ENT clinicians should bear in mind the existence of the milder phenotype caused by the *p.V37I* mutation.

We found that patients with *c.235delC/p.R143W* were significantly more severely affected than those with other *c.235delC*-containing phenotypes. A recent study also reported that the hearing level of *c.35delG/p.R143W* is significantly worse than that of homozygous *c.35delG* (9).

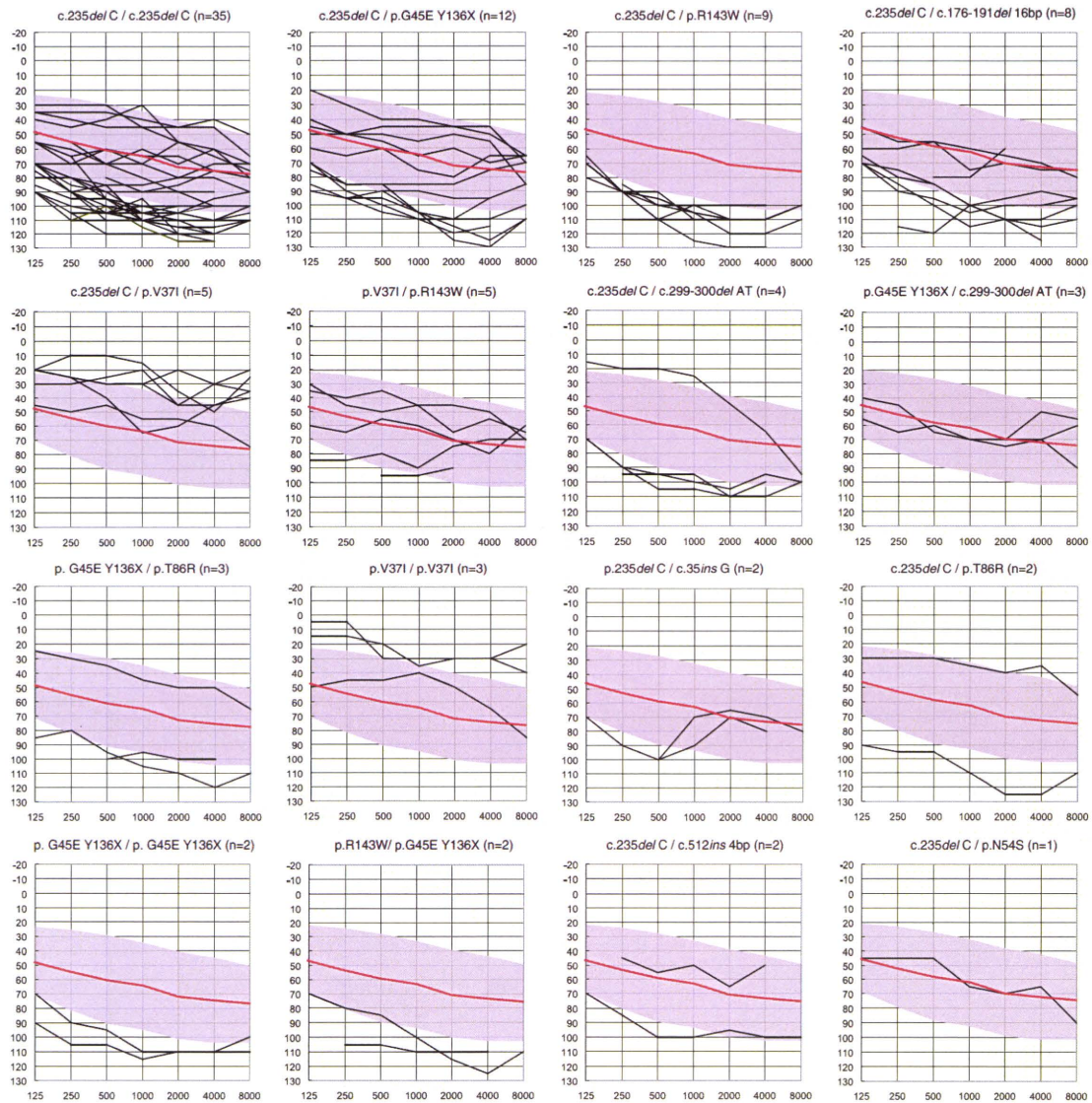


Fig. 2. Overlapping audiograms from the better ear for each genotype. The average audiogram from all subjects (1343 with bilateral sensorineural hearing loss) is indicated by a red line with standard deviation (shadow).

We compared homozygous for *c.235delC* with compound heterozygous with *p.R143W* (except for the *p.V37I* allele, which is thought to be a milder phenotype), finding the hearing level of the latter to be significantly worse. Also, comparing only the milder *p.V37I* allele, the hearing level of *p.V37I/p.R143W* was worse than that of *p.V37I/p.V37I* and *p.V37I/c.235delC*. These results suggest that *p.R143W* leads to a worse phenotype than other *GJB2* mutations.

The majority of our probands did not have tinnitus or vestibular dysfunction. Only 8% (5/65)

of the patients with biallelic *GJB2* mutations had inner ear malformation, significantly lower than in the overall population with bilateral hearing loss, and in accordance with previous reports (14, 16, 17). Hearing loss patients with *GJB2* mutations also had a near absence of tinnitus, vestibular dysfunction and inner ear malformations.

In conclusion, our results describe the frequency of *GJB2* mutations and associated clinical features in a large Japanese cohort. Recently, based on our database of mutation spectrums found in Japanese, we have developed a genetic test for use in

Large cohort study of Japanese *GJB2* mutations

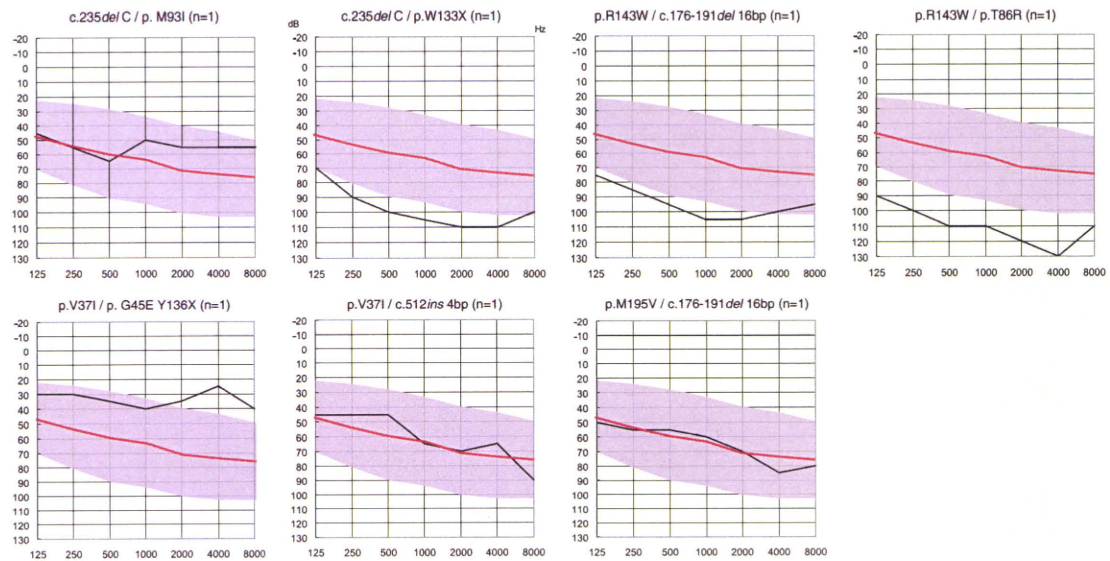


Fig. 2. Continued

diagnostic screening for hearing loss based on the invader assay (18). This database will also facilitate clinical application, and we intend to expand it to cover all Asian populations.

Acknowledgements

We thank the participants of the Deafness Gene Study Consortium: Drs. Norihito Takeichi and Satoshi Fukuda (Hokkaido University), Drs. Atsushi Namba and Hideichi Shinkawa (Hirosaki University), Drs. Yumiko Kobayashi and Hiroaki Sato (Iwate Medical University), Drs. Tetsuaki Kawase and Toshimitsu Kobayashi (Tohoku University), Drs. Tomoo Watanabe, Tsukasa Ito and Masaru Aoyagi (Yamagata University), Drs. Hiroshi Ogawa and Koichi Omori (Fukushima Medical University), Drs. Kotaro Ishikawa and Keiichi Ichimura (Jichi Medical University), Drs. Kyoko Nagai and Nobuhiko Furuya (Gunma University), Drs. Shuntaro Shigihara, Yasuyuki Nomura and Minoru Ikeda (Nihon University School), Drs. Tetsuo Ikezono and Toshiaki Yagi (Nippon Medical School), Dr. Shunichi Tomiyama (Nippon Medical School Tama Nagayama Hospital), Drs. Hiromi Kojima, Yuika Sakurai and Hiroshi Moriyama (Jikei University), Dr. Kozo Kumakawa (Toranomon Hospital), Dr. Satoko Abe (Abe ENT Clinic), Drs. Hajime Sano and Makito Okamoto (Kitasato University), Dr. Satoshi Iwasaki (Hamamatsu Medical University), Dr. Kazuhiko Takeuchi (Mie University), Dr. Masako Nakai (Shiga Medical Center for Children), Drs. Masahiko Higashikawa and Hiroshi Takenaka (Osaka Medical College), Drs. Yuko Saito, Masafumi Sakagami (Hyogo College of Medicine), Dr. Yasushi Naito (Kobe City Medical Center General Hospital), Drs. Keiji Fujihara, Akihiro Sakai and Noboru Yamanaka (Wakayama Medical University), Drs. Kunihiro Fukushima, and Kazunori Nishizaki (Okayama University), Drs. Kazuma Sugahara and Hiroshi Yamashita (Yamaguchi University), Drs. Naoto Hato and Kiyofumi Gyo (Ehime University), Drs. Yasuhiro Kakazu and Shizuo Komune (Kyushu University), Drs. Mayumi Sugamura and Takashi Nakagawa (Fukuoka

University), Dr. Haruo Takahashi (Nagasaki University), Dr. Yukihiko Kanda (Kanda ENT Clinic), Drs. Hirokazu Kawano and Tetsuya Tono (Miyazaki Medical College), Drs. Ikuyo Miyanojima and Yuichi Kurono (Kagoshima University), Drs. Akira Ganaha and Mikio Suzuki (Ryukyus University), for providing samples of their patients. We also thank A. C. Apple-Mathews for help in preparing the manuscript. This work was supported by the Ministry of Health and Welfare, Japan (S.U.), and a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (S.U.).

Conflict of interest

We, the authors, declare that there were no conflicts of interest in conjunction with this paper.

References

1. Abe S, Usami S, Shinkawa H et al. Prevalent connexin 26 gene (*GJB2*) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37: 41–43.
2. 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: 329–333.
3. Park HJ, Hahn SH, Chun YM et al. Connexin26 mutations associated with nonsyndromic hearing loss. *Laryngoscope* 2000; 110: 1535–1538.
4. Liu XZ, Xia XJ, Ke XM et al. The prevalence of connexin 26 (*GJB2*) mutations in the Chinese population. *Hum Genet* 2002; 111: 394–397.
5. Wang YC, Kung CY, Su MC et al. Mutations of Cx26 gene (*GJB2*) for prelingual deafness in Taiwan. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 495–498.
6. Shi GZ, Gong LX, Xu XH et al. *GJB2* gene mutations in newborns with non-syndromic hearing impairment in Northern China. *Hear Res* 2004; 197: 19–23.