

感音性難聴児におけるガスリーカードを使った原因検索の検討

寺村 知子¹, 市川 澄子², 越智 雅晴², 野町 祥介³, 山口 昭弘⁴, 簗内 秀雄⁵

Sensorineural hearing loss in infants and young children ; Guthrie card studies

Tomoko TERAMURA, Sumiko ICHIKAWA, Masaharu OCHI,
Syosuke NOMACHI, Akihiro YAMAGUCHI, Hideo YABUUCHI

Abstract : Sensorineural hearing loss (SNHL) in neonates/ young children are occasionally caused by intrauterine CMV infection or related to certain mitochondrial DNA mutations. Using stored samples of neonatal dried blood spot (DBS) on Guthrie cards in patients with SNHL, we retrospectively studied if we could detect of CMV-DNA and/or mitochondrial DNA mutations, such as 961 del T, 1555A>G on DBS. In a study on 16 patients with SNHL, none was positive for CMV-DNA or 961 delT, 1555A>G on DBS. There was one active CMV infection case, which needed ganciclovir treatment; however, because of negative test results, the patient's CMV infection was thought postnatal. To clarify the causes of SNHL in pediatric patients, more studies on DBS are required with better and sensitive detection systems.

Key words : 感音性難聴 sensorineural hearing loss(SNHL), ガスリーカード Guthrie card,
乾燥血液 dried blood spot(DBS), サイトメガロウイルス cytomegalovirus(CMV),
ミトコンドリア DNA 変異 mitochondrial DNA mutation

I はじめに

感音性難聴（以下 SNHL）には先天性と後天性のものがあり、その原因として、胎児期ウイルス感染症や遺伝性要因、薬剤など様々な因子が報告されている。先天性のものは、出生1,000に対して1～2人に発生する。近年、新生児を対象とした聴覚スクリーニングが行われ始め、先天性 SNHL の早期診断が可能となっている。

先天性 SNHL の原因となる胎児期ウイルス感染症として知られているのが TORCH 症候群であるが、その中に含まれるサイトメガロウイルス（以下 CMV）は、妊娠中に初感染を受けた場合、胎児に感染する頻度が20-40%¹⁾とされている。そのうちの約90%は生直後には無症状²⁾であるが、長期的にみると、その15～20%^{1, 3, 4, 5)}に難聴や精神発達遅滞を認めることが報告されている。近年のわが国の傾向として、地域差はあるものの、CMV 抗体を保有していない妊婦が増えてきていることが報告されており⁶⁾、胎児への影響が危惧されている。

一方、後天性のものは薬剤性のアミノ配糖体抗生物質に

よることが知られているが、ミトコンドリア DNA の961 delT や1555A>G の変異がある場合、高率に難聴が発症することも報告されている⁷⁾。

今回、新生児期の聴覚スクリーニングの普及に伴うこれらの社会背景を考慮し、SNHL 発症原因を明らかにするために、患児のガスリーカード乾燥血液（以下 DBS）から、CMV-DNA の検出とミトコンドリア DNA の961delT 及びおよび1555A>G の変異を調べた。

II 対象及び方法

1. 対象

SNHL 患児16名（男児8名、女児8名）のガスリーカードを使用した。ガスリーカードの使用については、保護者からインフォームドコンセントを得た。診断時年齢は生後2日から84ヶ月、中央値は16ヶ月であった。難聴の患側は片側性2名、両側性14名で、その程度は70dB 以上が13名、40～70dB が3名であった。CMV 抗体価は既感染パターンが3名、感染パターンが1名、骨髄移植後であったため評価不能が1名、検査未施行が11名であった。（表1）

2. 方法

ガスリーカード DBS を3切片（1切片直径3 mm）抜き取り、QIAamp DNA micro kit（QIAGEN, GmbH, Germany）を使用して DNA を抽出した。抽出した DNA は微量であ

¹ 京都市衛生公害研究所 調査研究部門

² 京都市児童福祉センター

³ 札幌市衛生研究所

⁴ 日本食品分析センター 千歳研究所

⁵ 京都市衛生公害研究所 次長事務取扱

表1 対象

	性	診断年齢	聴力		CMV			アミノ配糖体 抗生物質の投与歴	備考
			患側	dB	IgG	IgM	C7HRP		
YT	F	16mo	B	100	nd	nd	nd	-	
TM	F	36mo	B	75	-	-	(-)	-	
HK	M	60mo	U(lt)	90	(+)	(-)	(-)	-	
DR	M	2d	U(rt)	85	(+)	(+)	(+)	-	Ganciclovir投与
HK	M	5mo	B	100	nd	nd	nd	-	
MY	M	5mo	B	100	nd	nd	nd	-	
YR	F	1mo	B	50	nd	nd	nd	-	
KA	M	7mo	B	70	(+)	(-)	(-)	-	
SM	F	33mo	B	90	nd	nd	nd	-	
MS	F	4mo	B	105	nd	nd	nd	-	
OS	F	16mo	B	105	nd	nd	nd	-	
OC	F	18mo	B	105	nd	nd	nd	-	
SK	M	3mo	B	101	nd	nd	nd	-	
OH	F	84mo	B	50	(+)	(-)	nd	-	
SR	M	84mo	B	40	nd	nd	nd	-	
TD	M	24mo	B	113	nd	nd	nd	-	

F:female, M:male, B:bilateral, U:unilateral, nd:not done

ることが予測されたため、まず β -actin PCRを行った。
 β -actin PCRで増幅産物が確認できたDNAを、CMV-PCR
 及びミトコンドリアDNAの変異検索に使用した。

CMV-PCRは、nested PCRを行った。増幅した領域はIE
 領域およびLA領域とglycoproteinB領域⁸⁾(81558-81707
 領域)、タカラ市販プライマー増幅領域(203683-203987領
 域)の4領域であった。glycoprotein B領域およびタカラ
 市販プライマー増幅領域は、BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)検索でCMVに特異性の高い領域である
 ことを確認し、nested PCRに使用するプライマーは、イ
 ンターネット上でprimer3(http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)を使用して設定し作成した。
 ミトコンドリアDNAの961delTおよび1555A>Gの変異は、
 PCRで増幅後、直接塩基配列解析を行った。

Ⅲ 結果

全例のDBSからCMV-DNAは検出されなかった。しか
 し、CMV抗体価が感染パターンおよび抗原陽性であった
 1例については、ganciclovir投与を行いCMV抗原が陰性
 化するのを確認した。この症例の聴力については、定期的
 に聴性脳幹反応(ABR)を行い経過観察中であるが、聴力
 の増悪は認めていない。

ミトコンドリアDNAの変異については、今回検討した
 症例では認めなかった。

Ⅳ 考察

CMVについてBarbiら²⁾は、我々と同様に先天性SNHL
 患者のDBSからnested PCRを行ったところ、患者の20
 ～30%にCMV-DNAが検出されたと報告している。Barbi
 らの報告をもとに、同じ領域(glycoproteinB)を増幅して
 みたが、今回の16例からは全例CMV-DNAは検出されな
 かった。その原因が、真にCMV陰性であったのか、DBS
 からDNAを検出する手技の問題であったのか、さらに検
 出方法、DNA抽出方法について検討する必要があると考
 えている。

先天性CMV感染患者の聴覚検査を生後72ヶ月まで経過
 観察したFowlerらの報告⁹⁾では、新生児期に聴覚障害を
 認めなくても、生後36ヶ月の時点で10.8%に聴覚障害を認
 め、72ヶ月ではそれが15.4%まで増加したと報告されてい
 る。さらに、その障害の程度は、50%の患者が70dB以上
 の難聴であったことも報告³⁾されている。

一方、先天性無症候性CMV感染の新生児に治療を行っ
 たKimberlinらの報告¹⁰⁾では、経過観察6ヶ月の時点で、
 治療群では聴力の悪化を認めなかったが、非治療群では41
 %に聴力の悪化を認め、さらに1年以上の経過観察では、
 治療群の21%に聴力の悪化を認め、非治療群では68%に悪
 化を認めたことが報告されている。

これらの報告からすると、先天性CMV感染のある児の
 場合、新生児期聴覚スクリーニングにおいて異常が認めら
 れなくても、後に進行性の聴覚障害をきたすことがあるた
 め、早期に診断し治療を行う必要がある。それにより聴覚

障害の発症または進行を予防することが期待できる。今回の検討症例のなかにも、1例治療を要した例があった。しかし、治療への反応は個人差があるため、治療後も定期的に聴力検査を行う必要があると考えられる。

現在、京都市で行われている聴覚スクリーニングは、生後5日までに行われており、その後のフォロー体制はまだ確立されていない。しかし、SNHL 発症原因の多様性および小児の聴覚発達過程を考慮すると、新生児期のみではなく、定期的な聴力検査が望ましいと考えられ、早急に対応する課題であると考えている。

一方、ミトコンドリア DNA の変異についても、アミノ配糖体抗生物質による治療を受けた後天性難聴患者の83%にミトコンドリア DNA の変異を認めたという報告⁷⁾に基づき、鑑別診断のため今回の対象症例で検討したが、いずれも変異は認められなかった。今回検討した症例は、全例薬剤投与歴はなかったが、これらの変異は薬剤の投与と関連なく生じることも報告されており、今後も感音性難聴の鑑別診断のひとつとして考慮する必要があると考えている。

V まとめ

1. SNHL 患者16名のガスリーカード DBS を使用して、CMV-DNA およびミトコンドリア DNA 961delT および1555A>G の変異の検出を試みた。
2. 今回検討した症例では、CMV-DNA を検出せず、ミトコンドリア DNA の変異は証明されなかった。
3. SNHL の発症機序を明らかにするために、今後も症例数を増やして検討する予定である。

VI 参考文献

- 1) 沼崎ら, サイトメガロウイルス感染経路とその臨床的意義; 日本臨床; 1998, 56, 179-183
- 2) Barbi et al, A wider role for congenital cytomegalovirus infection in sensorineural hearing loss; *Pediatr Infect Dis J*; 2003, 22, 39-42
- 3) Fowler K et al, Progressive and fluctuating sensorineural hearing loss in children with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection; *J Pediatr*; 1997, 130, 624-630
- 4) Haginoya K et al, Abnormal white matter lesion with sensorineural hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection: retrospective diagnosis by PCR using Guthrie cards; *Brain and Development*, 2002, 24, 710-714
- 5) Rivera L et al, Predictors of Hearing loss in children with symptomatic congenital cytomegalovirus infection; *Pediatrics*, 2002, 110, 762-767
- 6) 干場ら, 妊婦のサイトメガロウイルス抗体保有率の低下; 日本臨床; 1998, 56, 193-196
- 7) 山口ら, 薬剤感受性難聴 mtDNA 責任変異のスクリーニング; 日本マス・スクリーニング学会誌; 2003, 13, 53
- 8) Barbi M et al, Cytomegalovirus DNA detection in Guthrie cards : a powerful tool for diagnosing congenital infection; *Journal of Clinical Virology*; 2000, 17, 159-165
- 9) Fowler K; Newborn hearing screening: Will children with hearing loss caused by congenital cytomegalovirus infection be missed?; *J Pediatr*; 1999, 135, 60-64
- 10) Kimberlin D 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

