

突発難聴症例における抗ムンプス IgM 抗体の検索

分科会員 福田 諭 (北大耳鼻咽喉科)

共同研究者 千田 英二・黒田 努
柏村 正明・犬山 征夫 (北大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

ムンプス難聴は急性高度難聴の原因の一つであるが、一方では突発難聴症例の中に、ムンプス不顕性感染によるものが存在するといわれている。われわれは従来より難聴予防という立場からムンプス予防接種の重要性を強調してきた。そこで今回、突発難聴症例における抗ムンプス IgM 抗体陽性頻度について検索を行った。

[材料と方法]

retrospective study。当科及び関連病院を受診した突発難聴患者 58 例の初診時における抗ムンプス IgM 抗体の検査結果を検討した。

[結 果]

陽性 3 例 (5.2%)、偽陽性 2 例 (3.4%)、陰性 53 例 (91.4%) であった。偽陽性は再検されていない。また CF 抗体ペア血清の結果から陽性であった症例が 1 例あったが、この報告では抗ムンプス IgM 抗体陽性頻度のみについて検討したので IgM 抗体陽性例には入れなかった。

[考 察]

今回の結果は、野村ら (3/53、5.7%)、設楽ら (9/130、6.9%) の報告とほぼ同様であり、突発難聴の約 5% はムンプス不顕性感染による可能性が高いと思われる。当班における臨床疫学的な調査研究によるとわが国における突発性難聴の頻度は年間 24000 人と推定計算されている。このことより年間約 1000 人の方はムンプス不顕性感染による難聴になっていると類推できる。また偽陽性例は、他のウイルス性疾患での再検査で陽性であった症例を経験しており、保存血清による再検査が必要であったと考える。ムンプスによる難聴は他の感音難聴と明らかに異なり、予防接種にて確実に予防可能である。ムンプス顕性・不顕性感染に伴う難聴の予防という立場から、予防接種の重要性を強調したい。

[参考文献]

- 1) Tanaka K, Fukuda S, Suenaga T et al: Experimental mumps virus-induced labyrinthitis : Immunohistochemical and ultrastructural studies. Acta Otolaryngol(Stockh) Suppl.456:98-105,1988
- 2) Tanaka K, Fukuda S, Terayama Y et al : Experimental mumps labyrinthitis in monkeys(Macaca irus): Immunohistochemical and ultrastructural studies. Auris Nasus Larynx(Tokyo) 15:89-96.1988.
- 3) Nomura Y, Harada T, Sakata H et al : Sudden deafness and asymptomatic mumps. Acta Otolaryngol(Stockh) suppl 456:9-11,1988
- 4) Okamoto M, Shitara T, Nakayama M et al : Sudden deafness accompanied by asymptomatic mumps. Acta Otolaryngol(Stockh) suppl 514:45-48,1994
- 5) Yanagita N, Nakashima T, Shitara T et al : Epidemiological studies on acute profound deafness in Japan. Audiology Japan 39:184-188,1996

表 1 対象

- ・ 1992年2月～1998年7月に初診 (関連病院を含む)
- ・ 58例
性別 男：35例、女：23例
年令 9～81歳

表 2 突発難聴と抗ムンプス IgM 抗体

IgM (+) : 3例

IgM (±) : 2例

IgM (-) : 53例

計 58例

(1998.12 北大耳鼻咽喉科)

セロイジン包埋ヒト側頭骨標本を用いたウイルス RNA の検出 (第2報)

分科会員 福田 諭 (北大耳鼻咽喉科)

共同研究者 大谷 文雄・古田 康
高須 毅・犬山 征夫 (北大耳鼻咽喉科)
鳥山 稔 (東京都)
飯野 ゆき子 (帝京大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

我々は現在までに、分子生物学的アプローチにより側頭骨内の3つの神経節、すなわち膝神経節・前庭神経節・らせん神経節におけるヘルペスウイルスの潜伏感染を明らかにしてきた。しかし、潜伏感染から再活性化・発症にいたるまでの過程を明らかにするためには、実際に耳疾患に罹患した症例の側頭骨を用いて検討することが必要であると考えられた。セロイジン包埋ヒト側頭骨標本は、以前から様々な耳疾患についての形態学的研究のために利用されてきている。1993年に Wackym らがこの標本から抽出した DNA を PCR 法を用いて解析する方法を報告して以来、耳疾患においても遺伝子レベルでの研究報告が相次いでいる。我々は、この標本から RNA を抽出し RT-PCR 法を用いて解析するための必要な条件について検討し、平成8年度に報告した。更に前回の報告では内耳障害を引き起こすウイルスのうち、先天性の障害を生じる風疹ウイルスについて、セロイジン包埋標本からのウイルス RNA の検出を試みたが、検出は困難であった。今回は前回ウイルス RNA が検出できなかったセロイジン包埋胎児側頭骨標本のうち、ウイルス感染を疑わせる所見が認められた症例について RNA の検索を行い、感染の有無についても検討を加えた。

【材料および方法】

1) 材料

母胎の風疹感染により1976年に人工中絶された胎児11症例のうち、ウイルス感染を疑わせる所見(血管条浮腫・蓋膜挙上・炎症細胞浸潤など)が認められた症例のみを対象とした。感染の有無についても検討するために、蝸牛以外の組織(その他の側頭骨組織・脳)についても検索した。また、前回の報告において tubulin RNA が検出できなかった症例についてももう一度 tubulin RNA の検出を試みた。

2) 方法

Rubella RNA の検出にはセロイジン包埋胎児標本から蝸牛の他、脳・その他の側頭骨の残りを、tubulin RNA の検出には前庭及び乳突蜂巣をそれぞれ切り出して使用した。切片をさらに細かく切断した後、Proteinase K 処理し、Phenol - chloroform 法で RNA を抽出した。更にエタノール沈殿にて RNA を精製した。Super Script II を用いて逆転写を行い、complimentary DNA を合成した。Rubella RNA の E1 region 上および α -tubulin RNA 上に設定した primer を鋳型とし、nested-PCR を行って DNA を増幅した。PCR 産物を、4% agarose gel を用いて電気泳動して解析した。

【結 果】

今回検討したセロイジン包埋胎児側頭骨標本において、蝸牛・脳・その他の側頭骨からの Rubella RNA の検出はできなかった。 α -tubulin RNA については今回検討した4症例中1例で RNA が検出され、前回の結果と合わせて11症例中8例(72.8%)で検出が可能であった(表1)。

【考 察】

今回 Rubella RNA の検索の対象とした4症例については、全例で tubulin RNA の検出が可能であり、確実な感染があれば検体の量を増やすことより Rubella RNA の検出は可能であると予想された。前回は比較的組織の量が少なく RNA 量も少ないと思われる蝸牛を用いた検索であったため、今回は蝸牛に加えて脳やその他の側頭骨組織を用いた。十分な RNA 量が得られる状況で、更にウイルス感染を疑わせる所見が認められた症例について検索を行ったのであるが、やはり Rubella RNA は検出できなかった。前回の報告において、viral RNA が検出できなかった理由として1)抽出された RNA が RT-PCR による検出に十分な量あるいは長さではなかった、2)母体の風疹感染は血清学的に確認されているが、胎児は感

染していなかった、3)胎児の感染があったとしても、持続感染せずにウイルスが消失した、などの点を挙げたが、量的な問題を考慮したにも関わらず viral RNA が検出されなかったことから、今回検討したセロイジン包埋胎児側頭骨標本においては不適切な人工中絶であった可能性があり、風疹の胎児感染が無かった可能性も否定できないと思われた。感染がある程度確実である症例を用いれば viral RNA の検出は可能であると思われ、RT-PCR 法を用いた RNA の解析が耳疾患に罹患した症例のヒト側頭

骨標本についての病態解明に利用できると考えられた。

[参考文献]

- 1) Ohtani F, Furuta Y, Iino Y, Inuyama Y, Fukuda S : Amplification of RNA from archival celloidin-embedded human temporal bone sections by reverse transcription-polymerase chain reaction. Laryngoscope 109,1999 in press

表1 Rubella RNA および tubulin RNA の検出結果

| Case No. | Rubella RNA | | α-tubulin RNA | |
|----------|---------------|---------------------------------------|-------------------|-------|
| | 1回目 (cochlea) | 2回目*1 (cochlea, brain, temporal bone) | 1回目 | 2回目*2 |
| 1 | - | - | + | - |
| 2 | - | - | + | - |
| 3 | - | - | + | - |
| 4 | - | - | + | - |
| 5 | - | - | + | - |
| 6 | - | - | - | - |
| 7 | - | - | + | - |
| 8 | - | - | - | - |
| 9 | - | - | + | - |
| 10 | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | + |
| | 0 / 11 | 0 / 4 | 7 / 11 | 1 / 4 |
| | 0 / 11 | | 8 / 11 (72.7%) *3 | |

*1 ; ウイルス感染を疑わせる所見 (血管条浮腫・蓋膜挙上・炎症細胞湿潤など) が認められた症例のみを対象とした。

*2 ; 1回目 negative であった症例を対象とした。

*3 ; Ohtani F, Furuta Y, Fukuda S et al; Laryngoscope 109, 1999 in press

発症早期に唾液中 VZV DNA が検出された突発性難聴症例 —抗ウイルス剤の併用による聴力回復例の報告—

分科会員 福田 諭 (北大耳鼻咽喉科)

共同研究者 大谷 文雄・古田 康
犬山 征夫 (北大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

一般に突発性難聴の原因の一つとしてウイルス感染が関与していると考えられている。しかしながら、臨床的に発症早期に病巣と考えられる内耳からの検体の採取は困難であり、その報告も極めて稀といって良い。このことから、ウイルス感染説が突発性難聴の2大発症要因の一つと推察されている割には実際の治療に際して、抗ウイルス剤が投与された報告は少ないのが現状である。

一方、顔面神経麻痺では唾液からのウイルスの検出が可能であり、ウイルスの再活性化との関係が近年、明らかにされつつあり、さらに発症早期の唾液からのウイルスの検出は抗ウイルス剤の早期投与の必要性の理論的根拠になってきている。今回我々は突発性難聴発症早期にPCR法により唾液からVZVを検出することができ、抗ウイルス剤の併用により聴力改善が得られた突発性難聴症例を経験したので、検査所見などを含めて報告する。

[症 例]

症例：69歳、女性。

主訴：右難聴。

既往歴：1989年より von Hippel Lindau 病の診断。それに伴う両側腎細胞癌の診断で手術(1989・1993年)。以後、当院脳外科および泌尿器科で follow されていた。

現病歴：1998年7月22日に軽度の回転性めまいおよび嘔気あり、翌日まで続いた。

7月24日には右側頭部痛も生じ、近医を受診。外耳道・鼓膜は異常なく小水泡も認められなかった。また聴力検査では左右差のない高音漸傾型の感音性難聴が認められた。レントゲン検査、頭部CTにて特に異常を認めなかった。

7月25日に主訴に気づき、7月27日に当院受診した。

初診時所見：側頭部に頭痛を認めたが、その他頭頸部領域には明らかな異常を認めなかった。

検査所見：聴力検査(図)

明らかな眼振は認められなかった。血清抗体価は anti-VZV IgG、anti-HSV-1 IgG ともに変動を認めず、anti-VZV IgM、anti-HSV-1 IgM は negative であった。唾液中のウイルスをPCR法で検索したところ、初診時の唾液中にVZV DNAを検出したが、翌日以降は検出されなかった。HSV-1 DNAも検出されなかった。

臨床経過：7月28日右急性感音難聴(無疱疹帯状疱疹疑い)の診断にて関連病院へ紹介、入院となった。低分子デキストラン(250ml/day, 7日間)・プレドニン(100mg/day から漸減, 17日間)と共に抗ウイルス剤であるアシクロビル(540mg/day, 7日間)を治療に用いた。その他消炎鎮痛剤・鎮暈剤も随時投与した。7月30日には頭痛が消失、7月31日にはめまい感も消失した。右側聴力の改善も認められたため(図)、8月11日には退院となった。

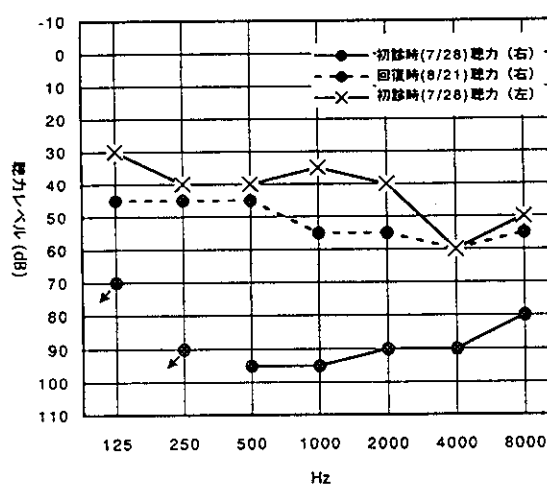


図 初診時および回復時の聴力検査所見

(7月24日の時点では関連病院耳鼻科でほぼ左右差のないことが確認されている)。

[考 察]

我々の現在までの研究結果では、健康成人の唾液中には通常 VZV DNA は全く検出されない。今回の症例では難聴の自覚後 2 日目という早期に唾液から VZV DNA が検出された。このため、無疱疹帯状疱疹である可能性を考慮し従来の治療法に加えて抗ウイルス剤の併用を試みたところ、聴力回復が得られた。

この聴力回復に関しては、他の薬剤との併用での治療であったために、抗ウイルス剤そのものが確実に聴力回復に効果があったかどうかの証明は困難であることは事実である。しかし、顔面神経麻痺で早期に唾液中に HSV-1 や VZV DNA が検出された症例において抗ウイルス剤の併用が予後の改善に寄与しているという報告もある。その一方、最近のオランダからの報告では、44 人の突発難聴に対して、ステロイド・偽薬とステロイド・抗ウイルス剤（アシクロビル）を無作為化臨床試験で検討したが有意差は認められなかったとしている。しかし突発性難聴において、実地臨床内耳からの直接の検体採取が困難あるいは、ほとんど不可能である以上、一つの傍

証として、唾液からウイルス DNA が検出された今回のような症例では、抗ウイルス剤の投与は適当であると我々は考えた。

[参考文献]

- 1) Westmore GA, Pickard BH, Stern H : Isolation of mumps virus from the inner ear after sudden deafness. *Brit. Med J* 1:14-15,1979
- 2) 古田 康、鈴木清護、福田 諭、犬山征夫：PCR 法を用いた zoster sine herpete の診断. *Facial Nerve Research* 16:65-68,1996
- 3) Furuta Y, Fukuda S, Suzuki S, Takasu T, Inuyama Y, Nagashima K :Detection of varicella-zoster virus DNA in patients with acute peripheral facial palsy by the polymerase chain reaction, and its use for early diagnosis of zoster sine herpete. *J Med Virol* 52:316-319,1997
- 4) Stokroos RJ, Albers FWJ, Tenvergert EM : Antiviral treatment of idiopathic sudden sensorineural hearing loss:Prospective, randomized, double-blind clinical trial. *Acta Otolaryngol(Stockh)* 118,488-495,1998

非症候群性遺伝性感音難聴（特発性両側性感音難聴を含む）の共同研究

| | |
|---------|------------------|
| 分科会員 | 喜多村 健（自治医大耳鼻咽喉科） |
| 分科会長 | 星野知之（浜松医大耳鼻科） |
| 分科会員 | 東野哲也（宮崎医大耳鼻咽喉科） |
| | 牧嶋和見（産業医大耳鼻咽喉科） |
| | 中島務（名大耳鼻咽喉科） |
| | 神崎仁（慶應大耳鼻咽喉科） |
| | 宇佐美真一（弘前大耳鼻咽喉科） |
| | 福田諭（北大耳鼻咽喉科） |
| 難病特別研究員 | 福島邦博（岡山大耳鼻咽喉科） |

【はじめに】

難聴の病態を解明し治療するには、難聴の原因遺伝子の解明が必要である。この遺伝子同定には、遺伝性難聴症例の臨床データの収集が基本となる。平成8年度より厚生省班研究が母体となって、日本全国の遺伝性感音難聴症例の臨床ならびに遺伝情報の収集と登録を行い、遺伝子同定研究のデータ・ベースを構築することにした。

本研究報告書では、3年間の本研究で得られた成果について報告する。

【結 果】

全国を東日本と西日本に分け、東日本地区からの検体は自治医科大学、西日本地区の検体は岡山大学にて登録し、解析を行った。1998年12月末日現在で、自治医科大学と岡山大学の両者の事務局に登録された症例をまとめると以下のとおりである。遺伝性難聴家系は26家系で69検体からDNAを抽出した。登録された症例の居住地は北海道から九州地区まで及んでいる。登録症例中、特発性難聴症例が4例、指骨癒合の合併症のある家系が1家系、Branchio-oto-renal(BOR)症候群の疑いが1家系である。

登録収集された症例の遺伝子検索で、現在既知の難聴遺伝子において変異が同定されたものは、1家系1症例でミトコンドリア遺伝子3243変異と1家系3検体でミトコンドリア遺伝子1555変異が同定された。

【考 察】

難聴の病態を解明し治療するには、現在分子遺伝学的研究は大きな位置を占めている。これらの研究には、遺伝性難聴症例の臨床データの収集と多数の

症例を対象にした分子遺伝学的解析が基本となる。現在、世界各国で競って研究が行われており、米国では、既に臨床データならびに遺伝子型のデータを収集・登録し共同利用する機構が発足し活動している。1998年12月末日の時点では、優性遺伝形式の非症候群性感音難聴では19の遺伝子座、劣性遺伝形式では21の遺伝子座、X連鎖遺伝形式では、8個の遺伝子座が同定されている。また、非症候群性感音難聴の難聴遺伝子としては、核遺伝子では12個、ミトコンドリア遺伝子は2個同定されている。わが国でも上述した各国の情勢から、全国規模での共同研究の必要性を鑑みて、平成8年度より厚生省班研究が母体となって、データの収集を行うことにした。

まず、初年度に共同研究班の構成、データの収集を如何に施行するかを検討し、以下のような組織とした。すなわち、感音難聴の遺伝子解析を目的とする組織であり、名称を非症候群性感音難聴（特発性両側性感音難聴を含む）の共同研究とする。構成は、非症候群性感音難聴（特発性両側性感音難聴を含む）の臨床的所見、遺伝子解析を研究している臨床医、研究者で、そのデータを厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班（班長 星野知之）に提供する者とする。組織への参加は任意である。また、共同研究の世話人代表は、自治医科大学耳鼻咽喉科学 喜多村 健が暫定的にあたり、事務局を自治医科大学耳鼻咽喉科学教室に暫定的に設置する。

データの収集は、非症候群性感音難聴（特発性両側性感音難聴を含む）症例の臨床データ、遺伝子型を事務局に登録した。このデータを事務局に登録する際には、各施設の症例名、症例番号などの個人の識別情報は含まず、事務局が独自に設定するIDにて登録し匿名とし、遺伝情報の漏洩がないよう

に配慮されている。また、データの収集状況は、毎年開催される班会議で発表した。

対象者から書面で得るインフォームドコンセントについては特に配慮し、日本人類遺伝学会の遺伝子診断ガイドライン作成者の指導を受けて作成した。このインフォームドコンセントの特徴は、対象者の人権擁護、危険性が皆無であること、検査拒否による不利益がないこと、守秘義務遵守（しかし、情報漏洩を皆無には出来ない可能性の指摘）、難聴以外の遺伝子検査を行わない、将来の検査のために今回の資料が保存される点とこの保存に同意するか否か、本人が死亡した際の資料保存の可否等の項目を含んでいる。また、各施設内で特定のインフォームドコンセントがあればそのインフォームドコンセントを用い、各施設内に倫理委員会が設置されているならば、この共同研究について倫理委員会の承認を得ることを明確にした。

3年間の研究期間中、本研究の呼びかけに応じて北海道から九州までの全国の広い地域から検体が自治医科大学と岡山大学に送付され登録された。具体的な症例は、遺伝性難聴家系は26家系で69検体からDNAを抽出した。登録症例中、特発性難聴症例が4例、指骨癒合の合併症のある家系が1家系、Branchio-oto-renal(BOR)症候群の疑いが1家系である。難聴遺伝子としては、ミトコンドリア1555変異が1家系、ミトコンドリア3243変異が1家系で同定された。

多くの難聴遺伝子が次々と同定され、難聴診断が従来の聴覚生理学的検査ならびに画像検査のみならず分子遺伝学的観点からの診断が具体性をおびてきている。この事態を考慮すると、難聴の診断にあたって基本的な遺伝学の知識が必要で、耳鼻咽喉科医であっても説明者が十分な遺伝学的知識・経験をもち、カウンセリングに習熟していることが望まれる。

3年間の共同研究で、多数の症例ならびにゲノムが事務局に登録され、一部の症例で難聴遺伝子変異が同定された。この研究機構により、既知の難聴遺伝子の遺伝子変異の有無、未知の難聴遺伝子解明のための今後の研究を進展させることが必要である。

[ま と め]

遺伝性難聴症例を全国的に収集・登録し、多くの症例の検索から難聴遺伝子の解明を目的に、平成8年度から全国レベルでの共同研究が開始された。本報告では、3年間の共同研究の成果について報告した。

送付先：

〒329-04 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1
自治医科大学耳鼻咽喉科学教室
喜多村 健
TEL 0285-44-2111(3542)
FAX 0285-44-5547
E-mail: kkitamura@jichi.ac.jp

X連鎖混合難聴 (DFN3) の日本人家族における POU3F4 新変異

分科会員 喜多村 健 (自治医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 萩原 秀夫・玉川 雄也 (自治医大耳鼻咽喉科)
小寺 一興 (帝京大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

アブミ骨手術に perilymphatic gusher を伴う X連鎖混合難聴 (DFN3) は転写因子 POU-domain の遺伝子 POU3F4 の変異に起因する^{1)~3)}。本研究は本邦初の DFN3 家族の遺伝子解析を行い、POU3F4 の新しいアレル変異を同定した⁴⁾。

【方 法】

当家族の一般検査ならびに耳科学的検査を施行した。また前庭機能の評価としてカロリックテストを施行した。4名が側頭骨の高分解能 CT 検査を受けた。対象者の末梢血から DNA を抽出したのち³²P でプライマー末端をラベルした PCR 産物の SSCP 解析を施行した。SSCP 変異が認められた難聴者の PCR 産物を直接シーケンスした。

【結果および考察】

発端者に高度の混合難聴を認め、CT では内耳道の遠位端と内耳の間に部分的欠損がみられた。鼓室開放術の際に perilymphatic gusher が認められた。発端者の叔父 (II-3) は幼少時より重度感音難聴であり、カロリックテストの反応低下も認められた。アブミ骨筋反射は無反応であった。CT 像では内耳道底の欠損と蝸牛軸の低形成が認められた (図1)。発端者の祖母 (I-2) には軽度の伝音難聴が認められた。祖父 (I-1) は高音域において漸傾型の感音難聴を示していた。祖父母の CT に異常を認めなかった。母親 (II-2) に難聴はなかった。祖母、母、叔父の PCR-SSCP 解析で正常者群と異なる変異が認められた (図2)。叔父の PCR 産物を用いて蛋白コード領域をシーケンスした。その結果、POU3F4 のヌクレオチド 601 から 606 までの 6 塩基 (TTCAAA) が欠失していた。in-frame の欠失にあたるためコードされる蛋白では 201, 202 番目のフェニルアラニンとリジンの欠失が推測された (図3)。

転写因子は細胞の分化、機能、増殖を DNA の特定部位に結合して制御することにより遺伝子発現を制御している⁵⁾。POU domain 遺伝子の一つ、*Brn-3c* の

欠失変異マウスでは内耳有毛細胞が欠如している⁶⁾。またヒト POU 領域には高度に保存された 2 つのドメイン、POU homeodomain と POU-specific domain があり³⁾、201, 202 番目のフェニルアラニンとリジンは POU-specific domain の helix 1 を構成する残基と推測される⁷⁾。イースト菌における in vitro 実験ではヒト Phe-201 に相当する部位が他のアミノ酸へ代替すると DNA 結合活性が野生型の 8% に減少するという報告もあり⁸⁾、こうした観点から POU3F4 の微小欠失が内耳の発達に重要な影響を及ぼしていることが示唆される。



図1 DFN3 (II-3) の側頭骨 CT 像。内耳道の拡大と内耳道底の欠損、蝸牛軸の低形成 (矢印) を認める。

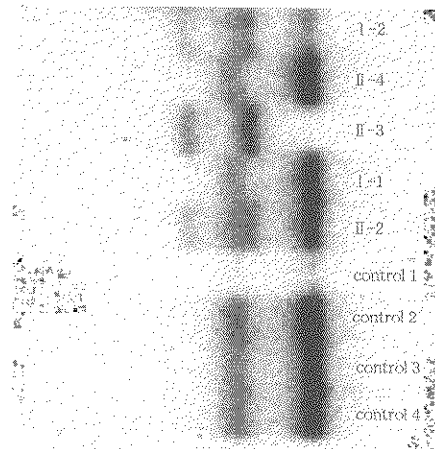


図2 PCR-SSCP 解析。I-2、II-3、II-2 に正常者と異なるバンドを認める。

| | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|
| | | Phe | Lys | | | | | | |
| | | TTC | AAA | | | | | | |
| Ala | Lys | Gln | Gln | Arg | Arg | Ile | | | |
| C | G | C | A | A | C | A | A | A | G |
| A | A | A | C | A | A | A | G | A | A |
| A | T | C | A | A | A | A | A | T | C |

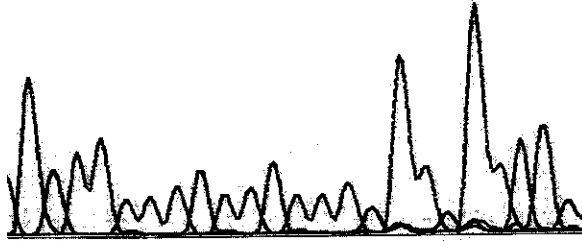


図3 PCR産物の直接シーケンス。POU3F4のヌクレオチド601-606の6塩基欠失により、アミノ酸残基フェニールアラニンとリジンが欠失することになる。

[参考文献]

- 1) de Kok YJM, van der Maarel SM, Bitner-Glindzicz M, Huber I, Monaco AP, et al: Association between X-linked mixed deafness and mutations in the POU domain gene POU3F4. *Science* 267: 685-688, 1995.
- 2) Bitner-Glindzicz M, Turnpenny P, Höglund P, Kaariainen H, Sankila EM, et al: Further mutations in *Brain 4 (POU3F4)* clarify the phenotype in the X-linked deafness, DFN3. *Hum Mol Genet* 8:1467-1469, 1995.
- 3) Friedman RA, Bykhovskaya Y, Tu G, Talbot JM, Wilson DF, et al: Molecular analysis of the POU3F4 gene in patients with clinical and radiographic evidence of X-linked mixed deafness with perilymphatic gusher. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 106: 320-325, 1997.
- 4) Hagiwara H, Tamagawa Y, Kitamura K, Kodera K: A new mutation in the POU3F4 gene in a Japanese family with X-linked mixed deafness (DFN3). *Laryngoscope* 108: 1544-1547, 1998.
- 5) Pabo CO and Sauer RT: Transcription factors: Structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053-1095, 1992.
- 6) Xiang M, Gan L, Li D, Chen ZY, Zhou L, et al: Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 9445-9450, 1997.
- 7) Klemm JD, Rould MA, Aurora R, Herr W, Pabo CO: Crystal structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77: 21-32, 1994.
- 8) Liang J, Moye-Rowley S, Maurer RA: In vivo mutational analysis of the DNA binding domain of the tissue-specific transcription factor, Pit-1. *J Biol Chem* 270: 25520-25525, 1995.

難聴の原因遺伝子に関する研究

分科会員 宇佐美 真 一 (弘前大耳鼻咽喉科)

共同研究者 阿 部 聡 子・秋 田 二 朗
南 波 淳 司・新 川 秀 一

【はじめに】

ここ数年の分子遺伝学のめざましい発展により、すでにいくつかの遺伝性難聴の原因遺伝子が特定され始めている。今後はこれらの分子遺伝学的手法を利用し難聴の正確な診断、適切な治療に結び付けていく必要がある。今回、難聴の原因遺伝子を明らかにすると共に、外来を受診する難聴患者にどの程度これらの遺伝子が関与しているかを検討した。

【対象と方法】

(1) 原因遺伝子座の特定

「前庭水管の拡大を伴った難聴」家系に関して DNA マーカー (マイクロサテライト多型) を用いた連鎖解析を行ない遺伝子座の特定を行った。

(2) 既知の遺伝子変異の特定

外来を受診する難聴患者を対象にミトコンドリア遺伝子変異、コネキシン(Cx)26 遺伝子、EYA1 遺伝子の変異を検討した。各遺伝子のエクソンの部分を特異的なプライマーにより増幅し、Heteroduplex 法または直接シーケンスすることによって遺伝子変異を検索した。

【結果および考察】

(1) 「前庭水管の拡大を伴った難聴」の原因遺伝子座の特定と PDS 遺伝子の変異の有無

近年、前庭水管の拡大 (内耳奇形の一つのタイプ) を伴った難聴症例が数多く報告されるようになり注目を集めている¹⁾ (Abe et al., 1997)。前庭水管の拡大を認めた 10 家系に対し、マイクロサテライト多型解析による連鎖解析を行い病因遺伝子座の決定を試みた結果、第 7 番染色体長腕に原因遺伝子座が存在することが明らかとなった²⁾ (Abe et al., 1999 印刷中)。この原因遺伝子座は難聴と甲状腺腫を伴う Pendred 症候群の原因遺伝子(PDS)の存在部位と同じ領域であることより、PDS が前庭水管拡大を伴った難聴の原因となっている可能性が示唆された。そこで前庭水管拡大を伴った難聴症例における PDS の変異の有無について検討した

ところ、いくつかの新しい PDS 遺伝子の変異が見出された。この疾患群は甲状腺腫を伴う Pendred 症候群とは臨床的に異なっていることより、同一の遺伝子が表現型の異なる 2 つの疾患の原因遺伝子であるという興味ある可能性が示唆された。これは遺伝子解析が疾患の概念をも変えてしまうという良い実例ではないかと思われる³⁾ (Usami et al., 1999 印刷中)。

(2) コネキシン(Cx)26 遺伝子

コネキシン(Cx)26 遺伝子はギャップ結合蛋白をコードする遺伝子として知られているが、Cx26 の変異が常染色体劣性遺伝や優性遺伝形式をとる難聴家系に見い出されて以来注目を集めている。我々の外来を受診した難聴患者に関し Cx26 の変異をスクリーニングした結果、いくつかの新らたな変異が確認された。従って Cx26 遺伝子の変異が日本人の難聴にも深く関与していることが明らかとなった。また興味あることに日本人に多く見いだされた遺伝子変異は欧米で報告されている変異と異なっており、日本人の難聴者の遺伝子解析にもとづくデータベースの重要性が明らかになった⁴⁾ (Usami et al., 投稿中)。

(3) ミトコンドリア遺伝子の変異 (1555A → G 点変異)

また我々の症例の中にミトコンドリア遺伝子の変異 (1555A → G 点変異) を持つ症例が多く見い出されたが、この変異があるとアミノ配糖体抗生物質により容易に難聴を来すことが知られている。しかし症例を詳細に検討したところ中にはアミノ配糖体投与歴が無く、いわゆる特発性難聴の形で難聴を来した症例もあり、種々の外因により難聴が引き起こされる可能性があることが明らかになった^{5,6,7,8,9)} (Usami et al., 1997, 1998ab, 1999, Abe et al., 1999)。すなわちこの遺伝子変異が内耳の易受傷性と関連している可能性が示唆された。またこの遺伝子変異を持つと副作用が少ないとされる新世代のアミノ配糖体抗生物質に対しても容易に難聴を来すことが明らかとなり注意が必要であることを報告した⁶⁾ (Usami et al., 1998)。しかしな

がらこの遺伝子変異を持つ高度難聴患者に対し人工内耳を行ったところ良好な成績が得られたことは難聴者にとって大きな福音となると思われた¹⁰⁾ (Tono et al., 1998)。この遺伝子変異を持つ患者に関しては予防が可能であることから、家族や血縁者に対しては積極的に遺伝子検査を行い、予防の必要性を強調している。現在この変異を持つ患者に対してはアミノ配糖体抗生物質に注意するよう「薬物カード」を渡している。頻度調査を行ったところこの 1555A → G 点変異は難聴患者の約 3% に見い出された⁹⁾ (Abe et al., 1999 印刷中)。またこのミトコンドリア遺伝子変異の起源を明らかにするため分子進化的検討を行った結果、この遺伝子変異は一人の先祖に由来するものではなく進化の過程で比較的最近多発的に起こったことが明らかとなった¹¹⁾ (Abe et al., 1999 印刷中)。従って、この変異はある地域に限局しているのではなく全国的に見いだされる可能性が高いことが推測された。またこの遺伝子変異の検出頻度はアミノ配糖体による難聴患者に限るとさらに高くなり私どもの症例で検討した結果、アミノ配糖体による難聴者の約 1/3 に変異が検出された。対象の患者を絞り込めばかなりの頻度でこの変異が見い出される可能性が高いと思われる。

(4) EYA1 遺伝子

難聴の原因遺伝子として同定されたいくつかの遺伝子のうち、EYA1 遺伝子は BOR 症候群の原因遺伝子として 8 番染色体に存在することが明かにされている。今回我々が経過観察している 1 家系に関して解析したところ exon7 に変異が存在することが明らかになった。本症例は日本人家系では初めての報告である¹²⁾ (Usami et al., 投稿中)。

[参考文献]

- 1) Abe S, Usami S, Shinkawa H. Three familial cases of hereditary hearing loss associated with enlargement of the vestibular aqueduct. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1997;106:1063-1069.
- 2) Abe S, Usami S, Hoover D, Cohn E, Shinkawa H, et al. Fluctuating sensorineural hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene. *Am J Med Genet.* 1999 in press.
- 3) Usami S, Abe S, Weston M, Shinkawa H, Van Camp G, et al. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet.* 1999 in press.
- 4) Usami S, Abe S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. A new connexin 26 gene (GJB2) mutational hot spot in Japanese nonsyndromic hearing loss patients, submitted.
- 5) Usami S, Abe S, Shinkawa S, Kasai M, Moeller B, et al. Genetic and clinical features of sensorineural hearing loss associated with the 1555 mitochondrial mutation. *Laryngoscope.* 1997;107:483-490.
- 6) Usami S, Abe S, Tono T, Komune S, Kimberling WJ, et al. Isepamicin sulfate-induced sensorineural hearing loss in patients with the 1555A → G mitochondrial mutation. *ORL.* 1998;60:164-169.
- 7) Usami S, Abe S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by mitochondrial DNA mutations: special reference to the A1555G mutation. *J Commun Disord.* 1998;31:423-434.
- 8) Usami S, Abe S, Akita J, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations. *Adv Otolaryngol.* 1999 in press.
- 9) Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kimberling WJ. Sensorineural hearing loss caused by the A1555G mutation in the mitochondrial DNA. In: *Hirosaki International Forum of Medical Sciences (Elsevier)* 1999 in press.
- 10) Tono T, Ushisako Y, Kiyomizu K, Usami S, Abe S, et al. Cochlear implantation in a patient with profound hearing loss with the 1555A → G mitochondrial mutation. *Am J Otol.* 1998;19:754-757.
- 11) Abe S, Usami S, Shinkawa H, Weston MD, Overbeck LD, et al. Phylogenetic analysis of mitochondrial DNA in Japanese pedigrees of sensorineural hearing loss associated with the A1555G mutation. *Eur J of Hum Genet.* 1999 in press.
- 12) Usami S, Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher K, Kimberling WJ, et al. Nonsense mutation of EYA1 in Japanese Branchio-Oto-Renal syndrome family, submitted.

難聴家系を用いた遺伝子解析による難聴原因究明の試み

難病特別研究員 福 島 邦 博 (岡山大耳鼻咽喉科)

共同研究者 西 崎 和 則・笠 井 紀 夫
菅 田 研 一・益 田 明 美
増 田 游 (岡山大耳鼻咽喉科)
植 木 靖 好 (岡山大分子医化学)

【はじめに】

我々は昨年度までの報告で、1) 最初明らかな難聴が高音部に限局して認められるが、2) 経過観察中にしばしば精神的・肉体的ストレスを契機に急性の聴力低下を来し、3) こうした急性増悪を反復しながら難聴が高度になってくる進行性難聴の病態をとる、という特徴的な臨床経過を示す一家系についての報告をしてきた。昨年度までの検討では、この家系は第2番染色体に連鎖することが示されていたため、引き続き本年度もその詳細な解析を行った。

【連鎖解析】

当初の連鎖解析の結果では、第2番染色体に連鎖が認められることが証明されたが、その後、本家系の構成員をさらに増やして検討したところ、D2S2380-D2S124-D2S2345-D2S335での multipoint linkage analysis では D2S2345 で最大の LOD スコア 4.08 ($\theta = 0$) が得られた。ハプロタイプ解析では D2S2380 から D2S335 の間、10 cM の領域に遺伝子が存在することが推定されたこの領域は細胞学的には 2q24 に相当する部位であることが推定されているが、この領域にはすでに多数のイオンチャンネルがマップされており、こうしたイオンチャンネルの一つが候補遺伝子である可能性が考えられる。また、ほぼ同じ領域に有毛細胞のチップリンクを形成する MYO1b が存在することが推定されており、マウス MYO1b に類似性を示す EST が、やはり DFNBA16 領域近傍にあることが報告されている。また、マウスで類似性のある染色体領域には fidet (fi) と呼ばれる常染色体劣性遺伝性難聴を示すマウスがマップされており、こうしたマウスが DFNA16 のモデル動物である可能性が示唆された。

現在、さらに追加の家系構成員をもちいたハプロタイプ解析では D2S354 と D2S124 の間 (距離不明)

に原因遺伝子が連鎖することが示されている。現在、我々はこの領域の物理地図を作製しているが、すでにいくつかの既知のイオンチャンネルは候補領域外に有ることが推定されている。これらの中ではナトリウムイオンチャンネルのサブユニットである SCN2A1 および SCN2A2 と、カリウムイオンチャンネルのサブユニットの一つに高い類似性を示す EST である SHGC-30444 は、少なくともこの領域に含まれる可能性が示されている。また、ヒト胎児内耳から得られた cDNA を PCR を用いた解析では、少なくとも SHGC-30444 は胎児期のヒト内耳で発現されていることが証明されている。

【考 察】

難聴の遺伝子解析は近年劇的に進歩し、新たな知見が集積されつつある。本研究班のスタートした 1996 年当時にはクローニングされた難聴の遺伝子は Cx26, MYO VIIa, POU3F4 のみであったが、1998 年 12 月現在までに、これら 3 つに加えて DIAPH1, POU4F3, PDS, TECTA, MYO15, COCH などの遺伝子が報告されている。ことに、Cx26 は欧米の常染色体劣性遺伝性難聴の原因遺伝子としては疫学的にも非常に重要な遺伝子であることが報告されており、遺伝カウンセリングに際した臨床応用も取りざたされるようになってきている。遺伝子研究がこうした新しい局面を迎えるためには、最終的な遺伝子とその遺伝子異常の同定が必要である。今後はこの領域での物理地図作製と、それに引き続き候補遺伝子・候補 EST の解析によって原因遺伝子の究明を目標としたい。また、今後は既知の遺伝子についてもその遺伝子レベルでの診断の可能性について、特に有効なスクリーニング方法の確立を目指して検討を行いたい。

難聴家系を用いた遺伝子解析による難聴遺伝子の研究

難病特別研究員 福 島 邦 博 (岡山大耳鼻咽喉科)

共同研究者 西 崎 和 則・笠 井 紀 夫
菅 田 研 一・益 田 明 美
増 田 游 (岡山大耳鼻咽喉科)
植 木 靖 好 (岡山大分子医化学)

[はじめに]

遺伝性難聴の原因には、30 - 100 の異なる遺伝子が関与しているとする報告がある。その一方でこうした遺伝性難聴を臨床症状から分類することはほとんど困難であり、結果として特定の一つの原因を有する集団を対象として研究することを著しく困難にしている。こうした研究上の問題点は、聴覚に関連した遺伝子をまず同定することによって難聴の病態生理、あるいは聴覚の生理学そのものを究明することによって克服できることが期待される。我々はこの3年間ではその最初の一步として遺伝性難聴家系においてマッピングを行い、その原因遺伝子同定を目指しているので、報告する。

[臨床症例]

最初の1年間に、我々はフィールドワークを中心に、特徴的な臨床像を示す難聴が家系性に発生している例を報告した。この家系は、1) 最初明らかな難聴が高音部に局限して認められるが、2) 経過観察中にしばしば精神的・肉体的ストレスを契機に急性の聴力低下を来し、3) 加齢に従って難聴が高度になってくる進行性難聴の病態をとる。また、4) こうした急性の聴力低下に対して、糖質コルチコイド剤を使用することにより比較的速やかに元の聴力レベルまで回復することがしばしば経験されている。

さらに、耳硬化症が家系中に多発する家系がインドにおいて発見され、その家系構成員の一部は手術的治療の適応となったため、手術的に硬化性病変を確認することができた。この耳硬化症家系を用いた同様の検討も行った。両家系とも遺伝形式は単一遺伝子による常染色体優性遺伝と考えられた。

[遺伝解析]

連鎖解析には遺伝性難聴ホームページで報告されている多型マーカーを用いて既報にある難聴遺伝子座への連鎖を否定した。その後、Research genetics 社

製 human Mapparis screening kit を用いて全ゲノムスクリーニングを行った。その結果、第2番染色体と第18番染色体で連鎖の可能性が認められたため、さらに詳細な検討を行った。

DFNA16

感音性難聴家系では当初、第2番染色体のD2S2380からD2S335の間、10 cMの領域に遺伝子が存在することが推定され、DFNA16という名称を与えられた。この領域は細胞学的には2q24に相当する部位であることが推定された。この領域には多数のイオンチャンネルがマップされており、こうしたイオンチャンネルの一つが候補遺伝子である可能性が推測される。また、ほぼ同じ領域に有毛細胞のチップリンクを形成するMYO1bが存在することが推定されており、MYO1bに類似性を示すESTが、この領域にあることが報告されている。また、マウスで類似性のある染色体領域の近傍にはfidet (fi) と呼ばれる常染色体劣性遺伝性難聴を示すマウスがマップされており、こうしたマウスがDFNA16のモデル動物である可能性が示唆された。

現在、さらに追加の家系構成員をもちいたハプロタイプ解析ではD2S354とD2S124の間(距離不明)に原因遺伝子が連鎖することが示されている。現在、我々はこの領域の物理地図を作製しているが、すでにくつかの既知のイオンチャンネルは候補領域外に有ることが推定されている。これらの中ではナトリウムイオンチャンネルのサブユニットであるSCN2A1およびSCN2A2と、カリウムイオンチャンネルのサブユニットの一つと推測されているESTであるSHGC-30444は、少なくともこの領域に含まれる可能性が示されている。また、ヒト胎児内耳から得られたcDNAをPCRを用いた解析では、少なくともSGC30444は胎児期のヒト内耳で発現されていることが証明されている。

耳硬化症

耳硬化症家系では、15番染色体長腕，FESからD15S657までの14.5cMの領域に遺伝子座が同定された。この領域には当初 aggrecan と呼ばれる軟骨の細胞外マトリックスを形成する遺伝子が存在することが予想されていた。耳硬化症ではしばしば風疹ウイルスが硬化病巣から検出されることが報告されており、また aggrecan の様な糖蛋白はしばしばウイルスレセプターとなりうることが推測されたので、この遺伝子が耳硬化症原因遺伝子の候補の一つと考えられた。この遺伝子には遺伝子内に多型性があることが報告されており、この多型を用いた連鎖解析ではこの遺伝子と耳硬化症との連鎖は否定された。従って現時点での候補遺伝子は不明である。

[その他の報告]

第一の成果は、常染色体性劣性遺伝性難聴についてその遺伝子座の数を推定した。現在までに21の常染色体劣性遺伝性難聴および19の常染色体優性遺伝性難聴の遺伝子座が推定されているが、我々は近親婚家系で同胞に難聴のある43家系171人において、当時報告のあった7つ遺伝子座について遺伝型のタイピングを行った。近親婚の結果として同胞に発生した難聴で有るため、この常染色体劣性難聴遺伝子の周囲はホモ接合体になっていると推定できる。これらの43家系について当時までに同定されていたDFNB1から7までの領域にホモ接合性が確認されたのはそれぞれ1～3家系であり、これらの平均遺伝子頻度は0.00075であった。この数字から逆に遺伝子座の数を推定すると57個の遺伝子が難聴の発生に関係していることが推定される。これはMortonらが疫学的に推定した難聴遺伝子の遺伝子座の数60とも類似しており、およそ60程度の難聴遺伝子が、少なくともこの検討で対象にした南インドでは、難聴の原因となっていることが推定された。

また、自治医科大学と共同で、遺伝性難聴登録のネットワークを作ることを提案し、多くの症例登

録・集積した。このネットワーク形成に当たり、インターネットを利用した研究内容の公表と、さらに研究支援の一環として、「遺伝性難聴ホームページ」を作成した。

[最後に]

過去3年間において、我々は1) 難聴研究にポジショナルクローニングの方法論を導入し、その発展と基盤整備に努めてきた。2) 新たな遺伝子座であるDFNA16を発見した。3) 進行性難聴の原因である耳硬化症の原因遺伝子座を同定した。などの成果を上げてきた。今後の我々の方針としては、今までに報告したこれらの遺伝子座の報告から遺伝子のクローニング、ひいては異常の同定へと進めていくことを第一義的な目標にしている。一方で、難聴の遺伝子解析は近年劇的に進歩し、新たな知見が集積されつつある。本研究班のスタートした1996年当時にはクローニングされた難聴の遺伝子はCx26, MYOVIa, POU3F4のみであったが、1998年12月現在までに、これら3つに加えてDIAPH1, POU4F3, PDS, TECTA, MYO15, COCHなどの遺伝子が報告されている。ことに、Cx26は欧米の常染色体劣性遺伝性難聴の原因遺伝子としては疫学的にも非常に重要な遺伝子であることが報告されている。これらの遺伝子異常の解析はすでに研究レベルでは十分可能になっており、その臨床応用についても十分検討可能な段階に至っている。今後こうした遺伝子レベルでの分類・診断を臨床的に役立てるためには、これらの遺伝子異常を迅速にかつ正確に抽出しうる方法を確立する必要がある。我々は現在これらの遺伝子の簡便なスクリーニング法について検討中である。また、こうした遺伝子異常が実際の臨床症例での難聴の発生にどのように関与しているかについて、特に遺伝子異常の種類と難聴の程度や側頭骨病変との比較、さらには遺伝子異常の種類と補聴器や人工内耳の効果についての比較など、実地臨床に関連した問題点についても今後詳細に検討していきたい。

音響曝露がモルモット外有毛細胞に及ぼす影響

分科会員 牧 嶋 和 見 (産業医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 藤 村 和 伸・吉 田 雅 文
森 貴 掄 (産業医大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

HubbardとMountain(1983)は砂ネズミの蝸牛中央階への通電により外耳道側で音圧が変化する現象を観察した。これは、蝸牛への交流電流の刺激により外有毛細胞が伸縮運動し、基板振動となって音響が発生したものと考えられ、電気刺激誘発音響放射 (electrically evoked otoacoustic emissions, EEOAE) などと呼称されている²⁾。EEOAEはモルモットにおいても観察され、in vivoの状態を外有毛細胞の運動能、すなわち電気機械変換についての有用な指標となるものと考えられている。

一方、音響曝露による聴覚障害のうち可逆性であるものは一過性域値上昇 (TTS) と呼ばれ、音響性聴器障害の初期段階と考えられている。こうした可逆性変化の障害部位は、これまでの実験により蝸牛外有毛細胞であることが推察されている³⁾。蝸牛外有毛細胞には運動能が存在し、基板振動を能動的に増幅させる生物学的増幅機構の役割を担っている。我々は生物学的増幅機構の解明を目的に、CM電位歪成分を指標として、音響曝露とサリチル酸塩投与の両刺激を組み合わせた場合の影響について観察してきた。その結果、両刺激の作用部位はどちらも外有毛細胞ではあるが、音響曝露の方がサリチル酸塩よりもより前段階の機構に作用している可能性を示した⁴⁾。外有毛細胞には機械電気変換と電気機械変換が存在し、サリチル酸塩は電気機械変換に作用することから、音響曝露は機械電気変換に作用して聴覚障害が発生していることが推察される。しかし、歪成分の観察では各変換機構を単独で評価することはできない。そこで今回、我々はモルモットに音響曝露を行った際の外有毛細胞運動能に与える影響を検討するため、曝露前後でEEOAEの測定を行った。

【方 法】

実験には、耳介反射良好なハートレー系白色モルモットを使用した。ネンプターの腹腔内投与により全身麻酔とし、気管切開の後に人工呼吸を行い、筋弛緩を施した。正円窓を明視下に置いた後、刺激

および記録電極となる銀ボール電極を正円窓膜上に置き、瞬間接着剤を使用して骨窓部分で固定した。蝸牛への電気刺激は、入力された信号の電圧値の変化に対応して定電流を発生させることができる交流定電流刺激装置を使用して行った²⁾。市販のシンセサイザーを外部トリガーによりバースト発振させ、これをFM変調の光信号に変換し、実験が行われるシールドルーム内に設置した交流定電流刺激装置に光ファイバーにて送信した。通電は、正円窓電極と頸筋においた電極の間で行った。発生した音響放射は、イヤーパーに設置したマイクロホンによって検出した。今回は、1, 2, 4, 6, 8kHzのサイン波刺激を15ms行い、誘発された音響放射を中央部分の8msについて高速フーリエ変換し、入力と同じ周波数の出力成分を測定した。

音響曝露は、4kHz純音で100dB SPL10分間(6匹6耳)と120dB SPL30分間(8匹8耳)について行った。音響曝露の前後でEEOAEを測定するとともに、2~10kHzのトーンピップにより誘発されるCAP域値を測定した。

【結 果】

TTSレベルである100dB SPL 10分曝露では、CAP域値は5kHzを中心とする谷形へと上昇した(図1,a)。しかし、EEOAEは曝露前後で明らかな変化を認めていない(図1,b)。曝露音圧を120dB SPLに上げて30分曝露した場合、CAP域値はさらに上昇して高音漸傾型となった(図2,a)。しかし、EEOAEは100dB SPLでの結果と同様に曝露前後で明らかな変化を認めなかった(図2,b)。

【考 察】

昨年の本報告でサリチル酸塩の投与によってEEOAEが減少することを示し、サリチル酸塩が外有毛細胞の電気機械変換を障害している可能性をin vivoの状態を確認した。これは単離外有毛細胞を使用したin vitroでの報告と一致する結果であり、EEOAEは外有毛細胞の運動能をin vivoにおいて評

価できる指標となり得ることを示している。今回の音響暴露の実験ではCAP域値がかなり上昇するような120dB SPL 30分暴露といった強い音響に対してもEEOAEはほとんど変化していない。よって、TTSレベルを超えるような音響暴露に対しても外有毛細胞の運動能はかなり保持されるものであることが分かった。外有毛細胞は蝸牛に入力された音響に対して増幅や周波数選択機能の増強といった生物学的増幅機構の役割を担っているが、このシステムは機械電気変換と電気機械変換の両者から構成され、基板振動に対してフィードバックループを形成している⁵⁾。CM電位歪成分が低下することより音響暴露の障害部位は外有毛細胞であることが示されているが^{3) 4)}、電気機械変換は音響に対してかなり強靱であった今回の結果をふまえると、音響暴露の作用部位はPatuzziら⁶⁾も示唆しているように機械電気変換に存在することが推察された。

[参考文献]

1) Hubbard AE, Mountain DC: Alternating current

delivered into the scala media alters sound pressure at the eardrum. *Science* 222:510-2, 1983.

2) 吉田雅文, 藤村和伸, 牧嶋和見: 電気刺激により誘発される耳音響放射. *日耳鼻* 100:1459-64, 1997.
 3) Yoshida M, Aoyagi M, Makishima K: Effects of acoustic overstimulation on 2f1-f2 distortion product in the cochlear microphonics. *Hear Res* 82:59-64, 1995.
 4) Aoyagi M, Yoshida M, Makishima K: Different effects of noise and salicylate and their interactions on the guinea pig cochlea. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 253:429-34, 1996.
 5) Mountain DC: Electromechanical properties of hair cells. In: RA Altschuler, DW Hoffman and RP Bobbin (Eds.), *Neurobiology of Hearing: The Cochlea*. Raven Press, New York, pp.77-90.
 6) Patuzzi RB, Yates GK, Johnstone BM: Changes in cochlear microphonic and neural sensitivity produced by acoustic trauma. *Hear Res* 39:189-202, 1989.

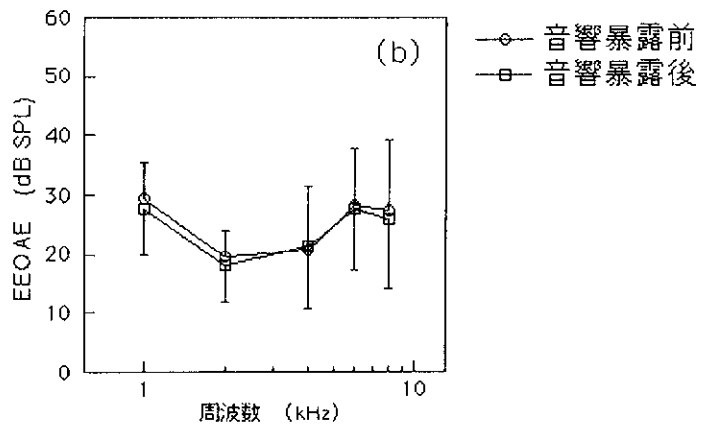
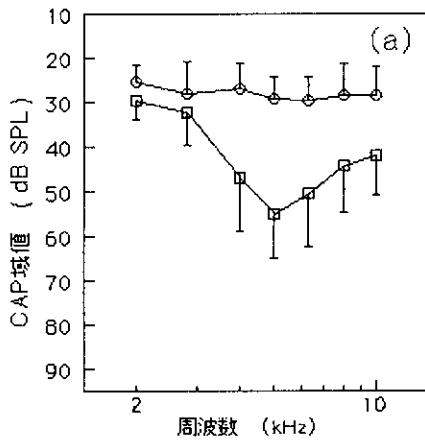


図1 100dB SPL10分(4kHz)音響暴露 (a) CAP域値 (b) EEOAE

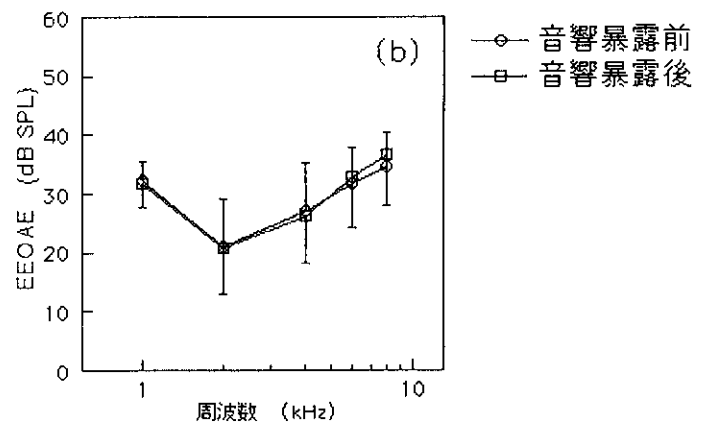
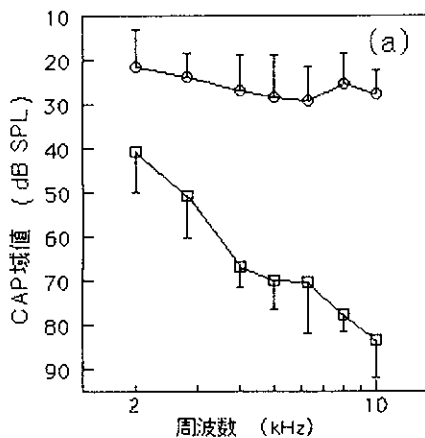


図2 120dB SPL30分(4kHz)音響暴露 (a) CAP域値 (b) EEOAE

頭部打撲外傷による聴覚障害の成因に関する研究

分科会員 牧 嶋 和 見 (産業医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 得 居 直 公・吉 田 雅 文 (産業医大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

急性高度難聴を来す原因の一つとして外傷による難聴について着目し、音響暴露などによるいわば気導外傷、また頭部打撲などによる骨導外傷についての研究を進めてきた。後者の頭部打撲外傷による聴覚障害については、過去にも多くの種々の報告があるが、その成因については、未だ不明な点も多い。我々は、頭部打撃負荷による聴覚障害の成り立ちを解明するため、実験動物に対して正確に且つ様々な強度と方向の頭部打撃負荷が可能な頭部打撃装置を作製した。本研究では、この装置を用いて頭部打撃負荷を行い、頭部打撲外傷の実験動物モデルを作成し、その動物の内耳より脳に到る聴覚伝導路における病態を電気生理学的ならびに形態学的に検討した。

【方 法】

実験には耳介反射良好な白色モルモットを使用した。頭部打撃負荷には、作製した頭部打撃装置を使用した。実験動物を十分に全身麻酔後、後頭部打撃と右側頭部打撃をそれぞれ行った。各打撃ともに、頭部打撃装置の振り子の持ち上げ角度は60度とし、振り子本体1.93kgに加え、重りのおもさを、1kg, 3kg, 5kgに設定し、理論上、それぞれ1.47, 2.47, 3.47kg-mのエネルギー量で負荷を与え実験群とし、一方頭部打撃負荷を行わなかった動物を対照群とした。その後、対照群と各打撃後1日目群の動物に対してABRの測定を行った。ABRの測定には、動物を全身麻酔して、頭部に電極を固定後、動物固定器の右ear barを介し、クリックを刺激音として、その反応を128回平均加算して記録した。尚、側頭部打撃後には左側からの刺激入力による反応も記録した。また、対照群と各打撃後群の動物につき、病理組織標本作製を行い病理組織学的な検索をした。動物を10%ホルマリン液にて灌流固定して断頭後、内耳から脳までを一塊として摘出し、脱灰、脱水の後、包埋して薄切を行い、軸索と神経原線維の染色にはBodian-石川変法を、また髄鞘の染色にはクリューパーバレラ法を用いて標本を鏡検した。

【結 果】

まず、ABRの結果としては打撃負荷時の重りの重量をそれぞれ1kgと3kgとした時の各打撃後群の動物には、対照群の動物と比べて、ABR上明らかな閾値の上昇や潜時の延長を認めなかった。また、重りを5kgとした時の側頭部打撃後の動物には、対照群の動物と比べ明かな変化は認められなかった一方後頭部打撃後には、多くの動物においてABR IV波の振幅が低下する傾向が認められた。このことより、重りを5kgとした時の後頭部打撃後群のABR各波の潜時を、対照群と比較すると、後頭部打撃群のI波からIV波の潜時は対照群と大差ないものの、V波には明かな潜時の延長が認められた。また、重りを5kgとした時の各打撃群のIII-V波間潜時の平均値を対照群と比較すると、側頭部打撃後群には明らかな潜時の延長を認めなかったが、後頭部打撃後群ではIII-V波間の潜時に延長が認められた(図1)。更に、形態学的な検索では、重りを5kgとした時の後頭部打撃後群には、聴神経と聴覚路ニューロンの軸索と神経原線維には著変を認めなかったが、一方で髄鞘の染色では、蝸牛神経核付近の第VIII脳神経において染色が粗になり、髄鞘の断裂や崩壊を示唆する所見のみられる例が存在した。

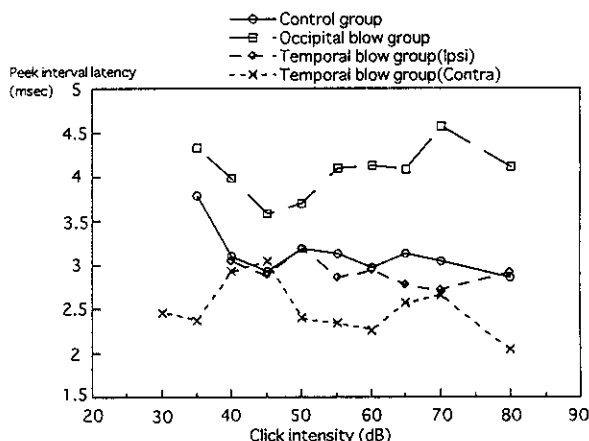


図1 III-V波間潜時

頭部打撃群と対照群とのABR III-V波間潜時の平均値の比較。対照群に比して、側頭部打撃群には明らかなABR潜時の延長を認めなかったが、後頭部打撃群では、ABR潜時に延長が認められた。

[考 察]

平成8年度の報告では、ABR検査にてIV波の振幅が後頭部打撃後にのみ低下する傾向を認めたことより、後頭部打撃負荷によって脳幹部に何らかの病変が存在する可能性を考え、それ以降の研究においては、ABR検査にて後頭部打撃後にのみIV波の振幅が低下する傾向を認めることに加え、V波の潜時の延長、特にⅢ-V波間の潜時の延長が認められ、形態学的な検索でも第Ⅷ脳神経および脳幹部に病変が存在する動物例を認めた。これまでの諸家の報告によれば、ABR IV波はオリブ複合体から外側毛体腹側部を破壊したときに変化し^{1)~4)}、V波は下丘中心核の外腹側部の破壊により変化することが知られている^{4) 5)}。これらの部位が、その形成に重要な役割を果たすことは確かであるが、下丘へは外側毛体核や両側の外側上オリブ核、同側の内側上オリブ核、対側の蝸牛神経核など、多くの核から直接に投射線維が走っており、これらがIV波、V波の形成に関与することも種々の研究によって確認されている^{6) 7)}。このように動物のABR IV波とV波は、その形成の起源が複雑で、その発電体の存在部位を明瞭に示すことが難しい反応であるが、これら諸家の報告と考え併せても、本研究における後頭部打撃後のABRの結果より考えられる病変部位と病理組織学的な病変の存在部位はほぼ矛盾しない結果となっていた。以上の結果は、頭部打撲外傷後、特に後頭部打撲外傷後に、必ずしも内耳に異常が存在しなくとも、脳幹部聴覚路に生じた異常により、何らかの聴覚路の伝導障害が惹起される可能性があることを示唆するものであると考えられる。

現在、その発現のメカニズムを解明すると共に、この聴覚路の異常の呈する臨床的意義や、その聴覚障害が可逆性であるのか非可逆性であるのか、経時的な変化についても検討を進めている。

[参考文献]

- 1) Achor, L. J. and Starr, A.: Auditory Brain stem responses in the cat. I. Intracranial and extracranial recordings. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 48:154-173, 1980.
- 2) Achor, L. J. and Starr, A.: Auditory Brain stem responses in the cat. II. Effect of lesions. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 48:174-190, 1980.
- 3) Buchwald, J. S. and Huang, C. M.: Far field acoustic response: Origins in the cat. *Science*, 189:382-384, 1975.
- 4) Wada, S. and Starr, A.: Generation of auditory brain stem response (ABRs). III. Effect of lesions of the superior olive, lateral lemniscus and inferior colliculus on the guinea pig. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 56:352-366, 1983.
- 5) Henry, K. R.: Auditory brainstem volume-conducted responses. *J Am Aud Soc*, 4:173-178, 1979.
- 6) Osen, K. K.: Projection of the cochlear nuclei on the inferior colliculus in the cat. *J Comp Neurol*, 144:355-372, 1972.
- 7) Beyerl, B. D.: Afferent projections to the central nucleus of the inferior colliculus in the rat. *Brain Res*, 145:209-223, 1978.
- 8) Makisima, K. et al.: Effect of head blow on the development of hearing loss. *The Laryngoscope*, 86:971-978, 1976.
- 9) Makisima, K. et al.: Electrophysiological responses from the cochlear and inferior colliculus in guinea pigs after head injury. *The Laryngoscope*, 85:1947-1956, 1975.
- 10) Makisima, K. et al.: Histopathologic correlates of otoneurologic manifestations following head trauma. *The Laryngoscope*, 86:1303-1314, 1976.

耳毒性薬剤投与によるモルモット急性高度難聴モデルの内耳グルタミン酸動態

分科会員 東野 哲也 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 松田 圭二・小宗 静男
春田 厚・山崎 正幸 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

グルタミン酸 (GLU) は蝸牛では求心性神経伝達物質として最も有力視されている。しかし、過剰な細胞外 GLU は神経細胞に傷害性に働くこともまた知られている。現在、少なくとも虚血や強大音負荷においては、GLU のこのような働きが病態を修飾していることが推測されている¹⁾。しかし、その他の原因による急性高度難聴発症の過程で、GLU がどのような働きを演じているかについてはいまだ十分検討されていない。

そこで今回、我々は有毛細胞傷害を短時間に生じさせるカナマイシン(KM)・エタクリン酸(EA)同時投与モデルを使って、投与前後のモルモット外リンパ液 GLU の変化を微小透析法にて検討したので報告する。

[対象と方法]

体重 250-400 g の Hartly 系モルモット 36 匹を使用した。まず KM (800mg/kg, sc.) または同量の生食を皮下投与、3 時間後に EA (40 mg/kg, iv.) または同量の生食を静脈内投与した。薬剤の組み合わせにより以下の 4 群に分けた。1 群 (コントロール) : 生食皮下注後生食静注 (n=6), 2 群 : KM (800mg/kg.) 皮下注 3 時間後に生食静注 (n=6), 3 群 : 生食皮下注 3 時間後に EA (40 mg/kg) 静注 (n=6), 4 群 : KM (800mg/kg) 皮下注 3 時間後に EA (40 mg/kg) 筋注 (n=6)。EA または生食投与後 4 時間、微小透析法によるグルタミン酸濃度の連続測定を行った。終了後、蝸牛を 10%ホルマリンで灌流固定した後、パラフィン包埋による光顕標本とした。

[結 果]

鼓室階 GLU 濃度基礎値は 7.27 ± 1.46 (mean \pm S.D. n=24) であった。両薬剤投与群 (4 群) では、EA 投与約 2 時間頃から GLU 濃度が急激に上昇し検出上限値である $82 \mu\text{M}$ に達した。観察時間以内に回復傾向は認めなかった。一方、コントロールの 1 群や各薬剤単独投与群 (2, 3 群) ではグルタミン酸上昇は

認められなかった。組織学的検討では、1, 2 群に形態変化はなく、3, 4 群に血管条の膨化所見を認めた。外有毛細胞の崩壊所見は 4 群にのみ観察された。

[考 察]

KM と EA 同時投与モデルを用いた West ら²⁾ の電気生理学的研究により、薬剤投与後の蝸牛マイクロフォン電位 (CM) の変化が記録されている。それによると両薬剤投与後、CM は 2 相性の変化を示す。すなわち EA 投与 10 分後にピークを示す一過性の閾値上昇と投与約 2 時間後に出現する永続的閾値上昇である。前者は EA 単独投与時にもみられ、EA の血管条傷害作用の結果と考えられる。後者は永続的な CM 障害であり、組織所見からみても外有毛細胞傷害に基づいた変化であることは間違いないと思われる。

我々の観察した大量の GLU 放出時期が、West ら²⁾ の観察した第 2 相である永続的 CM 消失時期によく一致したのは、この二つの機序が密接に関連していることを示唆している。外リンパ GLU の起源としては、外有毛細胞の崩壊による GLU 放出とともに、細胞内カリウムの流出による支持細胞内 GLU トランスポーターの逆転機序や内毛細胞の脱分極による GLU 放出も関わっていることが想定される。

GLU とそのアゴニストの鼓室階灌流実験では、大量の外リンパ GLU が蝸牛機能を障害することが証明されている^{3,4,5)}。一方、様々な原因 (耳障害薬物、騒音、加齢、虚血など) でコルチ器が傷害されると、二次的ならせん神経節細胞の消失が観察され、その傷害パターンは原因によらず似かよっていることが知られている^{6,7)}。このような二次性の神経傷害は GLU アゴニストの鼓室階灌流後の変化と酷似している。現在、少なくとも強大音や虚血後にみられるならせん神経節細胞障害については、GLU の神経細胞毒性による機序が最も有力視されている¹⁾。耳毒性薬物による有毛細胞傷害の過程で GLU が放出されることを直接証明したのは本研究が最初である。これは、耳毒性薬物投与後に起こる二次性神経傷害の機序に GLU が関与していることを示唆する重要な所見であ

る。

[参考文献]

- 1) Eybalin M: Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 1993;73:309-373.
- 2) West BA, Brummett RE, Himes DL: Interaction of kanamycin and ethacrynic acid. *Arch Otolaryngol* 1973;98:32-37.
- 3) Bobbitt RP, Thompson MH: Effects of putative transmitters on afferent cochlear transmissions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1978;87:185-190.
- 4) Klinke R, Oertel W: Amino-acids-putative afferent transmitter in the cochlea. *Exp Brain Res* 1977;30:145-148.
- 5) Kusakari J, Arakawa E, Rokugo M, et al: Effect of kainic acid upon NI latency. *Laryngoscope* 1984;94:1365-1369.
- 6) Spöndlin H: Factors inducing retrograde degeneration of the cochlear nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984;93:76-81.
- 7) Webster M, Webster DB: Spiral ganglion neuron loss following organ of Corti loss: A quantitative study. *Brain Res* 1981;212:17-30.

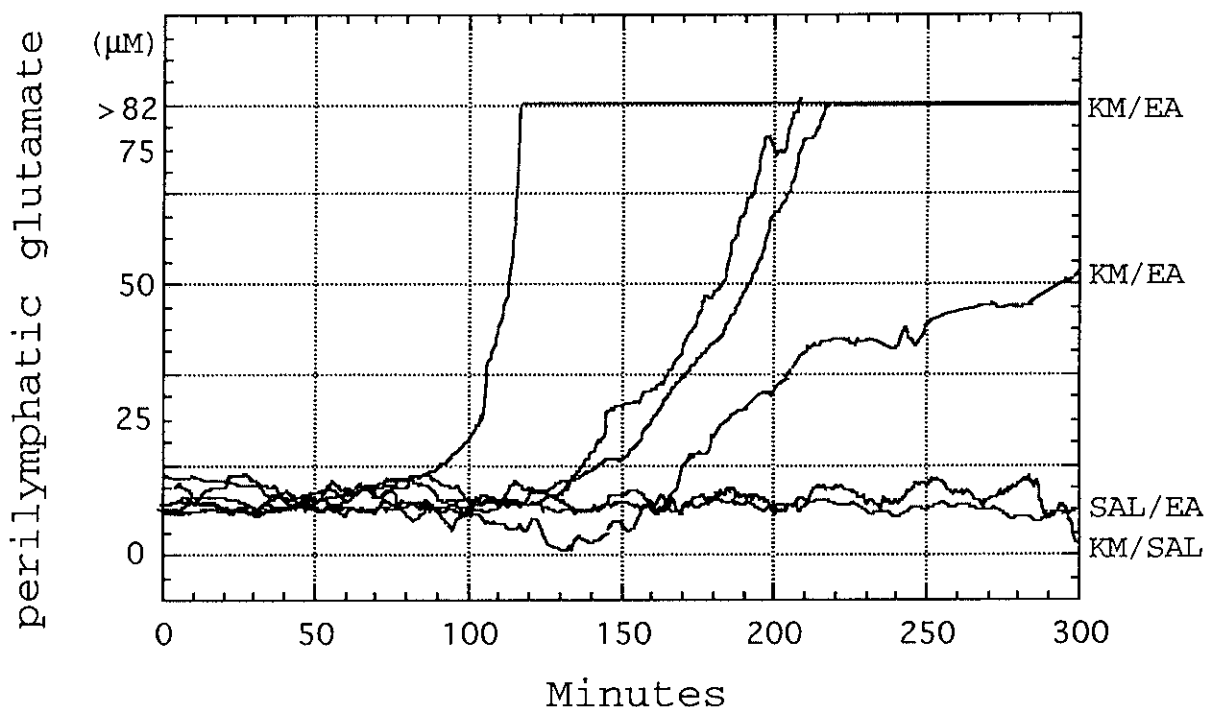


図1. 薬剤投与後の鼓室階グルタミン酸濃度の変化 (典型例)。エタクリン酸(EA)または生食(SAL)を投与した時刻を0とした。EA とカナマイシン(KM)2 剤投与群(KM/EM)で約2時間後よりグルタミン酸の上昇を認めた。3例は検出上限値の $82 \mu\text{M}$ を超えた。各薬剤単独投与 (SAL/EA, KM/SAL)ではグルタミン酸濃度変化はなかった。