

レラトキシンBサブユニット, 抗コレラトキシン-ウサギ抗体, さらにビオチン化ウサギ抗体を反応させた。ECLにより蛍光発色させたところ, GM1は3~5 pgまで検出することが可能であった(図1)。

2) 各試料におけるGM1の検出

外リンパ, 唾液, 血清, 滲出性中耳炎症例の中耳貯留液の各検体1 mlから, GM1を有機溶媒を用いて抽出したのち, 上記の方法で検出したところ, いずれにおいてもECLにて反応が認められた(図2)。

[考 察]

昭和61年および平成3年度の急性高度難聴調査研究班において, 岩森, 野村らは, ヒト髄液中のガングリオシドの検出について報告している^{1, 2)}。この報告の中で, 特にGM1は血液, 唾液中に認められないこと, コレラ毒素との親和性が高いことからヒト

髄液のマーカーとして優れていることが結論されている。従って, もしヒト外リンパ中にも同程度のGM1が存在するとすれば, 外リンパ腫の診断にも応用可能であると考えられる。そこで, 今回我々は, 経迷路法により聴神経腫瘍を摘出した症例から外リンパを採取し, GM1の検出が可能であるか否かについて検討した。

まず, GM1の検出閾値の確認を試みたところ, 本研究で用いた方法では3~5 pgのGM1の検出が可能であった。Trbojevic-Cepeらの報告³⁾によれば, ヒト髄液中1 lには約700から800 μ gのガングリオシドが含まれており, その3~4%がGM1であるとされている。従って, 髄液1 l中のGM1の量は約21~32pgであるから, 有機溶媒による抽出率が50~60%としても0.3~1.0 l程度の髄液の検出が可能であると考えられた。したがって, 外リンパ中のGM1の

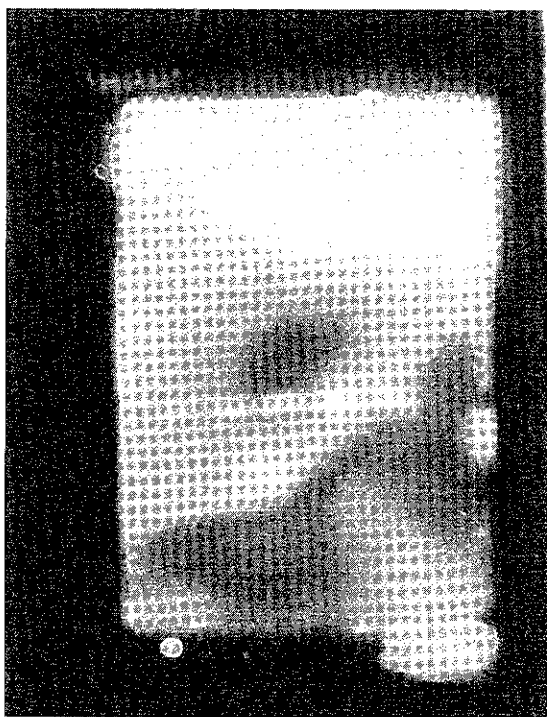


図1 薄層クロマトグラムによるGM1の検出

薄層クロマトに牛の脳から抽出したGM1を各々3pg, 5pg, 10pg, 20pg, 50pgスポットし, クロロホルム/メタノール/水(0.2% CaCl₂) = 55/45/10で展開後, コレラトキシンBサブユニット, 抗コレラトキシン-ウサギ抗体, さらにビオチン化ウサギ抗体を順次反応させて, ABC法によりGM1の検出を行った。3pg(左端)まで検出可能であった。



図2 薄層クロマトグラムによる外リンパ, 唾液, 血清, 滲出性中耳炎の中耳貯留液の各検体1 mlからのGM1の検出

資料は左から, 外リンパ, 唾液, 血清, 滲出性中耳炎の中耳貯留液, 髄液に50pgのGM1を加えたものである。いずれも, 上記と同様の反応により, 反応が得られた。

含有量が髄液と同程度であるとすれば、外リンパ瘻の診断に十分使用できると思われた。

そこで、髄液以外の外リンパを含めた検体について、同様の検出を行ったところ、外リンパ、血清、滲出性中耳炎の中耳貯留液、唾液のいずれの検体からもGM1が検出された。従って、本研究で用いた検出法では、試験的鼓膜開放術の時に認められた検体が、外リンパであるのか血清もしくは滲出液であるのかを鑑別することは困難であると考えられた。この原因として、1) 本研究に用いた検出法の感度が、岩森らの方法に比較して感度がより高いこと、2) そのため、多くの操作によって、非特異的な反応が生じた可能性があること、3) 微量の糖脂質の抽出法に問題があることなどの可能性が考えられることから、今後これらの操作、手順について、さらに検討を重ねる予定である。

[結 論]

今回の検討では、髄液、外リンパ、血清、滲出性中耳炎の中耳貯留液、唾液のいずれの検体からもGM1が検出された。この結果からは、現在の方法では外リンパ中にGM1の存在を検出できても、外リンパ瘻の診断には利用できないということになる。しかしながら、今回の研究で検出された髄液中のGM1の検出量が、既存の報告に比較して多いことから、検体からのGM1の抽出法や検出方法などについて、今後さらに検討することが必要であると思われた。

[参考文献]

- 1) 岩森正男, 永井克孝, 林田哲郎, 野村恭也: 厚生省突発性難聴調査研究班 昭和61年度報告書, pp125-128
- 2) 岩森正男, 永井克孝, 田山二郎, 野村恭也: 厚生省急性高度難聴調査研究班 平成3年度報告書, pp83-85
- 3) Trbojevic-Cepe M and Kracun I: Detection of gangliosides in human cerebrospinal fluid by high-performance thin-layer chromatography and direct densitometry. J Clin Chem Clin Biochem 28: 863-72, 1990.

[研究発表]

- 〈論文発表〉
なし
- 〈学会発表〉
なし

[知的所有権の取得]

- 〈特許取得〉
なし
- 〈実用新案取得〉
なし
- 〈その他〉
なし

MPO-ANCA 陽性を示した自己免疫性感音難聴症例

分科会員 福田 諭 (北海道大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 中丸 裕爾・間口 四郎
(北海道大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

原因不明の両側性感音難聴の病因として内耳に対する自己免疫反応が関与しているのではないかという考えは古くから報告されており、多くの施設で自己抗体の検索が進められている。今回、難聴を主訴としステロイド投与により変動する両側の急性感音難聴症例を経験した。この症例において抗好中球細胞質抗体の一つであるMPO-ANCA (myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody) が陽性であり、経過、検査結果などから自己免疫性感音難聴と考えられ、MPO-ANCAによる血管炎が発症の要因となっていると考えられた。

【研究目的】

原因不明の両側性感音難聴の病因として内耳に対する自己免疫反応が関与しているのではないかという考えは古くから報告されており、多くの施設で自己抗体の検索が進められている。しかしながら現在までその自己抗体の本体は不明であり、適当な検査方法も発見されていない。今回難聴を主訴としステロイド投与により変動する良性の急性感音難聴症例を経験した。この症例においてMPO-ANCAを測定し発症との関連を検討する。

【研究方法】

本症例において免疫グロブリン、補体、抗核抗体、リウマチ因子などの免疫学的検査を施行した。また、MPO-ANCA値の変動を計時的に比較、聴力の変動、ステロイドの投与時期などと比較し検討した。

【倫理面への配慮】

対象患者には、MPO-ANCA測定の実施の必要性を十分に説明の上測定をおこなった。

【研究結果】

聴力検査では変動する両側の感音難聴をみとめた。

フレンツェル眼鏡下に右向きの水平性眼振を認めた。血液学的検査では白血球の軽度増加以外は貧血等は認めず、肝機能、腎機能、尿所見は正常。梅毒検査も陰性であった。抗核抗体、リウマチ因子陰性であったが、補体値が低下していた。間接蛍光抗体法で、好中球の核の周囲に蛍光を発する典型的なpANCAの所見あり。ELISAによる測定ではMPO-ANCA74 units (正常は10 units以下)と陽性を示した。ステロイドによる治療などでMPO-ANCAは低下しこれに伴い右聴力は改善を示したが、左耳の聴力はほとんど回復していない。現在ステロイド減量しながら経過観察中である。

【考 察】

MPO-ANCAによる疾患の本体は血管炎であり、腎臓、肺などが侵されることが多い¹⁾。自己免疫性感音難聴症例においてまだMPO-ANCAが問題にされたことはないが、本疾患の一部はMPO-ANCAに関連した疾患である可能性が推測された。

【結 論】

MPO-ANCAが陽性であった自己免疫性感音難聴症例を経験した。

【参考文献】

- 1) Csernok, E., Muller, A., Gross, WL.: Immunopathology of ANCA-Associated vasculitis. Internal Medicine 38 : 759-765, 1999.

【研究発表】

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

第9回 耳科学会総会

[知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

当科におけるムンプス難聴例の検討

分科会員 福田 諭 (北海道大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 千田 英二・黒田 努
犬山 征夫 (北海道大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

当科におけるムンプス難聴11症例の聴力は高度難聴あるいは聾で治療効果はなかった。また両耳難聴症例を2例認めた。ムンプス難聴が予後不良で稀に両側性のこともあり、その対処方法は唯一ワクチン接種による予防のみであるという情報を広く公開し、予防接種の啓蒙が必要である。

【研究目的】

ムンプス難聴の予後は一般的に悪いといわれているが、有効な治療法はなく予防だけが唯一の対処法である。しかしながら、予防接種法の改正に伴うワクチン接種率の低下とこれに伴う有病率の上昇により難聴の頻度の増加が懸念される。当科におけるムンプス難聴11症例について検討を行い、予防医学的見地からの難聴の予防について考察する。

【研究対象】

1994年から1999年までに当科を初診し、ムンプス難聴と診断された11例を対象とした。

【研究結果】

厚生省特定疾患急性高度難聴研究班により定められたムンプス難聴診断基準(昭和62年度改訂)による判定では、対象とした11例の内訳は確実例7例、準確実例3例、参考例1例であった。患側は右耳7例、左耳2例、両耳2例で、性別は男性5例、女性6例、年齢は0～9歳が5例、10～19歳が1例、20～29歳が1例、30～39歳が4例であった。また、流行性耳下腺炎の顕性感染が7例、不顕性感染が4例であった。難聴に対して治療を行った症例は8例であったが、いずれも予後は不良であった。標準純音聴力検査が可能であった9例9耳の最終受診時の重ね合わせオージオグラムを図1に示す。9耳中6耳が全周波数でスケールアウトの聾であった。なお、標準純音聴力検査が不可能であった2例はいずれも

両耳難聴症例で、両耳とも聴性脳幹反応で無反応であった。2症例について経過を供覧する。

症例1：1歳8ヶ月、男児

主訴：両難聴

現病歴：4ヶ月検診で難聴を疑われたため、近くの総合病院耳鼻咽喉科を受診し、ABR検査を受け正常反応であったため両耳正常聴力と診断された。その後、成長とともに「ママ」、「アンパンマン」などの単語を発語していた。1999年8月頃より、音への反応が悪いことに両親が気づき、同じ耳鼻咽喉科で再ABR検査を受けたところ、両耳とも無反応であったため当科へ紹介となる。

既往歴：ムンプス顕性感染なし、ムンプスウイルスの予防接種を受けていない。

家族歴：1999年7月に兄が流行性耳下腺炎に罹患。
経過：ABRにて両耳無反応。ムンプスウイルスIgM抗体およびIgG抗体ともに陽性にて、両側ムンプス難聴(準確実例)と診断した。両親が人工内耳埋め込み術を希望しており、現在補聴器の装用効果を観察中である。

症例2：4歳、男児

主訴：左難聴

現病歴：1999年1月6日に嘔吐・眩暈を生じ、近くの総合病院小児科で治療を受ける。1999年1月14日に左難聴を訴える。近くの耳鼻咽喉科で両側滲出性中耳炎と診断され、右鼓膜切開を受けた。その後、1999年3月に同じ耳鼻咽喉科で左耳の高度難聴を指摘され治らないと告げられたため、別の耳鼻咽喉科を受診。同様に治らないと言われたため1999年3月17日に当科を初診した。

既往歴：ムンプス顕性感染なし、ムンプスウイルスの予防接種を受けていない。

経過：標準純音聴力検査で左耳聾。1999年1月に周囲で流行性耳下腺炎が流行していたとのことで、

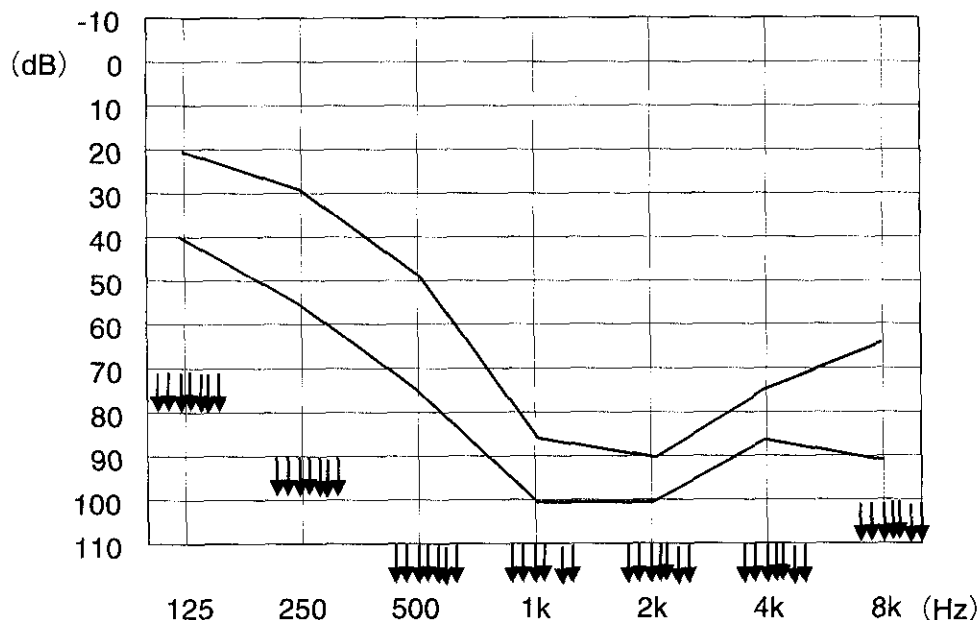


図1 重ね合わせオーディオグラム。純音聴力検査：9例9耳中，6耳全周波数スケールアウト

ムンプスウイルス抗体を測定した。その結果はIgM抗体およびIgG抗体がともに陽性であったため，左ムンプス難聴（準確実例）と診断した。発症後2ヶ月を経過していると考えられたため治療は行わなかった。

【考 察】

ムンプス難聴の聴力は高度難聴や聾が多いとされているが今回検討した11例においても同様であった。また，発症1ヶ月以内の症例では突発性難聴に準じた治療を行ったが聴力の改善は得られなかった。流行性耳下腺炎の30～40%は不顕性感染で，また合併症として15000人～20000人に1人の頻度で一側性感音難聴を生じ稀に両側性難聴を生じるとされているが，両耳難聴の症例1は1歳5ヶ月頃の不顕性感染と考えられる。両耳高度難聴のため，人工内耳埋め込み術を予定している。症例2も不顕性感染例であり，当科を受診する前まではムンプス難聴と診断されていなかった。このように不顕性感染で幼少例の一側性難聴の場合は原因が不明と診断される可能性が高いと思われるが，ムンプスウイルスIgM抗体は診断に有用であり，幼小児の感音難聴症例では積極的に調べることが必要である。また一側性難聴の場合，将来的に遅発性内リンパ水腫を発症することもあり，一側性であるからといって見逃すことはできず，発症後の治療がほとんど期待できないことより予防をすべきと考える。Darinはスエーデンのイエテボリでの就学前小児の1970年代と1980年代の

難聴発生率を比較検討しているが，1982年に導入された予防接種によってムンプス難聴は10例から0例になったと報告している。また，Unalは不顕性感染の4歳女児の両側ムンプス難聴症例を報告し，その主たる治療はワクチン接種による予防であるとして，トルコでMMRワクチン接種が導入されると結んでいる。

【結 論】

ムンプス難聴の聴力予後は不良であり，両耳症例も存在する。ムンプス難聴への対処方法は唯一予防接種のみであることの親への啓蒙が重要である。

【参考文献】

- 1) Darin, N., Hanner, P., Thiringer, K.: Changes in prevalence, aetiology, age at detection, and associated disabilities in preschool children with hearing impairment born in Goteborg. *Developmental Medicine & Child Neurology*. 39: 797-802, 1997.
- 2) Unal, M., Katircioglu, S., Karatay, M. C., Suoglu, Y., Erdamar, B., Aslan, I.: Sudden total bilateral deafness due to asymptomatic mumps infection. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngology*. 45: 167-169, 1998.
- 3) 古賀慶次郎：ムンプス難聴。JOHNS. 6: 65-69, 1990.
- 4) 上田範子，荒牧元：ムンプス。JOHNS. 15: 1856-1860, 1990.

[論文発表]

〈論文発表〉

福田 諭：ムンプス難聴と予防接種.

日本耳鼻咽喉科学会専門医通信. 60: 4 - 5, 1999.

〈学会発表〉

第 100 回 日本耳鼻咽喉科学会総会

[知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

EYA-1 の mutation が同定された Branchio-Oto syndrome の一家系

分科会員 福田

諭 (北海道大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 黒田
上 埜 理
宇佐美 真
阿 部 聡
喜多村

努・千田 英二

恵・犬山 征夫 (北海道大学耳鼻咽喉科)

一 (信州大学耳鼻咽喉科)

子・南場 淳司 (弘前大学耳鼻咽喉科)

健 (東京医科歯科大耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

Branchio-Oto syndrome (BO syndrome) は先天性耳瘻孔, 側頸瘻 (嚢胞), 難聴 (感音性, 伝音性, 混合性) 等を合併し, Branchio-Oto-Renal syndrome (BOR syndrome) と同様に常染色体優生遺伝を示すことが知られている。近年, その原因として, 第 8 染色体の EYA-1 遺伝子の mutation が注目されているが, 本症例において遺伝子解析により, その mutation が証明された。本邦における報告は 1999 年の宇佐美らの 1 例のみで, 本症例が 2 例目である。今後, さらに症例数を重ねることで, その病因が解明されることが期待される。

【研究目的】

近年, 分子遺伝学の発展により, 遺伝性難聴の患者の遺伝子変異が同定されてきている。BO syndrome, BOR syndrome においては, 1997 年に Abdelhak らが第 8 染色体の EYA-1 遺伝子の mutation を初めて報告して以来, 原因遺伝子としての注目を集めている。今回我々は 4 代に渡り, 先天性耳瘻孔, 側頸瘻 (嚢胞), 難聴を認めた BO syndrome の家系の患者に対し, 遺伝子学的解析を用いて, 遺伝子変異の有無を調査した。

【研究方法】

当科を受診し, 血液検体を採取し得た 5 人について検査を施行した。EYA-1 の 16 個の exon それぞれを PCR にて増幅し蛍光プライマーを用いたシーケンス法で塩基配列を同定した。

【倫理面への配慮】

日本人類遺伝学会による遺伝性疾患の遺伝子診断に関するガイドラインに基づき, 患者とその家族へ十分なインフォームドコンセントを行い, 同意を得た上で検査を施行した。

【研究結果】

先天性耳瘻孔, 側頸瘻 (嚢胞), 難聴はいずれの患者においても認められたが, 腎疾患, 形態異常については検査を施行し得た 1 名には認められなかった。遺伝子変異は 3 人で EYA-1 の exon 8 の 264 番目のコドンが Arg をコードする CGA から TGA に変異しているのが認められた。(二人は現在検索中)

【考 察】

変異の起こった部分で TGA は stop codon となるため, そこで蛋白の合成が中止され, 不完全な EYA-1 蛋白が産生されることが原因と考えられた。同一家系内でも異なる表現型のあることが知られているが, 本症例ではほぼすべて同様であった。

【結 論】

家族性に BO syndrome を呈した患者 5 人のうち 3 人に EYA-1 遺伝子の変異が認められた。BO syndrome の原因遺伝子としての関与が考えられるが, 症例を増やしての更なる検証を進めたい。

【参考文献】

- 1) Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, et al.: Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1. Hum Mol Genet 6: 2247-2255, 1997.
- 2) Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, et al.: A human homologue of the Drosophila eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. Nat Genet 15: 157-164, 1997.
- 3) Kumar S, Deffenbacher K, Cremers CW, Van Camp G, Kimberling WJ: Branchio-oto-renal syndrome: iden-

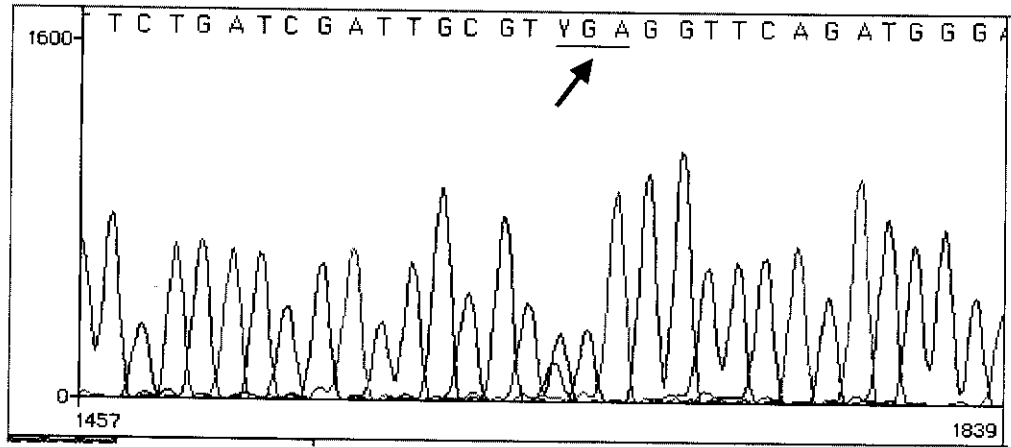


図1 EXON8の264番目のコドンがArgをコードするCGAからTGAに変異しているのが認められた。

家系図

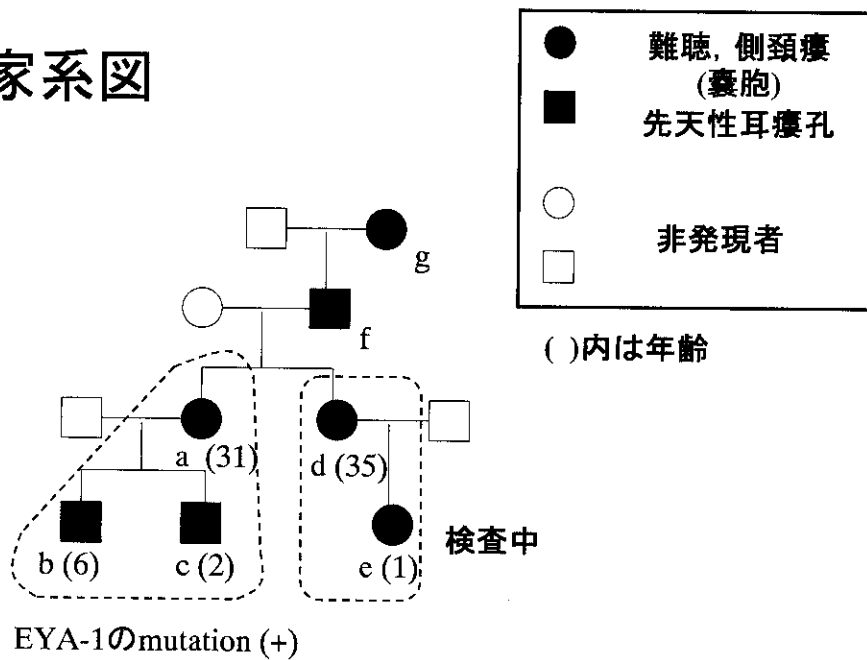


図2 a, b, cにおいてEYA-1のmutationが確認された。

tification of novel mutations, molecular characterization, mutation distribution, and prospects for genetic testing. Genet Test 1 : 243-251, 1997.

- 4) Usami S, Abe S, Shinkawa H, Deffenbacher K, Kumar S, et al.: EYA1 nonsense mutation in a Japanese branchio-oto-renal syndrome family. J Hum Genet 44 : 261-265, 1999.

[研究発表]

〈論文発表〉
なし

〈学会発表〉
なし

[知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉
なし
〈実用新案登録〉
なし
〈その他〉
なし

前庭水管拡大症にみられた Pendred 症候群遺伝子変異

分科会員 喜多村 健 (東京医科歯科大学)

共同研究者 高橋 克昌・玉川 雄也
石川 浩太郎 (自治医科大学)
野口 佳宏・黒石川 泰 (東京医科歯科大学)

【研究要旨】

4家系5名の前庭水管拡大症の Pendred 症候群遺伝子変異の有無を検討した。全員が中等度から高度の両側の変動性感音難聴を呈した。3名には反復性の回転性めまいがみられた。Pendred 症候群遺伝子には、エクソン19と10に2種の1塩基変異 (missense mutation) が同定された。この2種の変異は、pendrin 蛋白のC末端の細胞外に位置するものである。エクソン19の変異は塩基番号2168位でアデニンからグアニンへの変異で、アミノ酸がヒスチジンからアルギニンに変異している。エクソン10の変異は、塩基番号1229でシトシンがチミンに変異し、スレオニンがメチオニンに substitution している。この検討から、Pendred 症候群の遺伝子変異は、古典的な Pendred 症候群のみならず、前庭水管拡大症の原因遺伝子でもある。

【研究目的】

難聴に伴うコミュニケーション障害は、国民の厚生、医療の観点から重視されている。急激に発症する感音難聴は循環障害がその一因と考えられている。一方、原因不明の感音難聴の大部分を占める非症候群性感音難聴の原因ならびに病態の解明は、近年の分子遺伝学の進歩により急速に進んでいる。非症候群性感音難聴の解明により、種々の原因による蝸牛障害の病態の理解も深まりつつある。今回の研究は、難聴遺伝子のひとつである Pendred 症候群遺伝子が、内耳奇形のなかでは高頻度と考えられている前庭水管拡大症でも難聴の原因遺伝子である点を検討したものである。

【研究方法】

対象としたのは、4家系で5名の難聴者と4名の非難聴者である。5名の難聴者のうち4名は女性で、年齢は10から28歳である。残りの1名の男性は10歳である。検査項目は、聴覚検査、側頭骨CTスキャ

ン、頭部MRI検査、甲状腺機能検査、Pendred 症候群遺伝子変異の検索である。遺伝子変異は、末梢血からDNAを抽出、PCR後、21個のエクソンを対象にして、Pendred 症候群遺伝子のシークエンスを検査した。Pendred 症候群遺伝子の polymorphism を検討するために50例の健常者を対象にして Pendred 症候群遺伝子の変異の有無を検索した。

【倫理面の配慮】

対象者からは書類による同意を得て採血を行い、研究計画は所属施設の倫理委員会より承認を得た。

【研究結果】

全員が中等度から高度の両側の変動性感音難聴を呈した。3名には反復性の回転性めまいがみられた。Pendred 症候群遺伝子には、エクソン19と10に2種の1塩基変異 (missense mutation) が同定された。この2種の変異は、pendrin 蛋白のC末端の細胞外に位

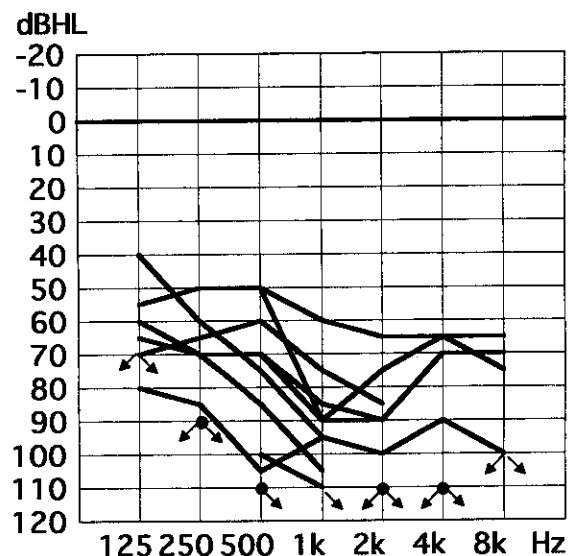


図1 全症例の重ね合わせオーディオグラムで中等度から高度の感音難聴を呈している。

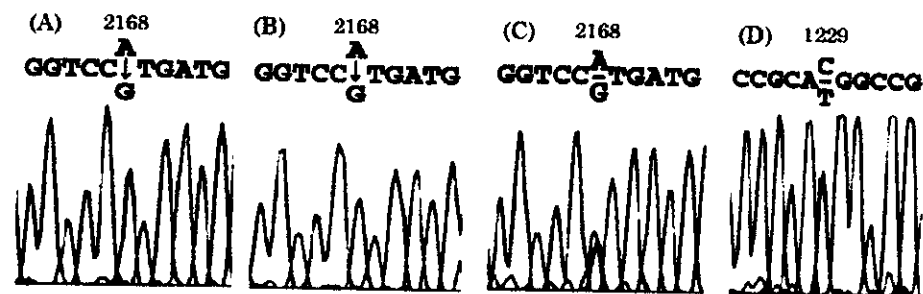


図2 Pendred 症候群遺伝子変異を示す。A, B: 塩基番号2168位でアデニン (A) からグアニンへ (G) のホモの変異。C: 塩基番号2168位でアデニン (A) からグアニンへ (G) のヘテロ変異。D: 塩基番号1229位でシトシン (C) がチミン (T) のヘテロ変異を示している。

置するものである。エクソン19の変異は塩基番号2168位、コドン723でアデニンからグアニンへの変異で、アミノ酸がヒスチジンからアルギニンに変異している。エクソン10、コドン410での変異は、塩基番号1229でシトシンがチミンに変異し、スレオニンがメチオニンに substitution している。

[考 察]

前庭水管拡大症は1978年に Valvassori と Clemis が最初に報告し¹⁾、原因不明の感音難聴の7%に本症候群がみられている²⁾。大部分の症例は、変動あるいは進行性の感音難聴を呈する^{2), 3), 4)}。前庭症状は高度の回転性めまいからふらつきまで様々であるが、29から50%の例にみられると報告されている^{3), 5)}。

Pendred 症候群は、常染色体劣性遺伝で、高度の難聴と甲状腺腫大が主な臨床症状である。また、内耳奇形として前庭水管拡大を呈することが多い。一方、前庭水管拡大症に Pendred 症候群遺伝子変異が報告されている⁶⁾。今回対象とした症例には、甲状腺腫大はなく、パーコレート放出試験も未施行であるため、古典的な Pendred 症候群とは診断できない。しかし、Pendred 症候群遺伝子に変異が同定され、Pendred 症候群と診断される。この研究結果で重要な点は、Pendred 症候群遺伝子の種々の変異により様々な異なる臨床症状が出現することである。

Pendred 症候群遺伝子がコードする蛋白である pendrin はヨウ素と塩素の transporter と考えられている⁷⁾。コドン723でのアデニンからグアニンへの変異はオランダと日本の家系で既に同定されている^{6), 8)}。コドン410でのスレオニンがメチオニンへの substitution は、パキスタンの家系で認められている⁹⁾。pendrin

が前庭水管拡大症ならびに Pendred 症候群の難聴発症に如何に関与しているかは不明である。しかし、前庭水管拡大が内耳発生時期の障害による点を考慮すると、pendrin は、他のホメオボックス遺伝子や転写因子と共同して内耳発生ならびに分化に関与していると想定される。

[結 論]

Pendred 症候群の遺伝子変異は、古典的な Pendred 症候群のみならず、前庭水管拡大症の原因遺伝子でもある。

[参考文献]

- 1) Valvassori GE, Clemis JD. The large vestibular aqueduct syndrome. *Laryngoscope* 1978; 88: 723-8.
- 2) Okumura T, Takahashi H, Honjo I, Takagi A, Mitamura K. Sensorineural hearing loss in patients with large vestibular aqueduct. *Laryngoscope* 1995; 105: 289-94.
- 3) Jackler RK, De La Cruz A. The large vestibular aqueduct syndrome. *Laryngoscope* 1989; 99: 1238-43.
- 4) Arcand P, Desrosiers M, Dube J, Abela A. The large vestibular aqueduct syndrome and sensorineural hearing loss in the pediatric population. *J Otolaryngol* 1991; 20: 247-50.
- 5) Okumura T, Takahashi H, Honjo I, Takagi A, Azato R. Magnetic resonance imaging of patients with large vestibular aqueducts. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1996; 253: 425-8.
- 6) Usami S, Abe S, Weston MD, Shinkawa H, Van Camp G, et al. Non-syndromic hearing loss associated with

enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. Hum Genet 1999 ; 104 : 188-92.

- 7) Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. Nature Genet 1999 ; 21 : 440-3.
- 8) Van Hauwe P, Everett LA, Coucke P, Scott DA, Kraft ML, et al. Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. Hum Mol Genet 1998 ; 7 : 1009-104.
- 9) Coyle B, Reardon W, Herbrick JA, Tsui LC, Gausden E, et al. Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome (sensorineural hearing loss and goitre). Hum Mol Genet 1998 ; 7 : 1105-12.

[研究発表]

〈論文発表〉

Ken Kitamura, Takahashi K, Noguchi Y, Koroishikawa Y, Tagawa Y et al. Mutations of the pendred syndrome gene (PDS) in patients with larger vestibular aqueduct. Acta Otolaryngol (Stockh) (in press)

〈学会発表〉

Collegium 1999

[知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

DFNA16 候補遺伝子解析 SCN2A を中心として

分担研究員 福 島 邦 博 (岡山大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 笠 井 紀 夫・菅 田 研 一
菅 田 明 美・西 崎 和 則 (岡山大学耳鼻咽喉科)
植 木 靖 好 (岡山大学分子医化学)
RJH Smith (The University of Iowa)

【研究要旨】

急性感音性難聴を反復しながら難聴が進行してくる家系として我々が報告してきたDFNA16の原因遺伝子同定を目的として1) fine mapping および2) 候補遺伝子解析を行った。新たに複数のマーカーを加えて行ったハプロタイプ解析では、D2S354 からD2S124 の領域が候補遺伝子領域として推定された。この領域に存在するESTを確認した結果、タイプ2ナトリウムチャンネル (SCN2A) が候補遺伝子の一つとして考えられた。まず、患者末梢血由来の細胞からRNAを抽出し、SCN2AのcDNAを作成して遺伝子異常を検討した。また同時にSCN2Aのゲノム構造を決定し、DFNA16家系構成員における遺伝子変異の有無を検討した。その結果、患者ではSCN2Aのうち片方のアレルのみが発現されていることが判明したが、その他には明らかな変異は認められなかった。DFNA16家系を、SCN2AのSNPを用いたハプロタイプ解析を行ったところ、D2S354からSHGC-82894のおよそ400kbの領域が新たなcritical regionとして考えられた。

【研究目的】

われわれは昨年度までの報告で、1) 急性感音性難聴を反復しながら、聴力が次第に低下する2) 聴力低下のエピソードは出産などの高度の肉体的ストレスの後に発症することが多く、3) 急性聴力低下のエピソードに対してはしばしばステロイドの投与が有効、4) 常染色体優性遺伝をしめす、などの特徴的な臨床経過を示す遺伝性難聴DFNA16の家系について報告してきた。このような遺伝性進行性難聴の原因遺伝子特定することは、進行性難聴の原因を特定し、将来の治療法を確立するための基礎的データとして役立つのみならず、聴覚の謎全体を解き明かす糸口となりうるものである。現在までの検討によって、この家系の原因遺伝子座は、第2番染

色体長腕に存在していることを明かにしたが、この同じ領域には各種のイオンチャンネルが多数マップされている領域であり、その機能面から考えても、これらが有力な候補遺伝子であると考えられる。本年度はその領域に存在すると思われた候補遺伝子SCN2Aについて本家系の構成員を対象に遺伝子異常の有無を検討したので、その詳細について報告する。

【研究方法】

1. 遺伝子領域の fine mapping

遺伝子領域の fine mapping には GDB (Genome database <http://www.gdb.com>) から得られた塩基配列をもとに合成したマーカーを用い、PCRの条件は既報に準じて行った¹⁾。当初、DFNA16のcritical regionとしてはD2S124とD2S2345の間、2cMと推定されていたが、この周辺には、D2S354、D2S111、D2S382などがmapされることが判明し、さらにそのハプロタイプ解析からは、D2S354とD2S124の間が新たな候補領域として考えられた。

2. 候補遺伝子の選定とゲノム構造の解析

候補遺伝子の選定のために、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) および Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research (<http://www-genome.wi.mit.edu/>) の提供するgene map情報から、この領域にすでにmapされているESTを検索した。そのうち、EST SGC-30444、N49273 (stSG21491)、N62735 & H91747 (stSG44073) では内耳由来のcDNAをtemplateにしたPCRでバンドが確認され、これらのESTが少なくとも胎生期のヒト内耳で発現されていることが確認できた。また、すでに作成したPACを用いた物理地図では、PAC206B19や、86D16などでhitがあり、DFNA16のcritical regionであるD2S124の近傍に存在するESTであることが推定できた。さらにSequenceのhomology searchでは、二つのEST (N49273 (stSG21491) および N62735 &

H91747 (stSG44073)) の塩基配列は、ラットの sodium channel type II と高い類似性を示していることが判明した。このため、まずヒトの SCN2 遺伝子の Coding sequence を元に 5' 側の PCR primer を作成し、ヒト胎児脳由来 cDNA (Clontech 社製) を鋳型としてこれらの EST の 3' 側のプライマーを用いてそれぞれ PCR 反応を行った。その結果得られた PCR 産物を直接塩基配列決定によって検討すると、すでに報告のある SCN2A の coding sequence と完全に align し、結局これらの EST は SCN2 の 3' UTR region であることが明らかとなった。さらに、この塩基配列からさらに 3' RACE を行い、polyA tail を含む塩基配列も確認できたため、SCN2A 遺伝子の全長が確認できた。ここまでの条件から、1) SCN2 が少なくとも胎生期のヒト内耳で発現されており、2) しかも、DFNA16 領域の中に含まれることが推定されたため、候補遺伝子として以下の解析を開始した。

3. 遺伝子変異の解析

cDNA 解析

DFNA16 家系の患者末梢血から採取された有核細胞を EBvirus により不死化したものから RNA を抽出した。さらに cDNA を作成し、これに既知の 5' UTR の領域から 3' UTR の領域にそれぞれ PCR primer を設計し、PCR 産物を直接塩基配列決定した。末梢血中に存在する mRNA は、すでに報告されている筋型の SCN2A で挿入されているエクソン 6 の代わりに同じ塩基長であり、かつ 20 個の塩基が異なっているが、アミノ酸レベルで 7 つめの Asn が Asp に変わっているだけの違いであるエクソン 6 N が挿入されていた。このエクソンは、マウスの胎生期に発現される exon6 と相同性を示す塩基配列をしていた。正常コントロールの末梢血から得られた cDNA を元にした同様の解析でも同じエクソンが挿入されたフラグメントも混在していたため、これは少なくとも末梢血ではしばしば認められる alternative splicing と考えられた。この他には大きくアミノ酸を変化させるような変異は認められなかった。また、ヒト胎児脳由来 cDNA (Clontech 社製) を用いた 5' RACE では、エクソン 1 に相当する部分が異なる 2 種類の mRNA が作られていることが明らかになった。

4. ゲノム構造の解析

SCN2 のゲノム構造を解析するために、上記までの検討で判明した SCN2A mRNA 全長の塩基配列のうち任意の領域に複数の PCR primer をランダムに設計し、様々なプライマーの組みあわせによる長鎖 PCR をゲノム DNA を鋳型として行った。これによって得られ

た DNA 断片の一部は直接塩基配列決定を、また長すぎるものに対してはサブクローニングした後に塩基配列決定を行った。これにより、エクソン・イントロンの境界領域から数 100 塩基にわたる領域の塩基配列の決定を行った。さらに、これらの情報から PCR primer を設計し、それぞれ境界領域を含んだエクソンの塩基配列決定を行った。その結果、5' UTR, Intron8, Intron15, Intron22 および 3' UTR にそれぞれ一つずつ、すなわち SCN2A のイントロン-エクソン境界領域周辺で 5 ヶ所の SNP (single nucleotide polymorphism) が発見されたが、意味のある変異は明らかに出来なかった。また、これらと疾患との連鎖は確認できなかった。Polymorphic marker との比較からは、DFNA16 の一方の critical region である D2S124 は SCN2A の 3' UTR の近傍でかつ上流に存在していることが推定された、実際 D2S124 の 5' 側の PCR primer と既報にある SCN2A の 3' UTR をベースにした PCR primer で長鎖 PCR では、物理的にはわずか 5 kb のみ離れて存在しているマーカーであることが確認された。

[倫理面への配慮]

患者サンプルは実験計画の患者への説明と同意に基づいて採取された。

[研究結果]

SCN2A はヒトゲノム中で 76kb の領域をしめる遺伝子で、mRNA では 6018bp となる遺伝子であった。これらは 27 個のエクソンからなり、最小 54bp、最大 480bp のエクソンを含んでいた。これらのエクソンの 5' 側の splice donor site は、ほとんどでいわゆる GT ルールに沿ったものであったが、イントロン 3 と 24 では AT であった。またほとんどの splice acceptor でも AG ルールに沿った配列になっていたが、intron 3 と 24 では AC になっていた。SCN2A にはいくつかの SNP が認められたが、いずれも疾患と関係が疑われるような大きな変異では無かった。

[考察]

SCN2A の遺伝子構造はすでに報告のあるマウスやラットのもの、あるいは他のナトリウムチャネルとその構造がよく類似しており、すでに他の論文²⁾でも指摘されているように、進化の過程で高度に保存された遺伝子であることが確認された。また、こうした類似点は、異なる種の間だけでなく、ヒトの異なる sodium channel の間でも報告されている³⁾。すなわちすべての sodium channel は 4 つの HOX cluster を

含む比較的よく似た遺伝子領域に map されており、特に 2q24 はこうした遺伝子群がクラスターを形成して存在している部分である。このクラスターに属すると考えられる sodium channel には、SCN1A, 2A, 3A, 6A, 7A, 9A が含まれ、これらは gene duplication によって形成されており、こうした遺伝子はしばしば物理的に非常に近い領域に存在していると考えられている。今回の検討で、少なくとも DFNA16 の一方の境界領域である D2S124 自体が SCN2A と極めて近く、この領域にはこれ以外に多数の sodium channel が存在している可能性が極めて高くなった。

一方で、今までの検討では、様々な陽イオンチャネルの異常はしばしば異なるイオンチャネルでも同様の病態を取ることが報告されている。顕著な例としては、KCNE1 ないしは SCN5A の異常で発生する QT 延長症候群が上げられる。例えば、一つの神経細胞の action potential の形成には複数のイオンチャネルの機能が必要なことを考えると、この事実は当然予想されるべきことであり、遺伝性難聴の発症機序において、K チャネルの重要性が報告されている現在、他の主要な陽イオンチャネルが難聴の発症に関与している可能性は否定できない。

今回の検討で新たに、1) 脳内では、すでに報告のある exon1 に代わって、マウスで報告のある exon1 と類似した別の exon が高頻度に発現していること、また、2) 末梢血中でもごくわずかの SCN2A の発現があるが、ここでは、胎児型の mRNA が一部発現している可能性などが新たに判明した。興味深いことに患者末梢血から得られた cDNA の塩基配列では、genome DNA で見られた 3'UTR の SNP が確認できず、少なくとも末梢血では片方のアレルからしか SCN2 が発現されていなかった。このため Sodium channel の haploinsufficiency がこの常染色体優性遺伝性難聴の発症機序となっている可能性は未だ否定できない。しかし、少なくとも今回の検討では難聴を来しうる遺伝子異常を明らかに同定することが出来なかった。少なくとも、SCN2A のコードされている領域には難聴の原因は存在しないものと考えられる。

今回の検討で、新しい critical region D2S354-SHGC82894 が考えられたが、この領域を SCN2 の degenerate primer で検討するといくつかの PCR 産物が得られている。これらの遺伝子はある種の sodium channel と塩基配列上の類似を示しており、やはりこの領域にも何らかのイオンチャネルが存在している可能性が高い。現在、このイオンチャネルの同定と、

ゲノム構造の解明を目標として努力している。

【結 論】

DFNA16 の候補遺伝子の一つとして SCN2A の遺伝子異常を検討した。cDNA レベルおよび genomic DNA のレベルでそれぞれ、SCN2A の coding region についてその遺伝子変異を検討したが、難聴を引き起こしうると考えられる変異は認められなかった。本研究を通して得られた SNP によるハプロタイプ解析の結果からは、DFNA16 の遺伝子領域としては、新たに D2S354 から SHGC82894 の領域が得られた。

【参考文献】

- 1) Fukushima K, Kasai N, Ueki Y, Nishizaki K, Sugata K, Hirakawa S, Masuda A, Gunduz M, Ninomiya Y, Masuda Y, Sato M, McGuirt WT, Coucke P, Van Camp G, Smith RJH: A Gene for Fluctuating, Progressive Autosomal Dominant Non-Syndromic Hearing Loss, DFNA16, Maps to Chromosome 2q23-24.3. *Am J Hum Genet.* 65 : 141-150, 1999
- 2) George AL, Iyer GS, Kleinfield R, Kallen RG, Branchi RL : Genomic organization of the human skeletal muscle sodium channel gene. *Genomics* 15 : 598-606, 1993
- 3) Plummer NW, Meisler MH : Evolution and diversity of mammalian sodium channel genes. *Genomics* 57, 323-331, 1999
- 5) Sarao R, Gupta SK, Auld V, Dunn RJ: Developmentally regulated alternative RNA splicing of rat brain sodium channel mRNAs. *Nucleic acids research* 19 : 5673-5679, 1991

【研究発表】

- <論文発表>
- なし
- <学会発表>
- なし

【知的所有権の取得状況】

- <特許取得>
- なし
- <実用新案登録>
- なし
- <その他>
- なし

第7番染色体部分欠損症例と難聴

分担研究員 福島 邦博 (岡山大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 Mehmet Gunduz・菅田 明美
菅田 研一・西崎 和則 (岡山大学耳鼻咽喉科)
植木 靖好 (岡山大学分子医化学)
長井 今日子・塚田 春代 (群馬大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

第7番染色体部分欠損症のうち、split hand/foot malformation (SFHM) と呼ばれる特徴的な臨床形態を示すものがある。これは、両四肢の指に発生する「ロブスターのツメ状」と形容される特徴的な奇形を有する疾患であり、この中には時に難聴を合併するものがあることが報告されている。今回、群馬大学で経験された難聴を伴う SHFM 症例において、遺伝子解析を行い、その遺伝子欠損部位がすでに報告のある SHFM 座位と overlap するものであることが分かった。本症例での欠損領域はすでに報告のある常染色体劣性遺伝性難聴 DFNB14 の欠損領域を含むものであり、これらの遺伝子の隣接遺伝子欠損が難聴の機序である可能性が示唆された。

【研究目的】

SHFM に先天性高度難聴を合併した症例に対して fine-deletion mapping を行い、本症例での染色体欠損領域を同定することを第一の目標とする。本研究はまた、こうした研究を通して、難聴及び内耳の奇形の原因となった遺伝子座を同定し、新たな難聴に関与する遺伝子座を同定することを目標とする。

【研究方法】

1. 症例

今回検討の対象としたのは群馬大学耳鼻咽喉科にて経験した先天性高度難聴児である¹⁾。本児は、4歳4ヶ月の時点で、音に反応しないことを主訴に群馬大学医学部を受診した。本児は満期普通分娩で出生し出生児体重は2076g, Apgar Scoreは5～9点であった。出生直後から足の指の部分欠損および筋緊張の低下、ほ乳困難などを指摘されていた。多発奇形のため、染色体検査が施行され、7番染色体部分欠損症 del (7)(q11.2q22) を指摘された。生後2ヶ月で療育上の都合から群馬大学に転院、2歳7ヶ月の時点で

家族が音に反応の無いことに気づき、群馬大学医学部耳鼻咽喉科を受診した。全身的には身長80cm, 体重9.5kg (-2SD以下)と著明な身体発育不全と全身の筋緊張の低下を認めた。また四肢の指の部分欠損が認められた。右手はほぼ正常であるが、左手の指は4本しか認め無かった。また、右足の指は4本のみ、左足の指は3本のみであった。耳介には右耳介奇形(対耳輪前足の消失)耳介低位, 外耳道狭窄を認めた。さらに小顎症, 口蓋高位, 口蓋垂裂および舌の低形成と軽度の喉頭軟化症を認めた。

聴力検査では COR で90dB程度で反応を認めた。ABRでは、click刺激にて右80dBnHL, 左90dBnHLまでV波を認めた。津守一稲毛乳幼児精神発達テストによると、DQ10と著しい発達の遅れを認めた。粗大運動は予定1歳7ヶ月, 独座2歳1ヶ月, と著しい遅れを示していた。

高分解能CTを使った検査では両耳とも中耳についてはツチ骨, キヌタ骨の癒合などの中耳奇形が認められた。内耳では内耳道の狭窄と蝸牛の低形成を認めた。前庭は膨大部の嚢胞状拡大を認めた。

2. fine deletion mapping

この患児の末梢血を採取し、フェノールクロロフォルム法にて、DNAを抽出した。抽出したDNAは、既報に従ってPCR反応を行った²⁾。PCR反応に使用したprimerはreserch genetics社から販売されているものを用い、その染色体上での位置は、GDB (genome database <http://gdbwww.gdb.org/>) に報告されているものを用いた。PCR反応の後、6%polyacrylamide gelにて電気泳動し、バンドの検出には銀染色を用いた。コントロールには3人の健康成人のDNAを用い、single alleleによるバンドパターンを確認した。このときのプライマーには、これらのマーカーのセントロメア側から順番に、D7S1830, D7S1831, D7S494, D7S669, D7S644, D7S646, D7S651, D7S518, D7S796, D7S525, D7S1817, D7S486, D7S480を用いた。

〔倫理面への配慮〕

両親に対する説明と同意の上で患児からの採血が行われ、本研究に用いられた。説明の結果として両親からの採血は同意が得られなかったため、行われなかった。

〔研究結果〕

D7S644, D7S646, D7S651, D7S518の四つのマーカーは単一アレル由来のバンドのみが検出された。一方でこの領域に隣接するD7S669およびD7S796のマーカーでは、ヘテロ接合性が確認できたため、少なくともD7S644からD7S518までの最短4.58cM、最長で16.48cMの領域が欠損していることが示された。この領域はすでに報告のあるSHFM遺伝子座を含み、そのtelomeric sideに広い領域を含んでいた。この遺伝子領域の中にはPDSは含まれず、また実際本症例でPDSの直接塩基配列決定を行ったが、その中には意味のある変異を同定することはできなかった。

〔考 察〕

SPLIT-HAND/FOOT MALFORMATION TYPE 1 (SHFM1, OMIM183600) は、ectrodactyly と呼ばれる手指の奇形、すなわち lobster-claw (中央の軸が無く なっている) や monodactyly (第5指だけが残っている状態) などの手指の奇形を特徴とする先天奇形の 一形態である。時に家系性に発生することが報告さ れており、その場合には不定型な常染色体優性遺伝 形式をとる³⁾。人口あたりの出生率は、90000出生に つき一人と報告されており⁴⁾、家系性のものでは、 1965年までにすでに約70の家系が報告されている³⁾。 Del Porto らは、ectrodactyly に小頭症と嚙状鼻および 耳介低位を伴った症例で、del(7)(q11-q22) を認めた 症例を報告しているが⁵⁾、他にも少なくとも9例で ⁶⁾⁻¹¹⁾ 7q の部分欠損を伴う症例が報告されており、 (Tajara et al., 1989; Morey and Higgins, 1990; Roberts et al., 1991; Marinoni et al., 1995; McElveen et al., 1995) この染色体領域の欠損によりこうした臨床症状が生 じることが示されている。これらの症例での第7 番染色体欠損は、お互いに7q21.2-q21.3. の領域が重 複しており、特にこの領域の欠損が重要であると考え られている³⁾。

ところで、Scherer らは、症候群性の ectdactyly (syndromic ectrodactyly : SE) として、9つのタイプを 提唱している¹¹⁾。1) EEC syndrome (129900), 2) LADD syndrome (149730), 3) ADULT syndrome (103285), 4) EEC syndrome without cleft lip/palate

(129810), 5) Fontaine syndrome (183700), 6) acral-renal-mandibular syndrome (200980), 7) ECP syndrome (129830), 8) ectrodactyly and hearing loss (220600), および9) Karsch-Neugebauer syndrome (183800) である。これらのうち今回の症例は、難聴を伴うタイプである8) ectrodactyly and hearing loss (220600) に分類されるものであると考えられる。こうした症例は他にも、Wildervanck (1963), Birch-Jensen (1949), Fraser (1976) などの報告¹²⁾⁻¹⁴⁾ があり、まれな病態ではあるがしばしば、この特徴的な ectrodactyly に合併して難聴が発生することが知られている。

今回の報告では、この難聴合併型の ectrodactyly でも、今までの報告と同様に7q21.2-q21.3を含む領域の欠損によって発症しうることが報告された。遺伝子地図の上のデータでは、ectrodactyly は¹⁵⁾ somatic cell hybrid lines を用いて、SHFD-associated deletions の最小領域は、PON (168820)-D7S812-SHFD1-D7S811-ASNS (108370) であったと報告されている。Marinoni et al. (1995)⁹⁾ は、7q21.2-q22.1の欠損によって split-foot と発達障害を来した患者でPCRによってD7S527, D7S479, およびD7S554で、欠損を確認しているが、本患者での欠損領域はこれらの領域を含むものであり、同様の病態から、同じように本症の ectrodactyly が発症している可能性が示唆された。

それでは、難聴を発症するケースと、しないケースではどのような違いがあるのであろうか。1) 同一の遺伝子異常で異なる phenotype を示しているケース、2) 隣接遺伝子症候群として、隣り合った他の遺伝子が同時に欠損するために、難聴の合併を来した可能性などが考えられる。非常に興味深いことに今まで均衡型転座症例では、ほとんど split-foot 以外の臨床症状を持たないものがあることが既に報告されている。Sharland et al. (1991)¹⁶⁾ は、tetramelic ectrodactyly を来した症例に、染色体5, 7, 9:の間で複雑に染色体の再構成を来している症例を報告したが(5q11.2, 5q34, 7q21.2, 7q31.3, and 9q22.1) この症例では明らかな染色体欠損は認められず、そしてこの患児は、わずかな顔面奇形の他には、全ての面においてほとんど正常であった。Genuardi et al. (1993)¹⁷⁾ も均衡転座症例 t(2;7)(q21.1;q22.1) で、両側の split-hand/foot のみが、低い浸透率で常染色体優性遺伝している症例を報告している。これらの所見はむしろこの手指の異常は単一の遺伝子の量的不足に由来する疾患である可能性を示唆しており、しかも、その一遺伝子の異常だけであれば、手指以外の臨床症状はあまり明らかではない可能性を示して

いる。手指の異常の遺伝子座すなわちSHFM1の領域の物理地図はすでに報告されており、(Scherer et al. 1994) 転座ないしは逆位症例のbreakpointから700 kb以内の領域を候補領域として、またDLX5 (600028), a member of the distal-less homeo box gene family およびDLX gene (DLX6; 600030) がこのSHFM1 critical intervalに収まることから、従ってこの疾患の候補遺伝子であると報告している。

このSHFM 遺伝子座近傍には、常染色体劣性遺伝性難聴の遺伝子座であるDFNB14 (18), DFNB17 (19) そしてPDS (20) が存在している。DFNB14の候補領域としては、D7S527からD7S3047までの15cMの領域が報告されており¹⁸⁾、PDSはそのtelomeric borderに相当する¹⁸⁾。さらに、DFNB17はD7S2487, D7S655, D7S480をcritical regionとして報告されているが、PDSをcentromeric borderとしてそのtelomeric sideに存在する¹⁹⁾。これらの3つの遺伝子領域のうち、実際今回の症例での欠損領域とのoverlapが確認できるものは、DFNB14である。特にWildervankらおよびFraserらによる報告では^{13, 14)}、両親正常で複数の同胞に発症した例が報告されており、従ってこれらSHFM合併の難聴の発症機序としては常染色体劣性遺伝が推定されている。しかし、本症例は明らかな染色体欠損症であり、疾患の発生機序は基本的には遺伝子の量的不足すなわちhaploinsufficiencyであることが推定される。この場合、常染色体劣性遺伝性難聴の原因遺伝子が、難聴の発生に関与するとは考えられないが、1) この欠損領域には、今まで既知のものとは全く別の聴覚に関連する遺伝子が含まれており、常染色体優性の機序で難聴が発生した2) hemizygoteとして残った染色体に常染色体劣性の遺伝子異常が隠されていた。3) 同じ遺伝子でも、haploinsufficiencyによって難聴が発症する機序も存在する、などの可能性が考えられる。DFNB14はMustaphaらが、レバノンの常染色体劣性遺伝性難聴について報告した遺伝子座であり、その臨床経過、ことに本例で認められたような中耳・内耳奇形の有無については特に記述されていない。その近傍に存在するPDS遺伝子の異常では前庭水管拡大症が発生することが宇佐美ら²⁰⁾によって報告されているが、やはり本例で見られたような中耳奇形は確認されていない。

【結 論】

まれなsplit hand/hoot malformation例に難聴が合併した症例について報告し、さらにその遺伝子解析を

行った。split hand/hoot malformation例に合併した難聴は、中耳及び内耳奇形によるものと考えられたが、その染色体欠損領域は、形態的にはdel(7)(q11.2q22)であり、遺伝子地図上では、D7S644, D7S646, D7S651, D7S518などの遺伝子マーカーを含む部分であると考えられた。この領域はすでに常染色体劣性遺伝性難聴の遺伝子座として報告のあるDFNB14とい一部overlapするものであり、これらの遺伝子が難聴の発生に関与している可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 塚田春代, 長井今日子, 大島幸雄, 鬼形和道, 亀井民雄: 染色体異常7q部分欠損に中耳, 内耳奇形を合併した1例. 耳喉頭頸 69 889-893 1997
- 2) Fukushima K, Kasai N, Ueki Y, Nishizaki K, Sugata K, Hirakawa S, Masuda A, Gunduz M, Ninomiya Y, Masuda Y, Sato M, McGuirt WT, Coucke P, Van Camp G, Smith RJH: A Gene for Fluctuating, Progressive Autosomal Dominant Non-Syndromic Hearing Loss, DFNA16, Maps to Chromosome 2q23-24.3. Am J Hum Genet 65: 141-150, 1999
- 3) McKusick VA, Lurie W, Smith M *183600 SPLIT-HAND/FOOT MALFORMATION, TYPE 1; SHFM1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/dispim?183600>
- 4) Birch-Jensen, A.: Congenital Deformities of the Upper Extremities. Copenhagen: Ejnar Munksgaard (pub.) 1949
- 5) Del Porto, G.; D'Alessandro, E.; De Matteis, C.; Lo Re, M. L.; Ivaldi, M.; Di Fusco, C.: Delezione interstiziale del braccio lungo del cromosoma 7 e sue correlazioni cliniche. Pathologica 75 (suppl.): 268-271, 1983.
- 6) Tajara, E. H.; Varella-Garcia, M.; Gusson, A. C. T.: Interstitial long-arm deletion of chromosome 7 and ectrodactyly. Am. J. Med. Genet. 32: 192-194, 1989.
- 7) Morey, M. A.; Higgins, R. R.: Ectro-amelia syndrome associated with an interstitial deletion of 7q. Am. J. Med. Genet. 35: 95-99, 1990.
- 8) Roberts, S. H.; Hughes, H. E.; Davies, S. J.; Meredith, A. L.: Bilateral split hand and split foot malformation in a boy with a de novo interstitial deletion of 7q21.3. J. Med. Genet. 28: 479-481, 1991.
- 9) Marinoni, J.-C.; Stevenson, R. E.; Evans, J. P.; Geshuri, D.; Phelan, M. C.; Schwartz, C. E.: Split foot

- and developmental retardation associated with a deletion of three microsatellite markers in 7q21.2-q22.1. *Clin. Genet.* 47 : 90-95, 1995.
- 10) McElveen, C.; Carvajal, M. V.; Moscatello, D.; Towner, J.; Lacassie, Y. : Ectrodactyly and proximal/intermediate interstitial deletion 7q. *Am. J. Med. Genet.* 56 : 1-5, 1995.
- 11) Scherer, S. W.; Poorkaj, P.; Massa, H.; Soder, S.; Allen, T.; Nunes, M.; Geshuri, D.; Wong, E.; Belloni, E.; Little, S.; Zhou, L.; Becker, D.; Kere, J.; Ignatius, J.; Niikawa, N.; Fukushima, Y.; Hasegawa, T.; Weissenbach, J.; Boncinelli, E.; Trask, B.; Tsui, L.-C.; Evans, J. P. : Physical mapping of the split hand/split foot locus on chromosome 7 and implication in syndromic ectrodactyly. *Hum. Molec. Genet.* 3 : 1345-1354, 1994.
- 12) Birch-Jensen, A. : Congenital deformities of the upper extremities. *Op. Ex Domo Biol. Hered. Hum. U. Hafniensis* 19 : 1949
- 13) Fraser, G. R. : *The Causes of Profound Deafness in Childhood.* Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press (pub.) pp.70 1976
- 14) Wildervanck, L. S. : Deafness associated with split hands and feet in two siblings. A new syndrome. (Abstract) *Proc. 11th Int. Cong. Genet., The Hague* 286-287, 1963.
- 15) Scherer, S. W.; Poorkaj, P.; Allen, T.; Kim, J.; Geshuri, D.; Nunes, M.; Soder, S.; Stephens, K.; Pagon, R. A.; Patton, M. A.; Berg, M. A.; Donlon, T.; Rivera, H.; Pfeiffer, R. A.; Naritomi, K.; Hughes, H.; Genuardi, M.; Gurrieri, F.; Neri, G.; Lovrein, E.; Magenis, E.; Tsui, L.-C.; Evans, J. P. : Fine mapping of the autosomal dominant split hand/split foot locus on chromosome 7, band q21.3-q22.1. *Am. J. Hum. Genet.* 55 : 12-20, 1994.
- 16) Sharland, M.; Patton, M. A.; Hill, L. : Ectrodactyly of hands and feet in a child with a complex translocation including 7q21.2. *Am. J. Med. Genet.* 39 : 413-414, 1991.
- 17) Genuardi, M.; Pomponi, M. G.; Sammito, V.; Bellussi, A.; Zollino, M.; Neri, G. : Split hand/split foot anomaly in a family segregating a balanced translocation with breakpoint on 7q22.1. *Am. J. Med. Genet.* 47 : 823-831, 1993.
- 18) Mustapha M, Salem N, Weil D, el-Zir E, Loiselet J, Petit C : Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness. *Eur J Hum Genet* ; 6 : 548-551, 1998
- 19) Greinwald JH Jr, Wayne S, Chen AH, Scott DA, Zbar RI, Kraft ML, Prasad S, Ramesh A, Coucke P, Srisailapathy CR, Lovett M, Van Camp G, Smith RJ : Localization of a novel gene for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome region 7q31. *Am J Med Genet* 30 : 107-113, 1998
- 20) Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, Adawi F, Hazani E, Nassir E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED : Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* ; 17 : 411-22, 1997
- 21) Li XC, Everett LA, Lalwani AK, Desmukh D, Friedman TB, Green ED, Wilcox ER : A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* ; 18 : 215-217, 1998
- 22) Usami, S.; Abe, S.; Weston, M. D.; Shinkawa, H.; Van Camp, G.; Kimberling, W. J. : Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum. Genet.* 104 : 188-192, 1999.

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

第100回日本耳鼻咽喉科学会総会

[知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

コネキシン 26 遺伝子異常の迅速診断法

分担研究者 福島 邦 博 (岡山大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 宇佐美 真 一 (信州大学耳鼻科)
菅田 研 一・益田 明 美
笠井 紀 夫・Mehmet Gunduz
西崎 和 則 (岡山大学耳鼻咽喉科)
植木 靖 好 (岡山大学分子医化学)

Richard JH Smith (the University of Iowa, Department of Otolaryngology)

【研究要旨】

コネキシン 26 の遺伝子異常の hot spot mutation について迅速に診断するシステムを開発し、その有用性について検討した。コネキシン 26 の遺伝子領域を蛍光プライマーで PCR を行い、自動シークエンサーを用いて検討するとそのピークの存在部位の違いによって迅速に一塩基欠失を診断し得た。本法を用いた迅速診断システムを現在開発中である。

【研究目的】

最初、DFNB1 はチュニジアの家系における常染色体劣性遺伝性難聴の遺伝子座として 13q11 に同定された¹⁾。その後、Maw らの報告²⁾ による 19 の家系の解析から、この遺伝子座が Caucasoid の中では疫学的に重要な遺伝子であることが推定されるようになり、その疫学的重要性が認識されるようになった。後にこの遺伝子座に存在する責任遺伝子として、GJB2 (connexin26) が同定され、その後様々な遺伝的背景をもつ人口で検討されるようになったが、30 から 35 番目までの 6 つの G が連なっている部分のうち一つの G が欠損する突然変異 (30delG ないしは 35delG) が、13 番染色体に連鎖する症例の 63% に認められることが報告された³⁾。この部位の変異は、Carrasquillo 他から、様々な民族からの報告においても、最も頻度の高い異常であり、ことに地中海領域では高頻度に見られることが報告されている。^{4) -13)}

ところが、この mutation hot spot にはある程度の人種差があることがすでに報告されている。例えばユダヤ系の家系では 167 番目の T が欠失する (167delT) タイプ^{9) 14)} が多いことが報告されている。日本の難聴者を対象に行った報告では、233 番目から 235 番目まで 3 つつながった C のうち、一つが欠失する 235delC^{16), 17)} の頻度が高いことが報告されている。これらの報告を概観すると、明らかにそれぞれの人口において頻

度の高い変異は、connexin26 の塩基配列のうち、繰り返し配列になっている部分のうち一部が脱落するものが多いことが示されており、こうした塩基欠失を診断すれば、多くの人種においてこの迅速診断を行うことによって有効なスクリーニング法が確立されることが示されている。また、ごく一般的に、こうした繰り返し配列の一部脱落は、よくある遺伝子の mutation hot spot であり、こうした遺伝子異常を迅速に検出する技術の確立は臨床的な遺伝子診断に寄与するところが多い。今回我々は、一塩基欠失を来したサンプルの迅速診断技術の確立を目指したので報告する。

【研究方法】

1. DNA の抽出

ボランティアとして研究に参加した健康成人からの頬部粘膜からの検体の採取には、粘膜細胞診用のブラシ (サイトブラシ TM) を用いた。ブラシで頬粘膜を擦過後、抽出用のバッファーの中で洗浄し、その洗浄液から DNA を抽出した。実際の DNA 抽出には QIAGEN Dneasy tissue kit を用いた。この抽出に要する時間は一サンプルあたり 10 分程度で極めて容易に抽出作業が行い得た。また、実際の mutation sample による陽性コントロールは信州大学宇佐美ら及び Iowa 大学 Richard JH Smith らより供与をうけた。

2. PCR

最初に、第一の PCR として、Cx26 のエクソン 2 全域を含む 772bp の領域を PCR 反応で増幅した。さらにその PCR 産物のうち 35delG と 235delC の領域を含む 241bp の領域を増幅するために、蛍光標識したプライマーを用いて PCR 反応を行った。プライマーの合成と蛍光標識は Appliedbiosystem 社で行った。PCR 反応には基本的には既報にあるものと同じ条件¹⁷⁾ を用いたが、耐熱性 DNA 合成酵素としては、platinum