

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592477

研究課題名(和文) 先天CMV感染症による難聴の分子遺伝学的診断法に関する研究

研究課題名(英文) Development of the molecular diagnostic system for congenital CMV infection

研究代表者

岩崎 聡 (IWASAKI, Satoshi)

信州大学・医学部・客員教授

研究者番号：00232653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：先天性難聴の原因として先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症が知られており、遅発性・進行性の難聴もみられ新生児聴覚スクリーニングで発見できない症例もあるため、先天性CMV感染による難聴の正確な早期診断法の確立が要求される。本研究では迅速かつ精度の高いCMV検査法を確立し、難聴診断のフローチャートを作成するとともに、CMVのコピー数と難聴レベルとの関連を評価することで、治療薬の選択・量などを判断する基盤情報の確立を目的に検討を行い、迅速かつ精度の高い検査系を確立した。また、難聴患者における先天CMV感染の割合を調べた所9%であり、難聴の主要な原因であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is a one of the major cause of bilateral and unilateral sensorineural hearing loss (SNHL) in children. 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. To evaluate the prevalence of congenital CMV infection on the SNHL patients, preserved dried umbilical cords were collected from 300 children with bilateral or unilateral SNHL. DNA was extracted from the dried umbilical cords and CMV DNA was detected by quantitative PCR. As a results, CMV DNA from the dried umbilical cords was detected in 8.7% of the bilateral SNHL and 9.1% of unilateral SNHL.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：耳科学 難聴 先天CMV感染症

1. 研究開始当初の背景

(1)先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染は、新生児の0.2~2.5%にみられると報告されている比較的頻度の高い先天性ウイルス感染のひとつである。先天性CMV感染のある児のうち10%は、出生時に低出生体重、精神運動発達遅滞、脈絡膜炎、難聴など様々な症状を呈する症候群性の症状をとるが、90%の児は出生時には何も症状を呈さない。しかしながら、このうち約30%の児が遅発性の難聴を呈することが知られており、また、遺伝子変異による難聴の次に頻度の高い先天性難聴の原因となっている。本邦でも以前はCMV抗体保有率が90%以上と高かったが、近年、抗体保有率の低下がみられ、今後、先天性CMV感染症児の増加が推測されている。CMV感染による難聴は進行性・遅発性など経過は様々であり、新生児聴覚スクリーニング検査で発見されないケースもある。したがって、遅発性の難聴の場合には原因不明の難聴として扱われる可能性が高いことが推測される。

(2)先天性CMV感染症の診断法には免疫学的検査(妊婦のIgG・IgM、新生児のIgM)、新生児の尿やガスリーカードの血液、保存臍帯を使ったCMV・DNA検査(PCR法)がある。免疫学的検査は容易であるが、妊娠中の感染だけでなく、再感染や再活性化でもCMV IgM抗体は陽性となる例があるため診断が困難なケースも認められる。また、CMV・DNA検査(PCR法)には、出生後2週間以内の尿によるDNA検査を行う必要があるため、出生後数週間経過してからの診断には尿中CMV・DNA検査は利用できない。この問題を解決するため、欧米ではガスリーカードの血液からDNAを採取しCMV・DNA診断が行われており、本邦では臍帯の組織を使ったCMV・DNA診断法が数施設で行われている。しかしながら、欧米のガスリーカードを使用したDNA検査では、先天性CMV感染症による難聴の頻度は3%~30%、本邦の臍帯の組織からのDNA検査では10%~12%とばらつきが多い。これは、検査法が不安定であることが原因であると考えられており、より迅速かつ正確に診断する手法が求められている。

(3)先天性CMV感染による難聴の治療としては、両側重度難聴に対しては人工内耳が有効であることが報告されている。また、最近では、ガンシクロビルの点滴療法や点滴+内服療法による難聴の改善・遅発性難聴発症や進行予防効果が報告されている。海外ではNASBA法を用いてCMV mRNAを測定することで、ウイルスの活性化状態を評価し、抗ウイルス剤投与中止の指標等に利用する試みがなされている。また、難聴を発症した児は難聴を発症しなかった児に比べ、CMVのDNA量が有意に高かったことから、CMVの

DNA量を測定し、難聴発症の予知に利用する試みも行われている。

2. 研究の目的

(1)先天性難聴の原因として、遺伝子変異の次に多いのが先天性サイトメガロウイルス(CMV)感染症である。CMV感染症による難聴の中には、遅発性・進行性の難聴もみられ、新生児聴覚スクリーニングで発見できない症例もある。また、最近は抗ウイルス剤による治療が試みられており、今後、先天性CMV感染による難聴の正確な早期診断法の確立が要求される。本研究では迅速かつ精度の高いCMV検査法を確立し、難聴診断のフローチャートを作成するとともに、CMVのコピー数と難聴レベルとの関連を評価することで、治療薬の選択・量、治療期間、治療開始時期を判断に寄与する基盤情報の確立を目的とした。

(2)また、本邦では新生児聴覚スクリーニング検査が普及しており、比較的高い受診頻度であるため、本邦におけるCMV感染症による難聴の診療フローチャートを、新生児聴覚スクリーニングの結果を組み入れて改変を行い、小児科との連携のもとその有効性に関する検討を行い、新たなフローチャートを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)高精度のCMV DNA検査に適したDNA抽出キットの選定
ガスリーカードの血液試料を用いたCMV DNA検査に関しては、用いるDNA抽出キットにより検出感度が異なる事が報告されている。保存臍帯を用いたCMV DNA検査においても、ガスリーカードの場合と同様に、用いるDNA抽出キットにより感度に差が生じる可能性が考えられるが、これまで検証されていなかった。本研究では、これまでに収集した難聴児の保存臍帯(160検体)を使用して、QIAamp DNA blood Kit (QIAGEN)、MagNA Pure LC (Roche Diagnostics)、Dynabeads Silane (Invitrogen)等のDNA抽出キットを用いてDNA抽出を行い、得られたDNAの品質をUVメーターおよびAgilent Bioanalyserを用いて評価した。また実際にReal time PCRを用いたCMV DNAの定量的解析を行い、保存臍帯からのDNA抽出に最も適したキットの選定を行った。

(2)Real-time PCR法で使用するTaqManプローブ部位の検討

CMV・DNAの検出方法としては、従来nested PCR法による報告が主流であったが、本研究ではより感度が高く、臨床症状との相関解析を行うことが可能なReal-time PCRを用いた定量解析手法を開発を行った。具体的には比較的株間の保存性の高い、CMVのUS14遺伝子領域に設計したProbeとUS-8

領域に複数設計した Probe の検出感度に関して比較検討を行い、効率よく検出可能な部位を同定した。また、周辺領域の塩基配列を直接シーケンス法により行い、PCR に用いるプライマー配列の見直しを行った。

(3) 保存臍帯の CMV DNA 量と難聴の臨床症状との相関解析

過去の報告において、ガスリーカードの血液から採取した CMV DNA 量と聴力レベルを比較すると、難聴を発症した先天性 CMV 感染症児は難聴を発症しなかった児に比べ、DNA 量が有意に高かった事を報告している。したがって、CMV DNA 量を正確に測定することにより難聴発症の予後診断に使用できる可能性が示唆される。本研究により確立した精度の高い CMV DNA 定量検査法を使用してゲノム DNA に対する CMV DNA の定量を行うとともに、聴力レベル、難聴の発症時期、進行の有無、その他の合併症の有無等の臨床症状との比較検討を行い、予後診断における定量検出法の有用性に関して検討を行った。

(4) 先天 CMV 感染症の診断・治療のフローチャートの作成

本邦では、新生児聴覚スクリーニング検査が普及しており、比較的高い受診頻度であるため、本邦におけるフローチャートの起点としては、新生児聴覚スクリーニングの結果を組み入れることが有効であることが予測される。本研究では研究成果を踏まえて、新生児聴覚スクリーニングにより refer となり、難聴が早期に発見されたケースと、遅発性に難聴が発見されるケースのそれぞれに対して、保存臍帯から CMV DNA 定量検査法により先天性 CMV 感染症が診断されるフローチャートと、治療法の選択のフローチャートを作成しその有効性に関して検討を行うとともに、研究結果を積極的に発表するとともに、小児科/産婦人科医師とも意見交換しながら、実用的な診断・治療フローチャートを作成し、広く発信することで、研究成果を臨床に還元することをめざした。

4. 研究成果

(1) 定量性の高い CMV 検査系の確立

保存臍帯を超純水で膨潤させた後に、DNeasy blood and tissue kit (QIAGEN), MagNA Pure LC (Roche Diagnostics), Dynabeads Silane (Invivrogen) の 3 種類の DNA 抽出キットを用いて DNA 抽出を行った。抽出後に得られた DNA の品質を UV メーターおよび Agilent Bioanalyser およびインターカレーター法を用いて評価した。また実際に Real time PCR を用いた CMV DNA の解析を行い、保存臍帯からの DNA 抽出に最も適したキットの選定を行った。その結果、得られた DNA の品質および収量においては、カラム法である DNeasy blood and tissue

kit を用いた場合が良好であった。また、定量 PCR 解析に関しては、インターカレーター法を用いて DNA の定量を行い、2 本鎖 DNA の定量を行えば用いる Kit 間に大きな差は認めなかった。また、TaqMan 法による定量に用いる遺伝子領域に関しては、US14 領域および US8 領域に関して検討を行った結果、US14 領域に設計したプライマーの方が感度が高いことが明らかとなった。さらに US14 領域の直接シーケンス解析を行ったところ、陽性となった 14 例中に 2 種類の配列が存在することが明らかとなったため、2 種類の鋳型に対応した TaqMan 法に用いる PCR プライマーの配列を新たに設計して用いる事で、どちらの株においても検出可能となるように改良を行った。

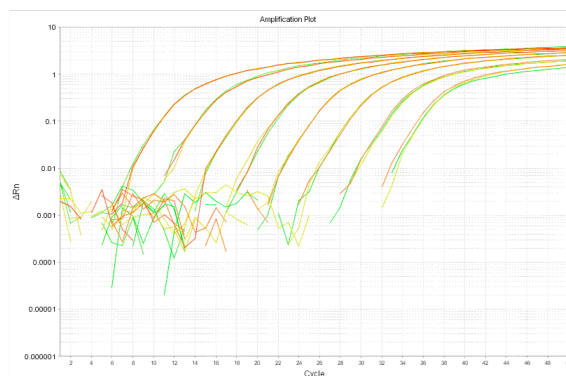


図1 本研究により確立した定量 PCR 系の測定結果: 10 倍希釈系列で各 3 回測定した検査の結果を示す。 10^7 オーダーの測定レンジを有しており高い精度で検出が出来る。

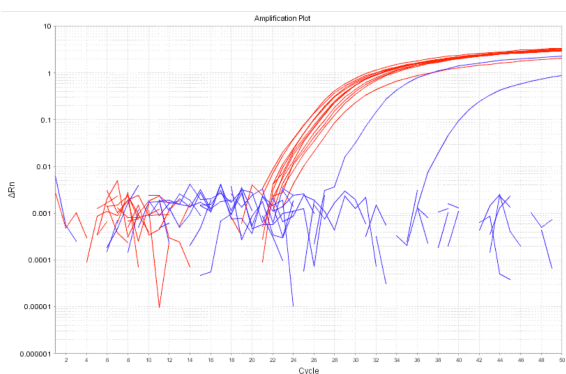


図2 本研究により確立した定量 PCR 系を用いて測定した結果: input した DNA 量のコントロールとして、ヒトゲノム上の GJB2 領域をコントロール (赤色) として用いた。図では 2 例において CMV DNA の増幅 (青色) が認められる。

(2) 保存臍帯を用いた先天性 CMV 感染症検査とその臨床像に関する検討

難聴患者に占める先天 CMV 感染症の割合およびその臨床的特徴を明らかにする事を目的に保存乾燥臍帯を用いた先天 CMV ウイルスの解析を実施した。難聴患者本人あるいはその保護者を対象に、本研究に関する十分な説明

のうえ、書面で同意を取得して保存乾燥臍帯を採取しDNAの抽出を行った。一側性難聴患者および両側性難聴患者の合計311例より保存臍帯の提供を受けて、CMV DNAの検出を試みた結果28例(9.0%)よりCMV DNAを検出した。詳細に見て行くと、両側性難聴群では8.7%、一側性難聴群では9.1%よりCMV DNAが検出された。また、同じ両側性難聴でも、難聴の程度が高度以上の群では14.3%と頻度が高いことが明らかとなった。一方、一側性の高度難聴以上の群では9.6%と全体と比較して検出率に大きな差は認められなかった。CMV DNAの検出された児に関して、コピー数と重症度の比較検討を行ったが明確な相関は認められなかった。

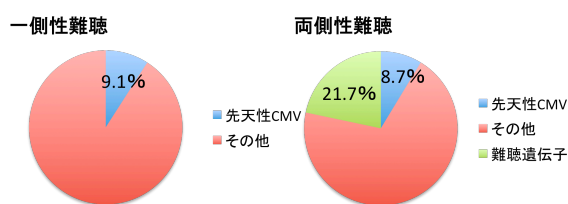


図3 本研究により保存臍帯より見出された先天CMV感染症の割合：両側性難聴、一側性難聴のどちらからも約9%の児よりCMVが検出された。一方、難聴以外のコントロール児における検出頻度は0.5%程度であったことより、先天性難聴の重要な原因となっていることが改めて確認された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① 岩崎聡、古舘佐起子、西尾信哉、矢野卓也、茂木英明、工 穰、宇佐美真一：一側性難聴児における先天性サイトメガロウイルス感染症の関与. *Otol JPN* 23 (5) : 848-853. 2013 査読有り
- ② Iwasaki S, Sano H, Nishio S, Takumi Y, Okamoto M, Usami S, Ogawa K. Hearing handicap in adults with unilateral deafness and bilateral hearing loss. *Otol Neurotol* 34(4): 644-649. 2013 査読有り
- ③ Moteki H, Suzuki M, Naito Y, Fujiwara K, Oguchi K, Nishio S, Iwasaki S, Usami S. Evaluation of cortical processing of language by use of positron emission tomography in hearing loss children with congenital cytomegalovirus infection. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 78(2): 285-289. 2013 査読有り

[学会発表] (計4件)

- ① 岩佐陽一郎、西尾信哉、矢野卓也、岩崎聡、宇佐美真一：先天性CMV感染症と一側性難聴の検討. 第23回 日本耳科学会 2013. 11. 24-26. 宮崎
- ② 矢野卓也、岩崎聡、西尾信哉、工 穰、茂木英明、宇佐美真一：先天性サイトメガロウイルス感染に対するマスキングシステム確立. 第58回 日本聴覚医学会・学術講演会 2013. 10. 24-25. 松本
- ③ Iwasaki S, Furutate S, Nishio S, Yano T, Moteki H, Usami S. Cytomegalovirus DNA diagnosis using preserved umbilical cord in hearing impaired children. 9th Molecular Biology of Hearing and Deafness Conference. 2013. 6. 22-25. Stanford University
- ④ 岩崎聡、茂木英明、工 穰、宇佐美真一：先天性サイトメガロウイルス感染症のマス・スクリーニングおよび治療法に関する研究. 第1回 耳鼻咽喉科フロンティアカンファレンス 2012. 9. 15. 旭川

[図書] (計1件)

- ① Iwasaki S, Usami S. Hearing loss in children with congenital cytomegalovirus infection. *INTECH* chapter1: 1-15. 2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 聡 (IWASAKI, Satoshi)
信州大学・医学部・客員教授
研究者番号：00232653

(2) 研究分担者

茂木 英明 (MOTEKI, Hideaki)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：60422698

(3) 連携研究者

矢野 卓也 (YANO, Takuya)
信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)
研究者番号：10511058

西尾 信哉 (NISHIO, Shin-ya)
信州大学・医学部・助教
研究者番号：70467166