

Figure 5. Case 5. This 68-year-old man presented with slowly progressive bilateral hearing loss from around age 40. He had only minimal gain from hearing aids. The PULSAR FLEXsoft/RW approach was applied on May 17, 2010. Preservation of residual hearing was obtained. (A) Endoscopic view of round window insertion, (B) postoperative X-ray finding, (C) imaging with putative location of electrode and the referential tonotopic map, (D) preoperative and postoperative audiograms.

There have been a series of trials with the goal of minimizing intracochlear trauma, by both cochleostomy insertion and round window insertion. For cochleostomy insertion, to avoid trauma, much attention has been paid to the cochleostomy site with the aim of avoiding the critical structures of the inner ear [10,11]. According to Lane et al. [12], by using 64-slice multidetector computed tomography (CT), localization of the electrode in the scala vestibuli as well as migration of the electrode array from the scala tympani to the scala vestibuli, which may influence hearing preservation, was observed in the patients with cochleostomy. On that basis, round window insertion was chosen in the present series.

Detailed clinical evaluation has confirmed the atraumaticity of the surgical approach in the present cases from the point of drilling time as well as of vestibular function.

During cochleostomy, noise levels were reported ranging from 114 to 128 dB SPL, indicating that during inner ear surgery they reach levels that can cause noise-induced hearing loss [13].

Our measurements clearly showed that drilling time to reach the perilymphatic space is significantly less for the round window approach compared with cochleostomy insertion, suggesting reduced influence of noise-induced trauma that may cause sensorineural hearing loss.

The importance of conservation of vestibular function is recognized, especially for bilateral cochlear implantation. A recent study suggested that dysfunction of the saccular macula, an integral component of the otolith system, likely resulting from insertion trauma of the cochlear implant electrode, can cause chronic dizziness after cochlear implantation [14]. In the present series, postoperative assessment of VEMPs as well as caloric response also supported

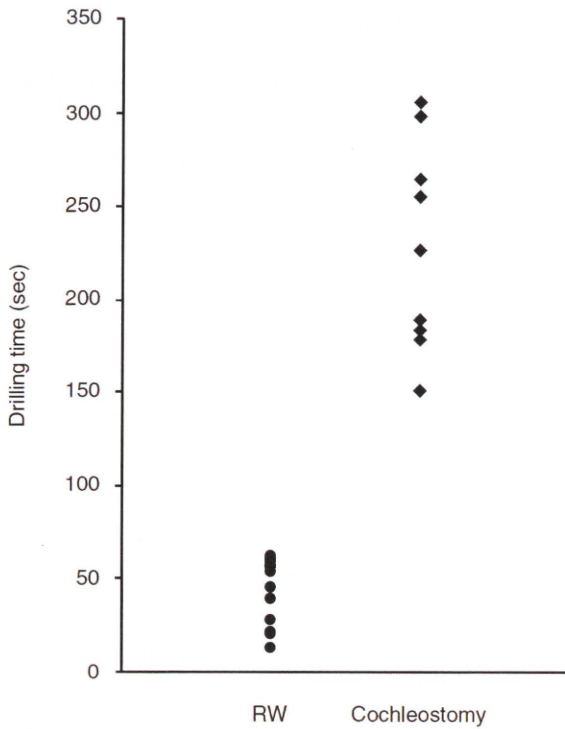


Figure 6. Video recording showing that drilling time to reach the perilymphatic space is significantly shorter for the round window approach compared with cochleostomy insertion.

achievement of atraumatic surgery from the vestibular functional point of view. Comparison with the cochleostomy insertion cases showed symmetrical VEMP scores in round window cases. The cochleostomy cases showed poorer response postoperatively, indicating that saccular function may be affected by the cochleostomy. These data support the recent report that for the sacculus, which is known to be the most vulnerable vestibular organ, the round window approach is preferable from the viewpoint of vestibular function [15].

**Conclusion**

In our series of experiences with full insertion with a long electrode we were able to preserve residual hearing at low frequencies as well as the vestibular function. Combined postoperative imaging with the referential tonotopic map clearly indicated that hearing preservation can be achieved even in the presence of a long electrode covering the residual hearing region and indicated that development of atraumatic procedures, including fine flexible electrodes, surgical technique (round window insertion), and postoperative steroid application enabled successful hearing preservation.

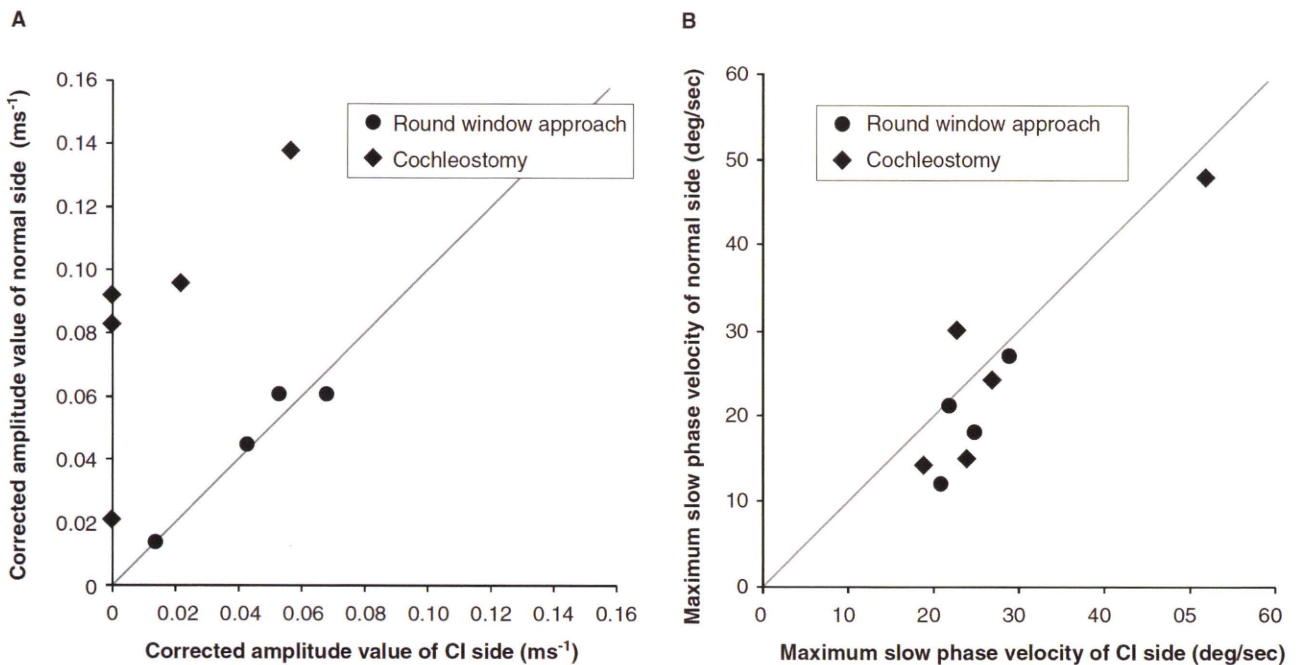


Figure 7. (A) Vestibular evoked myogenic potential (VEMP) responses were recorded in four of five cases and were well preserved postoperatively. VEMP responses decreased postoperatively in the cochleostomy cases while they were maintained in the round window insertion cases. Corrected amplitude value Cp13-n23 (ms<sup>-1</sup>) = amplitude Cp13-n23 (micro V)/background electromyographic activities (micro V ms). (B) Caloric response was well preserved and there were no differences between the two groups. MSV, maximum slow eye velocity.

## Acknowledgments

We thank Ms A.C. Apple-Mathews for help in preparing the manuscript. This study was supported by a Health Sciences Research Grant (Research on Eye and Ear Science, Immunology, Allergy and Organ Transplantation) from the Ministry of Health and Welfare of Japan.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- [1] Talbot KN, Hartley DE. Combined electro-acoustic stimulation: a beneficial union? *Clin Otolaryngol* 2008;33:536–45.
- [2] Lehnhardt E, Laszig R. 1994. Specific surgical aspects of cochlear implant soft surgery. In: Hochmair-Desoyer IJ, Hochmair ES, editors. *Advances in cochlear implants*. Vienna: Manz. p 228–9.
- [3] Skarzynski H, Lorens A, Piotrowska A, Anderson I. Preservation of low frequency hearing in partial deafness cochlear implantation (PDCI) using the round window surgical approach. *Acta Otolaryngol* 2007;127:41–8.
- [4] Adunka O, Kiefer J, Unkelbach MH, Lehnert T, Gstoettner W. Development and evaluation of an improved cochlear implant electrode design for electric acoustic stimulation. *Laryngoscope* 2004;114:1237–41.
- [5] Baumgartner WD, Jappel A, Morera C, Gstöttner W, Müller J, Kiefer J, et al. Outcomes in adults implanted with the FLEXsoft electrode. *Acta Otolaryngol* 2007;127: 579–86.
- [6] Gomi T, Hirano H, Umeda T. Evaluation of the X-ray digital linear tomosynthesis reconstruction processing method for metal artifact reduction. *Comput Med Imaging Graph* 2009; 33:267–74.
- [7] Usami S, Miyagawa M, Suzuki N, Moteki H, Nishio S, Takumi Y, et al. Genetic background of candidates for EAS (Electric-Acoustic Stimulation). *Audiol Med* 2010;8: 28–32.
- [8] Kiefer J, Böhnke F, Adunka O, Arnold W. Representation of acoustic signals in the human cochlea in presence of a cochlear implant electrode. *Hear Res* 2006;221:36–43.
- [9] van de Water TR, Dinh CT, Vivero R, Hoosien G, Eshraghi AA, Balkany TJ. Mechanisms of hearing loss from trauma and inflammation: otoprotective therapies from the laboratory to the clinic. *Acta Otolaryngol* 2010; 130:308–11.
- [10] Briggs RJ, Tykocinski M, Stidham K, Roberson JB. Cochleostomy site: implications for electrode placement and hearing preservation. *Acta Otolaryngol* 2005;125:870–6.
- [11] Adunka OF, Pillsbury HC, Buchman CA. Minimizing intracochlear trauma during cochlear implantation. *Adv Otorhinolaryngol* 2010;67:96–107.
- [12] Lane JI, Witte RJ, Driscoll CL, Shallop JK, Beatty CW, Primak AN. Scalar localization of the electrode array after cochlear implantation: clinical experience using 64-slice multidetector computed tomography. *Otol Neurotol* 2007;28: 658–62.
- [13] Strömberg AK, Yin X, Olofsson A, Duan M. Evaluation of the usefulness of a silicone tube connected to a microphone in monitoring noise levels induced by drilling during mastoidectomy and cochleostomy. *Acta Otolaryngol* 2010;130: 1163–8.
- [14] Basta D, Todt I, Goepel F, Ernst A. Loss of saccular function after cochlear implantation: the diagnostic impact of intracochlear electrically elicited vestibular evoked myogenic potentials. *Audiol Neurootol* 2008;13:187–92.
- [15] Todt I, Basta D, Ernst A. Does the surgical approach in cochlear implantation influence the occurrence of postoperative vertigo? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2008; 138:8–12.

## ORIGINAL ARTICLE

**Clinical profile of hearing loss in children with congenital cytomegalovirus (CMV) infection: CMV DNA diagnosis using preserved umbilical cord**SAKIKO FURUTATE<sup>1</sup>, SATOSHI IWASAKI<sup>2</sup>, SHIN-YA NISHIO<sup>1</sup>, HIDEAKI MOTEKI<sup>1,2</sup> & SHIN-ICHI USAMI<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Otolaryngology and <sup>2</sup>Department of Hearing Implant Science, Shinshu University School of Medicine, Matsumoto, Japan**Abstract**

**Conclusions:** Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is a major cause of bilateral and unilateral sensorineural hearing loss (SNHL) in children, accounting for 9.0% of SNHL cases. The diagnostic rate using combined genetic deafness test and CMV DNA detection test was determined to be 46.4% in bilateral profound SNHL. **Objectives.** The present study investigated the prevalence of congenital CMV infection diagnosed retrospectively by detection of CMV DNA in dried umbilical cord specimens from children with unilateral or bilateral SNHL up to the age of 12 years. **Methods:** Preserved dried umbilical cords were collected from 134 children with bilateral (46 children) or unilateral (88 children) SNHL. DNA was extracted from the dried umbilical cords and CMV DNA was detected by quantitative PCR. Genetic deafness tests based on the invader assay were performed in children with bilateral SNHL. **Results:** CMV DNA from the dried umbilical cords was detected in 8.7% of the bilateral SNHL and 9.1% of unilateral SNHL. Deafness gene mutations were identified in 21.7% (10/46) of children with bilateral SNHL.

**Keywords:** Sensorineural hearing loss, *GJB2*, *SLC26A4***Introduction**

Sensorineural hearing loss (SNHL) is one of the most common birth defects. Genetic causes of SNHL can be found in half of prelingual cases and the remaining half are ascribed to environmental or unidentified genetic factors. The most common environmental cause of SNHL is congenital cytomegalovirus (CMV) infection, with an estimated overall birth prevalence of approximately 0.3–2.4% [1]. The vast majority (approximately 90%) of these infants exhibit no signs of congenital infection, which is asymptomatic at birth. Approximately 10% of infected infants are born with clinical symptoms of congenital CMV infection. SNHL reportedly occurs in 22–65% of children with symptomatic congenital CMV

infections and 6–23% of children with asymptomatic infections [2].

Late-onset and progressive natures are characteristic of SNHL with congenital CMV infection. The frequency of SNHL in children with asymptomatic congenital CMV infection is also uncertain. The gold standard for diagnosis of congenital CMV infection is the isolation of the virus from urine or saliva in the first 2 weeks of life. However, asymptomatic congenital CMV infection in children who develop late-onset SNHL after 2 weeks of age cannot be diagnosed on the basis of viral isolation from urine or saliva. Detection of CMV DNA in infant blood or umbilical cord using polymerase chain reaction (PCR) assays is a more feasible method to identify children with late-onset of SNHL. Blood stored as dried blood

## 2 S. Furutate et al.

spots (DBS) on Guthrie cards and the dried umbilical cord that is generally stored at home as a memento of the birth in the Japanese culture are suitable for retrospective diagnosis of congenital CMV infection.

Congenital CMV infections and genetic defects are the two major causes of SNHL in children. For severe bilateral SNHL children, Ogawa et al. [3] reported that congenital CMV infection, which was diagnosed by detection of CMV DNA in dried umbilical cord, and genetic defects (*GJB2*) were identified in 15% and 30% of the children, respectively. The etiology of SNHL in children including mild to moderate SNHL and unilateral SNHL is still uncertain. The purpose of the present study was to investigate the prevalence of congenital CMV infection diagnosed retrospectively by detection of CMV DNA extracted from dried umbilical cord specimens in children with unilateral or bilateral SNHL defined at an age of months or even years after birth. Genetic testing was also applied to identify the other causes of SNHL.

## Material and methods

### Subjects

This study evaluated 134 patients (70 males and 64 females) with bilateral (46 patients) or unilateral (88 patients) SNHL who were referred to the Department of Otolaryngology, Shinshu University School of Medicine, from May 2008 to September 2009 (Table I). Informed consent and dried umbilical cord for the preparation of DNA specimens were collected for all of them. The ages of children who were diagnosed with SNHL ranged from 1 month to 138 months (mean age  $37.7 \pm 36.2$  months). Children with deafness syndrome were excluded from this study by an etiologic work-up of their SNHL. Both genetic deafness testing and CMV DNA analysis were performed for children with bilateral SNHL. For

children with unilateral SNHL, CMV DNA analysis and genetic test (*GJB2*, *Mit1555*) were performed.

### Audiologic evaluations

Audiometric evaluation was performed for each patient using auditory brainstem response (ABR) and auditory steady-state evoked response (Master 580-Navpro; Nihon Kohden Co. Ltd, Tokyo, Japan) as objective audiologic tests and behavioral audiologic tests and/or pure tone audiometry were also used. Hearing levels (average of 500, 1000, 2000, 4000 Hz) of the patients were classified into two categories on the basis of the severity of the worse ear: severe (71–90 dB) to profound (>90 dB), mild (20–40 dB) to moderate (41–70 dB). The threshold of ABR was determined as a means of hearing level in 5 of 134 children with hearing loss. The follow-up hearing assessments were performed at intervals of 6–12 months. Progressive hearing loss was defined as a decrease in hearing of 10 dB or more at one or more frequencies. Fluctuating hearing loss was defined as a decrease in hearing of >10 dB followed by an improvement of >10 dB at one or more frequencies.

### Preparation of DNA samples and real-time PCR analysis and genetic testing

To analyze congenital CMV infection, we used CMV-DNA quantitative PCR (qPCR) analysis. Before qPCR analysis, the total DNA including genomic DNA and CMV DNA was extracted from preserved dried umbilical cords. Preserved dried umbilical cord samples were collected from hearing loss patients and controls. As a positive control, we used preserved umbilical cords from two patients with symptomatic congenital CMV infection, identified by CMV from urine in the first 2 weeks of life at the Department of Pediatrics, Shinshu University Hospital. As a negative

Table I. Summary of children with bilateral and unilateral hearing loss.

Hearing loss	Gender	Hearing level (dB)	Affected side	Severe to profound hearing loss		Mild to moderate hearing loss	
				Hearing level	Age at diagnosis (months)	Hearing level	Age at diagnosis (months)
Total ( <i>n</i> = 134)	M = 70, F = 64			101 (75.4%)	34.4 ± 34.7	33 (24.6%)	48.8 ± 38.7
Bilateral ( <i>n</i> = 46)	M = 31, F = 15	71.8 (R)		28 (20.9%)	16.6 ± 19.9	18 (13.4%)	11.1 ± 39.1
Unilateral ( <i>n</i> = 88)	M = 39, F = 49	89.5 (W)	R = 43, L = 45	73 (54.5%)	41.2 ± 36.6	15 (11.2%)	40.3 ± 36.8
		13.6 (B)		B = 13.0, W = 97.5		B = 14.0, W = 53.5	

M, male; F, female; R, right; L, left; B, better hearing ear; W, worse hearing ear.

control, preserved umbilical cords from five healthy children without SNHL were used. Each 5 mm section of the tissue was incubated in the lysis buffer containing proteinase K and incubated at 56°C overnight. Total DNA was extracted using a DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The total amount of DNA was measured by Qubit® Fluorometer with Quant-iT™ dsDNA BR Assay Kit (Life Technologies-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Each 10 pg total DNA was analyzed by a Step One Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using a TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems). The qPCR primers and TaqMan® probe used for CMV DNA qPCR analysis are listed below: US14-1F, 5' ACGTCCACGT-TAGGATGAGG 3'; US14-1R, 5' GTATGTGGC-GCTTCTCTCGT 3'; US14-1 TaqMan probe, 5'-FAM-AACCTGTGCACCACAGCGCC-TAMRA-A-3'. To quantify the input DNA amount in each sample, qPCR with genome region was also performed, using the primers and TaqMan® probe listed below. GJB2-2F, 5' ACGTCCACGTTAGGATGAGG 3'; GJB2-2, 5' GTATGTGGCGCTTCTCTCGT 3'; GJB2-2 TaqMan probe, 5'-FAM-AACCTGTGCACCACAGCGCC-TAMRA-3'. Initial preheating steps were performed for 2 min at 50°C and 10 min at 95°C. Then qPCR was performed with 43 cycles of 15 s at 95°C and 60 s at 60°C. After qPCR analysis, relative CMV concentrations of each sample were evaluated as  $\Delta C_t$  (delta threshold cycle), which was calculated by threshold cycle of CMV qPCR minus that of GJB2 qPCR. The invader assay described by Abe et al. [4] was used for deafness genetic testing.

### Ethics approval

This study was approved by the ethical committee of Shinshu University School of Medicine. Written informed consent was obtained from either the patients or their parents.

### Results

Figure 1 shows original amplification curves of real-time PCR of the positive controls, negative controls, blank controls (samples without added DNA), and results of a typical sample (no. 12) for CMV DNA and genomic DNA (*GJB2* gene). CMV DNA was amplified in two of two cases in positive controls, none of five cases in negative controls, and none of two cases in blank controls (data not shown), therefore we considered this method to be appropriate. Comparing  $\Delta C_t$  for each sample and positive control, CMV DNA content was 0.01–0.8 times for positive control. The present study revealed that 9.0% (12/134) of the cases of children with SNHL were attributable to congenital CMV infection. CMV DNA from preserved umbilical cords was detected in 8.7% of bilateral SNHL cases (Table II) and 9.1% of unilateral SNHL cases (Table III) in children with SNHL of unknown causes. Bilateral severe to profound SNHL, bilateral mild to moderate SNHL, unilateral severe to profound SNHL, and unilateral mild to moderate SNHL caused by congenital CMV infection were detected in 14.3% (4/28), 0% (0/18), 9.6% (7/73), and 6.7% (1/15) of the hearing-impaired children, respectively.

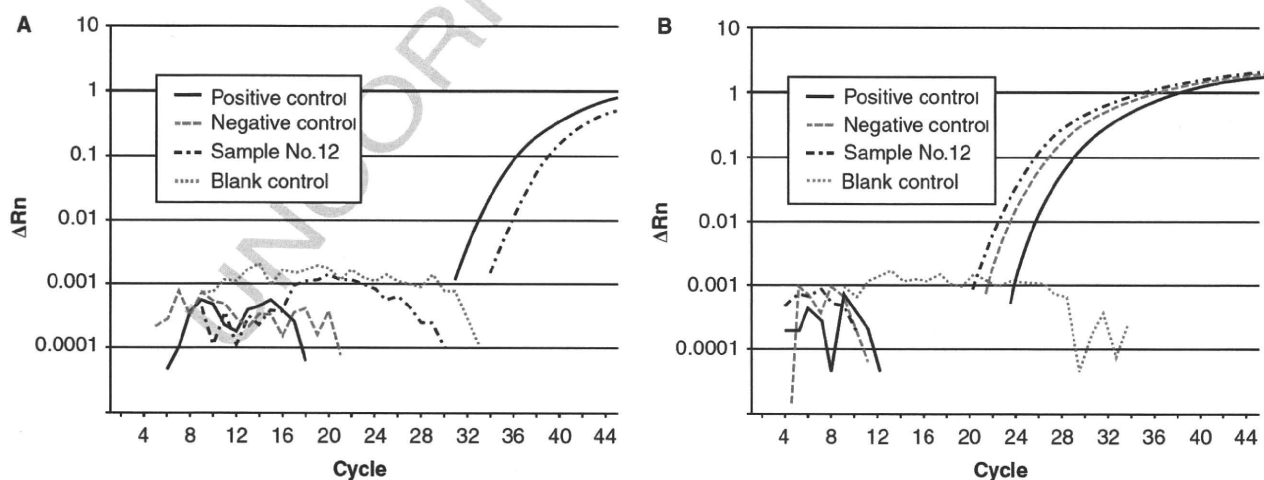


Figure 1. An original amplification plot of real-time PCR in case no. 12 with positive CMV DNA. CMV DNA in positive control and case 11 (A) and genomic DNA (*GJB2* gene) in positive control, case no. 12 and negative control (B) are amplified. These results show that our real-time PCR method is precise. Blank, sample without any added DNA.

Table II. Results of CMV DNA test combined with genetic deafness testing in bilateral sensorineural hearing loss (SNHL).

Test		Severe to profound SNHL ( <i>n</i> = 28)	Mild to moderate SNHL ( <i>n</i> = 18)	Total ( <i>n</i> = 46)
CMV DNA test	Positive	4 (14.3%)	0 (0%)	4 (8.7%)
Deafness gene test	<i>GJB2</i>	6 (21.4%)	1 (5.6%)	7 (15.2%)
	<i>SLC26A4</i>	3 (10.7%)	0 (0%)	3 (6.5%)
	Other	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Total	9 (32.1%)	1 (5.6%)	10 (21.7%)
Total diagnostic rate		46.4%	5.6%	30.4%

CMV, cytomegalovirus; SNHL, sensorineural hearing loss.

Ten deafness gene mutations (7/10, *GJB2*; 3/10, *SLC26A4*) were identified in 10 (21.7%) of the 46 children with bilateral SNHL. If restricted to the group of children with bilateral severe to profound SNHL, the rates of deafness gene mutations and positive CMV DNA increased to 32.1% (9/28) and 14.3% (4/28), respectively (Table II).

Table IV shows the clinical characteristics of 12 children in whom CMV DNA was identified. Of them, four children had bilateral SNHL and eight children had unilateral SNHL. All four children with bilateral SNHL had late-onset profound SNHL. The hearing fluctuation and pass at newborn hearing screening (NHS) test were confirmed in three of four children (75%). Among the 2/8 children with unilateral SNHL, pass or failure at NHS test were confirmed in two children, respectively. Only one child (12.5%) had hearing fluctuation. Inner ear anomaly was not found in any of the eight children with unilateral SNHL.

## Discussion

A common method for diagnosis of congenital CMV infection has been detection of CMV DNA from urine within the first 2 weeks of life and serologic testing for CMV-specific IgM antibody in serum from mother and child [5]. In recent years, the detection of CMV DNA by retrospective methods has been more

valuable, not only for diagnosing congenital CMV infection during later life, but also for identifying those children who are at highest risk of late-onset and progressive SNHL. There are some reports that DBS stored on Guthrie cards have been used for the retrospective diagnosis of congenital CMV infections [6,7]. Similarly, preserved umbilical cords have been used in Japan recently [8–10]. The sensitivity varies widely depending on the DNA extraction method in the case of DBS. Some investigators reported sensitivities of 71–100% and specificities of 99–100% [7,11,12]. In this study, the qPCR method and preserved umbilical cords were used because they were useful for more precise detection of CMV DNA.

The present study clearly showed that in a certain number of patients, hearing loss (either bilateral or unilateral) is due to CMV infection. Concerning frequencies, positive CMV DNA in children with bilateral SNHL was 8.7% (4/46). Late-onset profound SNHL (4/4: 100%) and hearing progression (3/4: 75%) were characteristic features of SNHL caused by CMV infection.

Hearing loss in children with congenital CMV infection often presents at birth, but in many instances may develop after months or even years [13]. In this study, three-quarters of subjects (75%) passed the NHS. The present results are consistent with the report that children with normal hearing at 6 months of age developed hearing loss at the

Table III. Results of CMV DNA test combined with genetic deafness test in unilateral sensorineural hearing loss (SNHL).

Test		Severe to profound SNHL ( <i>n</i> = 73)	Mild to moderate SNHL ( <i>n</i> = 15)	Total ( <i>n</i> = 88)
CMV DNA test	Positive	7 (9.6%)	1 (6.7%)	8 (9.1%)
Deafness gene test	<i>GJB2</i>	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Other	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
	Total	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Total diagnostic rate		9.6%	6.7%	9.1%

Table IV. Clinical data of children positive for CMV DNA.

Case no.	Sex	Age at diagnosis (months)	Bilateral/unilateral	Affected side	Severity	Average HL (R/L) (dB)	FL/P/NA	Onset	NHS	Delta Ct
1	F	60	Bilateral	R/L	Profound	87.5/108.8	FL/P	Late	Pass	7.52
2	F	52	Bilateral	R/L	Profound	87.5/110	FL/P	Late	Pass	8.58
3	M	50	Bilateral	R/L	Profound	100.0/100.0	P	Late	Pass	12.94
4	M	62	Bilateral	R/L	Profound	110/46.3	–	Likely late	–	0.07
5	M	6	Unilateral	L	Profound	32.5/103.8	–	Congenital	Refer (L)	8.01
6	M	65	Unilateral	R	Profound	107.5/17.5	–	Unknown	–	11.64
7	M	50	Unilateral	L	Profound	6.3/100.0	–	Unknown	–	13.59
8	F	98	Unilateral	R	Profound	110/15	–	Unknown	–	11.67
9	F	55	Unilateral	L	Profound	15.0/92.5	–	Late	Pass	8.3
11	F	2	Unilateral	R	Profound	90.0/18.3	NA	Congenital	Refer (R)	0.46
10	M	80	Unilateral	L	Severe	13.3/70.0	–	Unknown	–	14.32
12	F	44	Unilateral	L	Moderate	15.0/58.3	FL/P	Late	Pass	9.41

NHS, Newborn Hearing Screening; FL, fluctuation of hearing loss; P, progressive hearing loss; NA, not applicable.

rate of nearly 1% per year and the cumulative risk of late-onset hearing loss was a substantial 6.9% for the population with asymptomatic congenital CMV infection [13]. Children with bilateral hearing loss have speech developmental problems. Therefore retrospective diagnosis of congenital CMV infection is important to understand more about the etiology of SNHL in children. Previous reports are summarized in Table V. The frequency of congenital CMV infection in children with bilateral SNHL varied from 3% to 36%. This large variation may be due to the various backgrounds of the subjects (number of population, severity of SNHL, etc.) or the various methods utilized (e.g. CMV-IgM, DNA from urine, DNA from DBS on Guthrie cards) [6,12,14–18]. Meanwhile, based on the retrospective diagnostic method of using preserved dried umbilical cords, congenital CMV infection was detected in 10–12% of children with bilateral SNHL in Japan [8,9], but these reports were based on small numbers of subjects (10–26 cases).

Genetic deafness testing has become valuable for a precise diagnosis of hearing loss. The most frequent gene implicated in non-syndromic hearing loss is *GJB2*, which is the most prevalent gene responsible for congenital hearing loss worldwide. *GJB2*, *SLC26A4*, *CDH23*, and mitochondrial 12s rRNA are the major genetic causes of hearing loss in Japan [19]. Genetic deafness mutations could be detected in 30% of children with congenital hearing loss [4]. In the present study, deafness gene mutations were identified in 21.7% (10/46) of children with bilateral SNHL. In children with bilateral severe to profound

SNHL, the frequency of deafness gene mutations and CMV DNA positive results were 32.1% (9/28) and 14.3% (4/28), respectively. The diagnostic rate was concluded to be 46.4% (13/28). If the detection test for CMV DNA could be combined with genetic deafness testing, it would enable us to find approximately 50% of causes of bilateral severe to profound hearing loss in children.

In children with unilateral SNHL, CMV DNA from preserved umbilical cords was detected in 9.1% (8/88). The frequency of congenital CMV infection has been similar in children with unilateral and bilateral SNHL. We have speculated that approximately 10% of SNHL in children is caused by congenital CMV infection. The majority of unilateral SNHL was etiologically unknown, and there were few reports showing the frequency of congenital CMV infection in children with unilateral SNHL. Although 25% (1/4) [3] and 19% (8/42) [12] of children with unilateral SNHL were reported to be diagnosed as having congenital CMV infection by the CMV DNA detection method, the frequency based on a large number of subjects is not available. This is the first report confirming CMV as a very important cause of unilateral SNHL. The present results also showed that CMV is a crucial cause of late-onset unilateral SNHL, and in fact, five of eight subjects passed NHS.

In conclusion, congenital CMV infection plays a major role as a cause of bilateral and unilateral SNHL in children: 9.0% of SNHL of unknown causes (bilateral SNHL, 8.7%; unilateral SNHL, 9.1%) is attributable to congenital CMV infection.

Table V. Review of previous reports.

Reference	Year	Subjects	CMV positive rate			Progression (%)	Late-onset (%)	Study design	Diagnostic methods	Country
			Total	Bilateral	Unilateral					
Barbi et al. [12]	2003	>40 dB HL	9/79 (11.4%)	1/37 (2.7%)	8/42 (19%)	NR	NR	Retrospective	DBS, qPCR	Italy
Ogawa et al. [3]	2007	>20 dB, nonsyndromic SNHL	10/67 (10.5%)	9/63 (14.3%)	1/4 (25%)	NR	NR	Retrospective	UC, PCR	Japan
Samileh et al. [15]	2008	>40 dB HL	33/95 (34.7%)	NR/75	NR/20	NR	NR	Prospective	Serologic test	Iran
Stehel et al. [16]	2008	NHS refer	16/256 (6%)	NR	NR	NR	NR	Prospective	DNA from urine	USA
Walter [?]	2008	Unexplained SNHL	8/35 (22.9%)	NR	NR	NR	NR	Retrospective	DBS, qPCR	UK
Mizuno [?]	2008	Only bilateral	3/45 (6.7%)	3/45 (6.7%)	0	NR	NR	Prospective	UC, qPCR	Japan
Jakubikova et al. [14]	2009	>60 dB HL, NHS refer	4/71 (5.6%)	4/55 (7.3%)	0/16 (0%)	NR	NR	Prospective	Serologic test	Slovak Republic
Boudewyns [?]	2009	NHS refer, >20 dB	4/55 (7.3%)	NR	NR	NR	NR	Retrospective	DBS, qPCR	Belgium
Choi [?]	2009	NHS refer	13/479 (2.7%)	13/479 (2.7%)	NR	NR	NR	Retrospective	DBS, qPCR	USA
Tagawa [?]	2009	>70 dB, deaf schoolchildren	3/26 (11.5%)	3/26 (11.5%)	0 (0%)	2 (7.7%)	1 (3.9%)	Retrospective	UC, qPCR	Japan
Kimani [?]	2010	NHS refer	11/109 (10.1%)	8/92 (8.8%)	3/17 (17.6%)	NR	NR	Retrospective	DBS, qPCR	USA
Adachi [?]	2010	NHS refer, >35 dB, bilateral	13/77 (17%)	13/77 (17%)	0	NR	NR	Retrospective	UC, qPCR	Japan

NR, not reported; DBS, dried blood spot; UC, umbilical cord; qPCR, quantitative PCR.

## Acknowledgments

This work was supported by the Acute Profound Deafness Research Committee of the Ministry of Health, Labour and Welfare, Tokyo, Japan, and a grant from the Preventive Medical Center of Shinshu University Hospital.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

## References

- [1] Kenneson A, Cannon MJ. Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 2007;17:253–76.
- [2] Iwasaki S, Yamashita M, Maeda M, Misawa K, Mineta H. Audiological outcome of infants with congenital cytomegalovirus infection in a prospective study. *Audiol Neurotol* 2007;12:31–6.
- [3] Ogawa H, Suzutani T, Baba Y, Koyano S, Nozawa N, Ishibashi K, et al. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. *J Infect Dis* 2007; 195:782–8.
- [4] Abe S, Yamaguchi T, Usami S. Application of deafness diagnostic screening panel based on deafness mutation/ gene database using invader assay. *Genet Test* 2007;11: 333–40.
- [5] Genser B, Truschnig-Wilders M, Stunzner D, Landini MD, Halwachs-Baumann G. Evaluation of five commercial enzyme immunoassays for the detection of human cytomegalovirus-specific IgM antibodies in the absence of a commercially available gold standard. *Clin Chem Lab Med* 2001;39:62–70.
- [6] Choi KY, Schimmenti LA, Jurek AM, Sharon B, Daly K, Khan C, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in dried blood pots of Minnesota infants who do not pass newborn hearing screening. *Pediatr Infect Dis* 2009;28:1095–8.
- [7] de Vries JC, Claas EC, Kroes AC, Vossen AC. Evaluation of DNA extraction methods for dried blood spots in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J Clin Virol* 2009;46:S37–42.
- [8] 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* 2006;116:1991–4.
- [9] Tagawa M, Tanaka H, Moriuchi M, Moriuchi H. Retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection at a school for the deaf by using preserved dried umbilical cord. *J Pediatr* 2009;155:749–51.
- [10] Koyano S, Inoue N, Nagamori T, Yan H, Asanuma H, Yagyu K, et al. Dried umbilical cords in the retrospective diagnosis of congenital cytomegalovirus infection as a cause of developmental delays. *Clin Infect Dis* 2009;48: e93–5.
- [11] Atkinson C, Walter S, Sharland M, Tookey P, Luck S, Peckham C, et al. Use of stored dried blood spots for retrospective diagnosis of congenital CMV. *J Med Virol* 2009;81:1394–8.

- 368  
369  
370  
371  
372  
373  
374  
375  
376  
377  
378  
379  
380  
381  
382  
383  
384
- [12] 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.
- [13] Rosenthal LS, Fowler KB, Boppana SB, Britt WJ, Pass RF, Schmid DS, et al. Cytomegalovirus shedding and delayed sensorineural hearing loss: results from longitudinal follow-up of children with congenital infection. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28:515–20.
- [14] Jakubikova J, Kabatova Z, Pavlovcinova G, Profant M. Newborn hearing screening and strategy for early detection of hearing loss in infants. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2009;73:609–12.
- [15] Samileh N, Ahmad S, Mohammad F, Framarz M, Azardokht T, Jomeht E. Role of cytomegalovirus in sensorineural hearing loss of children: a case-control study Tehran, Iran. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2008;72:203–8.
- [16] Stehel EK, Shoup AG, Owen KE, Jackson GL, Sendelbach DM, Boney LF, et al. Newborn hearing screening and detection of congenital cytomegalovirus infection. *Pediatrics* 2008;121:970–5.
- [17] Grosse SD, Ross DS, Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *J Clin Virol* 2008;41:57–62.
- [18] Foulon I, Naessens A, Foulon W, Casteels A, Gordts F. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection in relation to the maternal trimester in which the maternal primary infection occurred. *Pediatrics* 2008;122:e1123–7.
- [19] Usami S, Wagatsuma M, Fukuoka H, Suzuki H, Tsukada K, Nishio S, et al. The responsible genes in Japanese deafness patients and clinical application using Invader assay. *Acta Otolaryngol* 2008;128:446–54.
- 385  
386  
387  
388  
389  
390  
391  
392  
393  
394  
395  
396  
397  
398  
399  
400  
401

UNCORRECTED PROOF

## 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 —

信州大学医学部耳鼻咽喉科  
宇佐美 真 一

### 小児難聴の原因と頻度 (Moton and Nance, 2006)

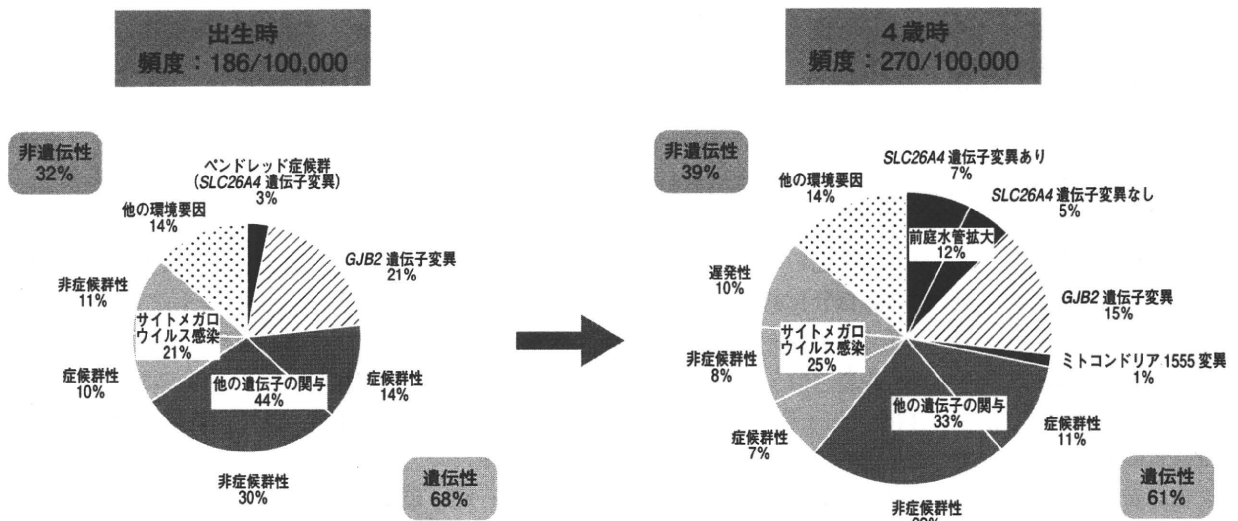


図1 小児期発症の難聴の原因 (Morton and Nance, 2006)

#### はじめに

近年、多くの難聴の原因遺伝子が同定され、難聴はもはや原因不明の疾患ではなくなりつつある。先天性難聴/小児期発症の難聴の60-70%は遺伝子の関与によるものとされており(図1)、難聴の原因を知り正確な診断を行うためには遺伝子診断が必要不可欠になってきている。また遺伝子診断は難聴の予後(重症度、進行性、

変動)、随伴症状の予測、介入法の選択、予防、遺伝カウンセリングに有用な情報を提供してくれる。

難聴の遺伝子診断や遺伝カウンセリングを行う際には耳鼻咽喉科専門医の積極的な関わりが必要であることから、本講座では耳鼻咽喉科専門医に必要な難聴遺伝子や遺伝子診断の知識について概説する。

重症度の予測／治療法の選択

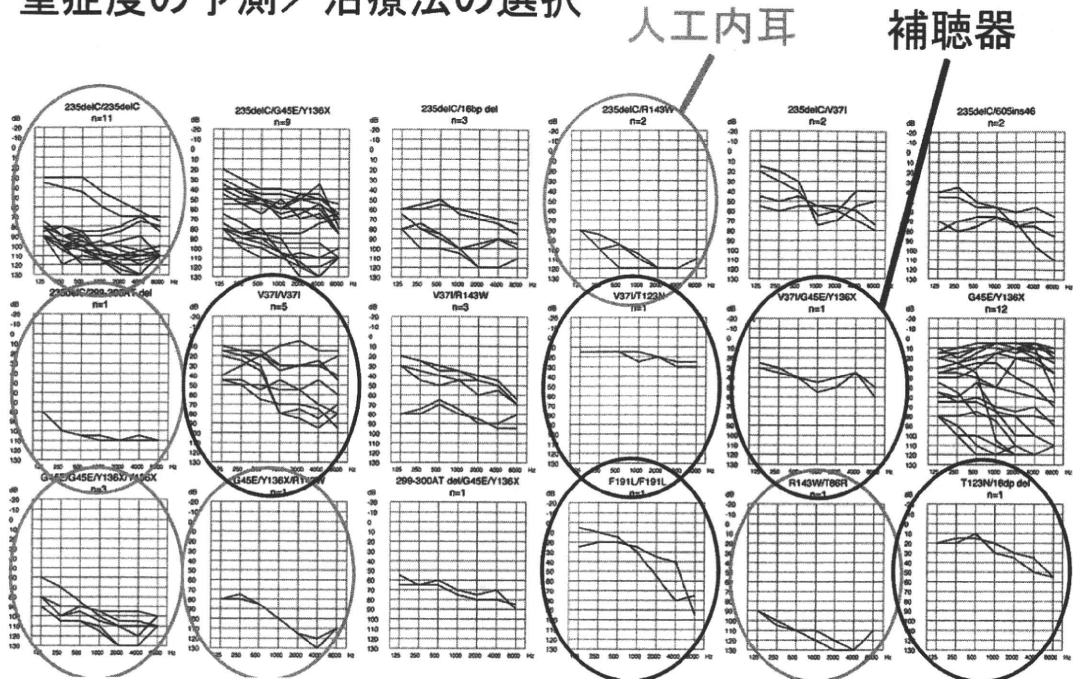


図2 GJB2 遺伝子変異による難聴患者の重症度予測 (Oguchi, et al, 2005) と治療法の選択

「先進医療」としての「先天性難聴の遺伝子診断」

日本人難聴患者には現在までに10数種類の原因遺伝子が報告されている (Usami, et al, 2008). 難聴は多種類の遺伝子が「難聴」という同じ症状を呈するために、難聴を主訴に外来を受診した患者がどの原因遺伝子が関与しているかを推測することは困難な場合が多い。インベーター法は同時に多数の変異を検出可能なスクリーニング法として優れているが (Abe, et al, 2007), インベーター法を用いた難聴遺伝子スクリーニング「先天性難聴の遺伝子診断」が2008年7月に先進医療として承認され

臨床診療として実施できることになった。近年の分子遺伝学の進歩を受けて難聴の遺伝子解析研究が進められてきたが、いよいよ難聴の遺伝子診断が臨床の現場で実施できるようになった意義は大きい。先進医療で承認された「先天性難聴の遺伝子診断」では遺伝学的検査を行い、結果を遺伝カウンセリングとともに返すまでを医療として位置づけている。今後遺伝子診断が日常診療で一般化されるにつれ、それに伴う遺伝カウンセリングの充実が求められている。

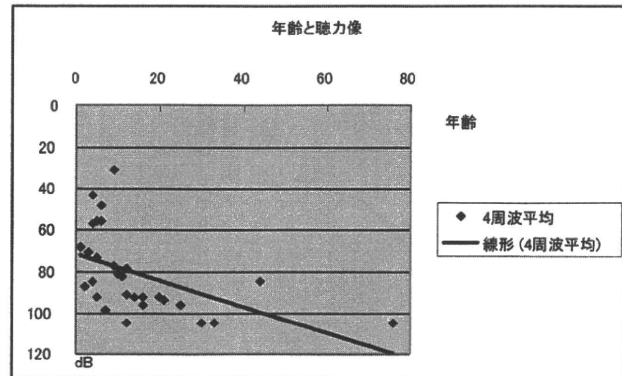
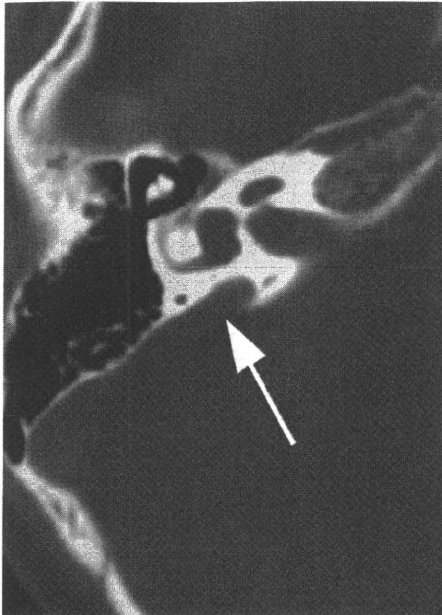


図3 *SLC26A4* 遺伝子変異による難聴患者のCT所見と難聴の進行度 (Suzuki, et al, 2007)

#### 日本人難聴患者に高頻度に見出される難聴遺伝子

##### 1) *GJB2*

日本人先天性難聴患者の約25%に *GJB2* 遺伝子変異が見出されこの遺伝子変異が日本人の難聴の原因としても重要な位置を占めることが明らかとなっている。この遺伝子変異を持つ難聴児は中等度から高度難聴を呈することが多く、補聴器や人工内耳の適応となる症例が多い。われわれの検討では遺伝子型（変異の種類）と難聴の程度に相関関係があることが明らかになっており（図2）、遺伝子検査は難聴の早期診断の一助になるとともに聴力像を予想し治療法を選択する際にも参考になる。近年、

この遺伝子変異を持つ患者の人工内耳の成績が良好であることが報告されており、今後遺伝子診断が人工内耳の適応を決定する際にも重要な情報になるとされる。

##### 2) *SLC26A4*

「前庭水管拡大」は最も頻度が多い内耳奇形の一つであるが（図3）、「前庭水管拡大を伴った非症候群性難聴」の原因遺伝子として *SLC26A4* 遺伝子変異が知られている。遺伝子診断は難聴の変動性、進行性、予想される随伴症状（めまい、甲状腺腫など）などを説明する際に有用な情報を提供してくれることが多い。

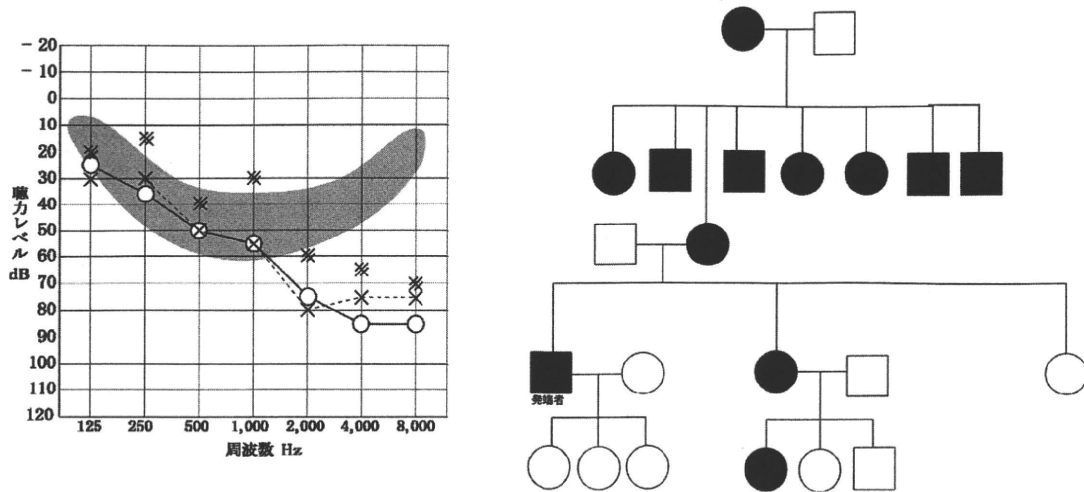


図4 ミトコンドリア1555変異による難聴症例のオージオグラム，家系図，および薬物カード

3) ミトコンドリア遺伝子 1555A>G 変異

アミノ配糖体抗生物質に対する内耳の易受傷性がミトコンドリア遺伝子 1555A>G 変異に関連することが明らかになっている。この遺伝子変異は外来を受診する感音難聴患者の約3%に、またアミノ配糖体抗生物質の投与歴がある難聴患者の約30%に見出されている。難聴の程度には個人差があるが、この遺伝子変異による難聴では進行例も認められることから定期的に聴力検査を行い経過観察することが重要である。通常、中等度以上の難聴症例には補聴器が用いられるが補聴効果の認められない高度難聴に関しては人工内耳の良い適応になることが多い。このミトコンドリア遺伝子 1555A>G 変異に伴う難聴に関してはアミノ配糖体抗生物質の投与を避けること

により高度難聴はある程度予防が可能であることから、現在われわれの施設ではミトコンドリア遺伝子変異のスクリーニングシステムを確立するとともに薬物カード(図4)を配付し予防に努めることが重要である。

参考文献

- 1) 宇佐美真一：きこえと遺伝子。金原出版；2006。
- 2) 宇佐美真一：難聴の遺伝カウンセリング—先進医療としての「先天性難聴の遺伝子診断」をふまえて—。耳鼻咽喉科臨床 2008；101：727-738。

連絡先 〒390-8621 松本市旭3-1-1

信州大学医学部耳鼻咽喉科 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

小林有美子<sup>1)</sup>, 佐藤宏昭<sup>1)</sup>, 岩井詔子<sup>2)</sup>, 村井盛子<sup>3)</sup>, 宇佐美真一<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>岩手医科大学耳鼻咽喉科, <sup>2)</sup>耳鼻咽喉科 岩井クリニック

<sup>3)</sup>盛岡市立病院耳鼻咽喉科, <sup>4)</sup>信州大学耳鼻咽喉科

**要旨:**今回我々は, 1997年から2007年までの間に岩手医科大学耳鼻咽喉科小児難聴外来を受診した, 明らかな外因のない両側感音難聴患者64例を対象とし, *GJB2* 変異, *SLC26A4* 変異, ミトコンドリア A1555G 変異について解析を行った結果と, それ以前に本人及び家族の聴力検査, オーディオグラムの特徴などから遺伝性難聴と診断されていた例と比較検討し, 遺伝性難聴の頻度がどの程度変化したのか, またそのオーディオグラムの特徴について検討を行った。両側感音難聴64例のうち, 難聴の病因と考えられる遺伝子変異が見つかったのは11例 (17.2%) であった (*GJB2* 変異9例, *SLC26A4* 2例)。遺伝性難聴の頻度は遺伝子検査以外の検査から診断した例に遺伝子検査で確認された例を加えることによって, 全体の45.3%となった。遺伝子変異例のオーディオグラムの特徴は, その左右対称性などこれまで知られている遺伝性難聴の特徴と一致することが多いことがわかった。

### —キーワード—

遺伝性難聴, *GJB2*, 非症候性感音難聴

### はじめに

遺伝性難聴は従来, 症状や随伴する他の異常所見, 遺伝形式などによって分類, 診断されてきた。2001年時点での当科小児難聴外来の1432例の統計では, 感音難聴児のうち遺伝性は約30%で, 原因不明は約60%であった<sup>1)</sup>。しかし, 原因不明例の両側感音難聴児の両親における難聴発現率は一般成人に比べ有意に高いことから<sup>2)</sup>, 原因不明例の中には遺伝性難聴が少なからず含まれている可能性がある<sup>1)</sup>。実際, 近年難聴の遺伝子座の報告が相次ぎ, 1999年には Kimberling により, 先天性感音難聴の約50%が遺伝性難聴と報告されるようになった<sup>3)</sup>。しかし, 2006年より信州大学で行われている, 日本人難聴者に高頻度にみられる10遺伝子44変異を対象としたインベダー法による網羅的解析における変異同定率は30%程度<sup>4)</sup>で, これまでより多くの変異患者

が見つかるようになったが, 遺伝性難聴の疑われる患者すべての原因特定には至っていない。

日常の外来診療においては, 難聴の確定診断のためには周産期からの生育歴, 聴覚検査, 家族歴聴取と家族の聴力検査が重要である。特に, 遺伝性難聴におけるオーディオグラムの聴力型に関する研究は, しばしばその遺伝性を推定する上で役立ってきた。1936年 Langenbeck<sup>5)</sup> は両側罹患で左右のオーディオグラムが一致しているものを左右対称性オーディオグラムと呼び, この難聴の原因に遺伝性素因の関与していることを示す所見と考えた。また家系内に難聴者がいる場合, そのオーディオグラムの相似性は遺伝性難聴の大きな特徴とされてきたが, 立木<sup>6)</sup> は家系内難聴者のオーディオグラムを重ね合わせて検討することにより, 「遺伝性難聴の家系内難聴者オーディオグラムの三原則」, すなわち非交叉の原則, 一致の原則, 分離の原則を提唱し, Langenbeck によって

発表された「左右対称性の法則<sup>9)</sup>」とともに、遺伝性難聴の臨床診断をする上で一つの試金石となりうるとした。これらのうち特に充足率の高いのは非交叉原則であるが、これは遺伝性難聴の家系内難聴者のオージオグラムを重ね合わせると、交叉する部分がないという原則である。このような特徴が、遺伝子検査導入後も遺伝性難聴を特徴づける所見として有用であるかどうか検討することは興味深いと思われた。

今回我々は、感音難聴児及びその家族に対し、ミトコンドリア DNA A1555G 変異（以下、A1555G 変異）、*GJB2* 変異、*SLC26A4* 変異の有無について直接シーケンス法で解析を行い、それ以前に本人及び家族の聴力検査結果、オージオグラムの特徴や他の臨床的特徴、画像検査などから遺伝性難聴あるいは原因不明と診断されていた例と比較検討し、遺伝性難聴の診断頻度がどの程度変化したのか、また遺伝子検査導入後、変異陽性例にどの程度オージオグラムにおける臨床的特徴が合致するののかについて検討したので、若干の考察を加えて報告する。

## 対 象

1997年から2007年までの過去10年間に岩手医科大学耳鼻咽喉科小児難聴外来で遺伝学的検査を行ったのは、410例、123家系である。これらの家系の発端者の内訳は、両側感音難聴64例、一側感音難聴45例、混合難聴や伝音難聴14例であった。一側感音難聴から遺伝子変異が2例見つかったが、この変異が直接一側難聴を引き起こす原因とは現時点では確定できなかったため、今回は両側感音難聴64例（男32、女32。平均年齢11.5歳（1～34歳））を対象とした。また、発端者の難聴はすべて、明らかな外因を認めないものであった。難聴の程度は軽度難聴22例、中等度難聴19例、高度難聴23例であった。また、難聴の確定診断は純音聴力検査によるものが50例、CORが10例、ABRが4例であった。

## 方 法

(1) 両側感音難聴64例に対して、遺伝子解析(*GJB2* 変異、*SLC26A4* 変異、A1555G 変異)の変異同定率、変異の内訳、症候群性/非症候群性、難聴の発症様式について検討した。*GJB2* 遺伝子、

*SLC26A4* 遺伝子については、直接シーケンス法により翻訳領域およびイントロン・エキソン境界の解析を行った。

(2) 両側感音難聴64例を、遺伝子検査以外の検査方法（本人及び家族の聴力検査、オージオグラムの特徴や他の臨床的特徴、画像検査など）で遺伝性難聴群と原因不明群に分類し、両群からそれぞれ遺伝子変異陽性例がどの程度みつき、またそれによって遺伝性難聴の比率がどの程度増加したかを検討した。

(3) 変異陽性例のオージオグラム及びその臨床的特徴をみるために、オージオグラムの左右対称性がみられるかどうか、また家系内難聴者がいる場合、それらのオージオグラムを重ね合わせるにより、遺伝性難聴のオージオグラムの一つの特徴である非交叉がみられるかどうかを検討した。

なお、本研究は岩手医科大学倫理委員会で審査、承認されており、事前に被験患者本人にインフォームドコンセントを行い、文書により同意を得て行った。16歳以上の未成年者及び16歳未満の者については、代諾者（親権者、後見人や保佐人が定まっているときはその人）に対してインフォームドコンセントを行い、同意を得られたものに対して採血を行った。

## 結 果

(1) 両側感音難聴64例のうち、遺伝子変異が同定されたのは11例（17.2%）であった。

変異の内訳は64例中 *GJB2* 変異が9例（14.1%）、*SLC26A4* 変異は2例（3.1%）で、A1555G 変異例は認められなかった。すべて非症候群性で、発症様式は孤発例5例、常染色体劣性遺伝（以下AR）6例で優性遺伝は認められなかった。

(2) 遺伝子検査以外の臨床検査、臨床的特徴（オージオグラムの特徴、家系図聴取、可能な限りの家族の聴力検査など）から診断した発症様式で両側感音難聴64例を分類すると、遺伝性難聴群24例（37.5%）、原因不明群40例（62.5%）であった。

これら2群から遺伝子変異陽性例は、遺伝性難聴群から6例、原因不明群から5例が同定された。従って、原因不明群から新たに遺伝性難聴と診断された5例を遺伝性難聴群24例に加えると29例となり、

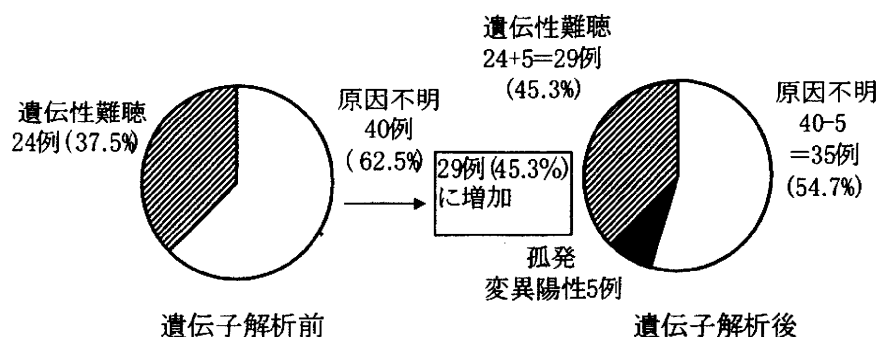


図1 遺伝性難聴の割合

表1 遺伝子変異陽性例の臨床像

(AR群: 発症様式として常染色体劣性遺伝形式をとるもの, \*印: 症例 (図2参照))

孤発	年齢 (才)	性別	変異	両耳性	聴力障害	聴力型	発症様式	家族の聴力	非交叉
1	7	女	<i>GJB2</i> 235delC・V37I 複合ヘテロ	非対称	軽度	高音障害	—	—	—
2	8	男	<i>GJB2</i> 235delC・V37I 複合ヘテロ	対称	軽度	高音障害	—	—	—
3	4	女	<i>GJB2</i> 235delC・G45E・Y136X 複合ヘテロ	対称	中等度	水平型	—	—	—
4	5	女	<i>GJB2</i> 176-191del16bp・235delC 複合ヘテロ	対称	高度	ろう型	—	—	—
5	16	女	<i>SLC26A4</i> IVS7-2・A>G・H723R 複合ヘテロ	対称	高度	ろう型	—	—	—
AR群									
1	6	男	<i>GJB2</i> G45E・Y136・F191L 複合ヘテロ	対称	軽度	谷型	AR	父軽度など	なし*
2	12	女	<i>GJB2</i> 235delC ホモ	対称	中等度	水平型	AR	姉 高度	あり
3	16	女	<i>GJB2</i> V37I ホモ	対称	中等度	高音障害	AR	弟 軽度	あり
4	2	女	<i>GJB2</i> 235delC ホモ	対称	高度	ろう型	AR	母 中等度	—
5	3	男	<i>GJB2</i> 235delC ホモ	対称	高度	ろう型	AR	姉 中等度	あり
6	21	男	<i>SLC26A4</i> T721M ヘテロ	対称	高度	高音障害	AR	姉 中等度	あり

全体に占める遺伝性難聴の割合は45.3%となった (図1)。

(3) 遺伝子変異陽性例のオージオグラムや他の臨床的特徴を検討するために、11例をさらに、家系内難聴者を認めなかった孤発群と家系内難聴者を認めた群に分けて表に示した (家系内難聴者のいた群は遺伝形式からAR群とした)。(表1)

オージオグラムの左右対称性についてみると、孤発群の一例を除いた10例はすべて左右対称性のオージオグラムを呈した。聴力障害の程度は軽度 (3例), 中等度 (3例), 高度 (5例) すべての程度がみられた。聴力型は高音障害型, 谷型, ろう型がみられ, *SLC26A4* 変異の2例はこの遺伝子変異に特

徴的な, 低音域に気骨導差を認める高音障害型オージオグラムを呈し, 聴器画像検査にて両耳に前庭水管拡大を認めた。AR群の症例6ではヘテロ接合しか検出されなかったが, Pryorら<sup>7)</sup>によるとその場合でも, 前庭水管拡大症や特徴的な聴力型があれば遺伝子変異が難聴の発症に関与している可能性があるとしているため, 遺伝子変異陽性例として検討に加えた。

AR群6例の発端者と家系内難聴者の重ね合わせオージオグラムを作成し, 遺伝性難聴のオージオグラムの3原則として立木<sup>8)</sup>により提唱された非交叉, 一致, 分離の3原則のうち, 一番充足率が高いとされる非交叉について調べた結果, ABRによる

1例を除いた5例中4例に非交叉が認められた。非交叉(-)と判断した、家系内に難聴者が多発していた *GJB2* 変異の一家系は、聴力検査を行った患者のすべての重ね合わせオーディオグラムは2~8kHzにわたって交叉がみられ非交叉(-)であった。遺伝子検査によって2名が発端者の難聴と無関係の老人性難聴と判明したため(オーディオグラムB)、これらを除いて検討すると谷型と高音障害型の二つのパターンに分かれた(分離)。

## 考 察

過去10年間に小児難聴外来で遺伝子検査を行った結果、両側感音難聴64例のうち11例(17.2%)に *GJB2* ないし *SLC26A4* の遺伝子変異が同定された。これらの遺伝子変異陽性11例中9例と最も多く検出された *GJB2* 変異は日本人先天性難聴の約20%に見られる<sup>8,9)</sup>ことから、ほぼ従来の報告と一致した。また遺伝性難聴の頻度はオーディオグラムの特徴、家系図聴取、可能な限りの家族の聴力検査などから診断した例に遺伝子検査で確認された例を加えることによって、全体の45.3%となり Kimberling (1999)<sup>9)</sup> の報告と同程度となることがわかった。

遺伝性難聴のオーディオグラムの特徴として知られているのは、オーディオグラムの左右対称性<sup>5)</sup>と家系内難聴者オーディオグラムの類似性<sup>6)</sup>である。類似性については、立木によると家系内メンバーのオーディオグラムが完全に「一致」する確率はそれほど高くない<sup>6)</sup>。しかし多数の遺伝性難聴患者オーディオグラムの重ね合わせの検討から、オーディオグラムに一致が見られない場合でも、それらのオーディオグラムは交叉しないことを述べた。つまり、家系内メンバーの重ね合わせオーディオグラムを作成し、そのオーディオグラムが一致していなくても軽度、中等度、高度などの難聴を示す数名のオーディオグラムは交叉しないことが多い(ただし、唯一交叉が4kHzと8kHzの間で起こることが多く、この場合は例外として「非交叉」と判定するとある)。たとえば、中等度難聴例のオーディオグラムが完全に軽度の例と高度の例の間に入っている所見などである。これは、あるメンバーの聴力が時間の経過とともに変化していく経過を、何人かのメンバーであらわしている姿と考えられる点で意義が大きく、つまりある家系の難聴の

その障害部位特異性の推察に役立つ知見であるとしている。さらに、2例以上のオーディオグラムが一致した上でそれが二つ以上のグループに分かれている場合を「分離の原則」とし、「遺伝性難聴の家系内難聴者オーディオグラムの三原則」とよんだ。この三原則の充足率は、立木の報告によると非交叉92.1%、一致48.7%、分離34.6%である。今回我々は、遺伝性難聴の臨床的特徴として高頻度にみられることを予測し、遺伝子変異陽性例に対し非交叉の有無について調べたところ、家系内難聴者のいるAR群で、オーディオグラムの得られた5家系中4家系(80%)に認められた。また、家系内に難聴者が多発していたが非交叉(-)と判断した残りの1家系については、遺伝子検査で老人性難聴と判明した2症例を除いてオーディオグラムを重ね合わせるとパターンが谷型(オーディオグラムD)と高音障害型(オーディオグラムE)の二つに分かれ、「分離」が遺伝子検査導入によって明確となった(図2)。このように遺伝子検査によって、遺伝性難聴のオーディオグラムにおける特徴がより明確になっていくかどうかは、今後このような家系内難聴者の比較的多い症例を増やして検討したい。

さらに、発端者のオーディオグラムの左右対称性をみると、孤発の一例を除いてすべて対称性であった。また一致、分離についても検討したが、一家系のオーディオグラム例数が少なく充足率を検討するまでには至らなかった。

非症候性遺伝性難聴の分類のひとつとして知られる Konigsmark<sup>10)</sup> の分類を表に示す(表2)。従来から遺伝性難聴として、このような症状分類が知られていたわけであるが、今回遺伝子検査で変異が判明した例で本分類にあてはまるものは少数であった。しかし、自験例には遺伝子変異陰性例に、例えば Dominant mid-frequency sensorineural hearing loss に該当する症例があったことから、今後検索遺伝子を増やしての検討が待たれる。一方、Konigsmark の分類にはない、孤発例は遺伝子変異陽性例の半数に認められた。

*GJB2* 変異症例の聴力障害の程度は軽、中等度、高度と様々で、一定の傾向はなかった。これは日本人 *GJB2* 変異症例を変異の型別に検討すると、最も高頻度にみられる 235delC では両側高度感音難聴が

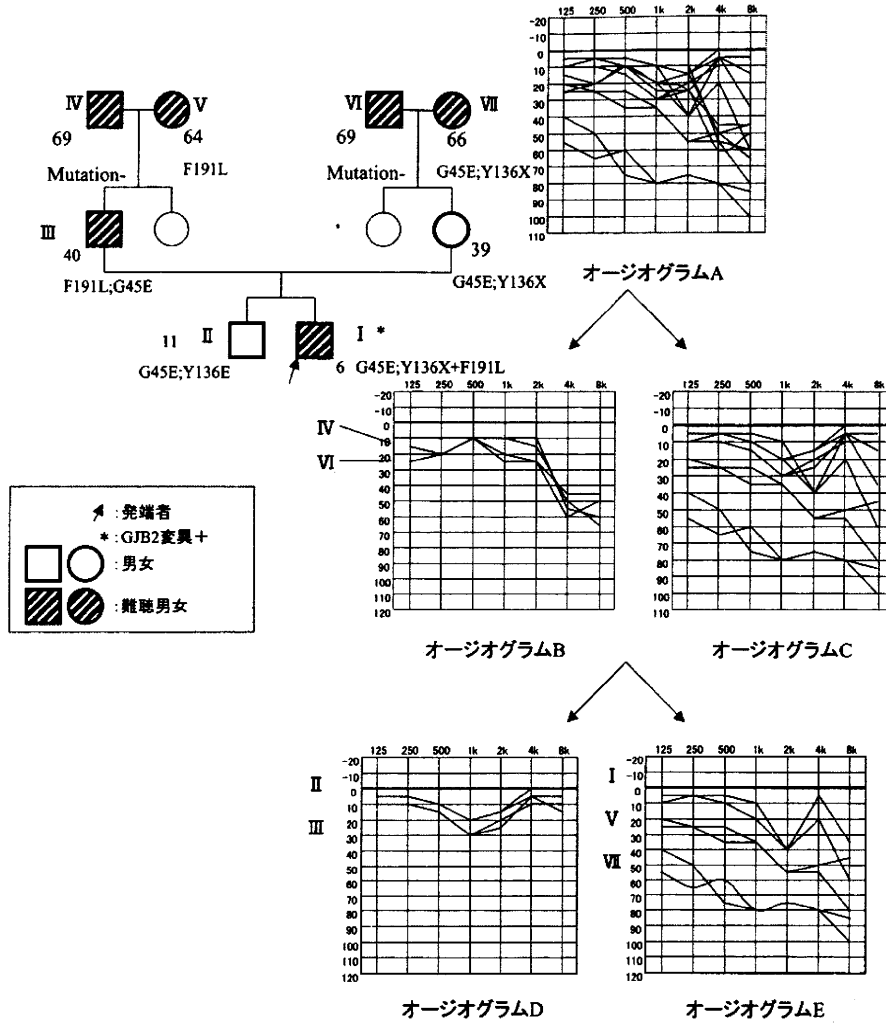


図2 遺伝性難聴家系のオーディオグラムと家系図（オーディオグラム非交叉（-）の一例）  
 家系図中、\*印：GJB2変異陽性者。I～VII：オーディオグラム左端と対応。オーディオグラムAはすべての難聴者の重ね合わせオーディオグラムで、非交叉（-）、分離（-）。オーディオグラムBは発端者難聴発現に無関係と判明した難聴者のみ、CはBを除いたオーディオグラム。このオーディオグラムCはさらに二つのパターンに分けられ「分離」が明確となる（オーディオグラムD、E）。

表2 Hereditary hearing loss without associated abnormality<sup>9)</sup>

1. dominant congenital severe deafness
2. dominant progressive nerve deafness
3. dominant unilateral deafness
4. dominant low frequency hearing loss
5. dominant mid-frequency hearing loss
6. otosclerosis
7. recessive congenital severe deafness
8. recessive early-onset neural deafness
9. recessive moderate neural hearing loss
10. sex-linked congenital deafness
11. sex-linked early-onset neural deafness

みられるが、型によって軽度、中等度と様々認められるという報告<sup>11)</sup>を裏付ける結果と考えられた。

オーディオグラムの特徴などからの分類は、先に述べた Konigsmark<sup>10)</sup>の分類も含めこれまでも報告がある。なかでも先天性聾と家族性進行性感音難聴は頻度が多く、よく知られている<sup>12), 13), 14)</sup>。先天性聾はGJB2に代表される、劣性遺伝形式をとる非症候群性難聴の臨床的症状に比較的合致している。常染色体優性遺伝型の家族性感音難聴はKonigsmark<sup>10)</sup>の分類では、Dominant progressive nerve deafness, Dominant low-frequency hearing loss, Domi-

nant mid-frequency hearing loss に該当する<sup>14)</sup>。これらの臨床像をもつ家系の遺伝子座は後に判明しており、たとえば *WFS1* は低音障害型感音難聴が優性遺伝形式で家族内に多発している<sup>15)</sup>。*TECTA* では非進行性の中音域の感音難聴を呈し、常染色体優性遺伝形式をとることが多い<sup>16)</sup>。いずれも頻度は少ないが、その診断には従来の分類の知識が有用と思われた。

自験例の変異陰性症例には Konigsmark の分類に合致する例が数例あることから、検索遺伝子の増加により今後さらに遺伝性難聴と診断される症例が発見される可能性があると考えられる。また、このような家族性難聴の患者は自らの家系に難聴者が多発していることを認識しており、原因解明を望んでいることが多い。難聴の遺伝子検索はこのような要望にこたえることのできる、有用な手段のひとつであると思われる。

#### ま と め

1. 1997年から2007年までの過去10年間に、岩手医科大学小児難聴外来において、明らかな外因のない両側感音難聴児64例に対し遺伝子検査を行った。11例 (17.2%) に遺伝子変異を認め、うち *GJB2* 変異は9例 (14.1%)、*SLC26A4* 変異は2例 (3.1%) と従来の報告通りの頻度であった。遺伝性難聴の頻度はオージオグラムの特徴、家系図聴取、可能な限りの家族の聴力検査などから診断した例に遺伝子検査で確認された例を加えることによって、全体の45.3%となった。
2. 遺伝子変異例11例のオージオグラムにおける特徴をみると、一例を除いて左右対称性であった。重ね合わせオージオグラムを作成すると、発端者のオージオグラムの得られた5家系中4家系 (80%) に非交叉が認められた。
3. *GJB2* 変異例における聴力障害の程度、聴力型は様々で、本変異の臨床的特徴を反映しているものと考えられた。
4. 自験例中の変異陰性例には Konigsmark の遺伝性難聴の分類に該当するような症状をもつ家系もあり、検索遺伝子を増やしての検討は、家族性難聴患者及び家族の原因究明の希望にこたえられる有用な手段のひとつと思われた。

#### 謝 辞

本稿の研究に関しましてご指導いただきました、岩手医科大学耳鼻咽喉科名誉教授村井和夫先生に深く感謝いたします。

本論分の要旨は第52回日本聴覚医学会学術講演 (2007年10月、名古屋市) で口演した。

本研究の一部は、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」への厚生労働科学研究費補助金により行われた。

#### A study of genetic testing in patients with hereditary hearing loss—Ten years' experience at Iwate Medical University—

Yumiko Kobayashi<sup>1)</sup>, Hiroaki Sato<sup>1)</sup>, Noriko Iwai<sup>2)</sup>, Seiko Murai<sup>3)</sup>, Shin-ichi Usami<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>Iwate Medical University

<sup>2)</sup>Iwai ENT Clinic

<sup>3)</sup>Morioka Municipal Hospital

<sup>4)</sup>Department of Otorhinolaryngology, Shinshu University School of Medicine

Hereditary hearing loss is the most frequent cause of congenital sensorineural hearing loss (SNHL), and advances in genetic testing have revealed various phenotypes of SNHL according to each gene mutation. On the other hand, clinical examinations, such as a history of development, family history, and various kinds of auditory examinations are also required for the diagnosis of hereditary hearing loss. In this paper, we reviewed 64 patients with bilateral congenital SNHL who visited Iwate Medical University between 1997 and 2007. Genetic testing (*GJB2*, *SLC26A4* and mt. A1555G mutations) revealed 11 (17.2%) patients with positive results for genetic mutation: 9 with *GJB2* mutation and 2 with *SLC26A4* mutation. Among these 11 patients, 5 had a negative family history. Patients with hereditary hearing loss increased from 24 patients