

genotyper™を用いた。ピークの検出は applied biosystems 社製自動シーケンス機 (ABI310) による自動検出を行った。

[倫理面への配慮]

研究用のサンプルは各個人へのインフォームドコンセントの結果として得られた。

[研究結果]

コントロールを用いた検討結果では、この迅速診断システムによって、実際に40検体以上のサンプルを用いた検討でも頬粘膜からの擦過サンプルで問題なくPCR反応が2日間で一塩基欠失の診断が可能であった。

[考察]

本診断法によって、connexin26のmas screeningも可能であると考えられた。本方式の限界はもちろん、一つ以上の塩基が欠失しないと検出できない点にあるが、現在、同様に蛍光標識された塩基を使用することによって一塩基置換も検出できるシステムを市販のキットをもとに作成しており、こうした簡易な技術を用いた半自動診断技術を開発中である。

従来、このような遺伝子診断には1) 制限酵素を用いて検索する方法、2) アレル特異的 (ARMS) PCRプライマーを用いる方法、3) mismatch DNase活性をもつ酵素を用いる方法などがすでに報告されている。制限酵素を用いる方法は他の方法に比較して比較的煩雑で多数の検体を扱う場合には困難がある。ARMSPCRはプライマーごとに温度条件の設定が厳密で至適なPCR条件を決定するのは困難である。3)の方法は結果の解析に熟練が要求され、必ずしも一般的な方法ではない。また、将来的にはgene tipなどを用いた手段が開発されることが考えられるが、この手法はgene tipのように、多くの基本特許に抵触しないようにしているため比較的安価でありながら、大規模な検査を省力化によって迅速に診断するというメリットを持ちうる。しかし、難聴の遺伝子診断を臨床的に応用する場合には、技術面以外の点でのいくつかの問題点について慎重に検討する必要がある。第一に、こうした技術は、新生児の聴覚マスキングと同じように、難聴のリスクを診断するための有効な方法となりうる事が考えられるが、「遺伝子診断」という多くの倫理的問題点を含んだ技術が「スクリーニング」という考え方に適しているかどうか、という問題点について考えなければ

ならない。すなわち、「遺伝子」という人間の尊厳にも関わる領域をつかってまで診断をつけるだけの臨床的有用性を提供できる見通しが得られるかどうかについても検討されるべきであろう。現時点ではこの技術は、あくまで技術論的な検討であり、臨床応用に際しては十分な留意と検討が必要なことはあらためて指摘するまでもないであろう。

[結論]

コネキシン26の一塩基欠失の迅速診断技術を確立した。頬粘膜の擦過から約2日程度の日数で迅速に診断できることが明らかとなった。現在、国内で報告されている一塩基置換の検出システムとあわせて、高度難聴児で実際に検出する上での問題点について検討中である。

[参考文献]

- 1) Guilford P. Ben Arab S. Blanchard S. Levilliers J. Weissenbach J. Belkahia A. Petit C. A non-syndrome form of neurosensory, recessive deafness maps to the pericentromeric region of chromosome 13q. *Nature Genetics*. 6 : 24-28, 1994
- 2) Maw MA. Allen-Powell DR. Goodey RJ. Stewart IA. Nancarrow DJ. Hayward NK. Gardner RJ. The contribution of the DFNB1 locus to neurosensory deafness in a Caucasian population. *American Journal of Human Genetics*. 57 : 629-635, 1995
- 3) Zelante L. Gasparini P. Estivill X. Melchionda S. D'Agruma L. Govea N. Mila M. Monica MD. Lutfi J. Shohat M. Mansfield E. Delgrosso K. Rappaport E. Surrey S. Fortina P. Connexin26 mutations associated with the most common form of non-syndromic neurosensory autosomal recessive deafness (DFNB1) in Mediterraneans. *Human Molecular Genetics*. 6 : 1605-1609, 1997
- 4) Carrasquillo MM. Zlotogora J. Barges S. Chakravarti A. Two different connexin26 mutations in an inbred kindred segregating non-syndromic recessive deafness : implications for genetic studies in isolated populations. *Human Molecular Genetics*. 6 : 2163-2172, 1997
- 5) Denoyelle F. Weil D. Maw MA. Wilcox SA. Lench NJ. Allen-Powell DR. Osborn AH. Dahl HH. Middleton A. Houseman MJ. Dode C. Marlin S. Boulila-ElGaid A. Grati M. Ayadi H. BenArab S. Bitoun P. Lina-Granade G. Godet J. Mustapha M. Loiselet J. El-Zir E. Aubois A. Joannard A. Petit C. et al. Prelingual deafness: high prevalence of a 30delG mutation in the

- connexin 26 gene. *Human Molecular Genetics*. 6 : 2173-2177, 1997
- 6) Estivill X. Fortina P. Surrey S. Rabionet R. Melchionda S. D'Agruma L. Mansfield E. Rappaport E. Govea N. Mila M. Zelante L. Gasparini P. Connexin-26 mutations in sporadic and inherited sensorineural deafness [see comments]. *Lancet*. 351 : 394-398, 1998
- 7) Kelley PM. Harris DJ. Comer BC. Askew JW. Fowler T. Smith SD. Kimberling WJ. Novel mutations in the connexin 26 gene (GJB2) that cause autosomal recessive (DFNB1) hearing loss. *American Journal of Human Genetics*. 62 : 792-799, 1998 Apr.
- 8) Scott DA, Kraft ML, Carmi R, Ramesh A, Elbedour K, Yairi Y, Srisailapathy CR, Rosengren SS, Markham AF, Mueller RF, Lench NJ, Van Camp G, Smith RJ, Sheffield VC : Identification of mutations in the connexin26 gene that cause autosomal recessive nonsyndromic hearing loss. *Hum Mutat* ; 11 : 387-394, 1998
- 9) Lench N. Houseman M. Newton V. Van Camp G. Mueller R. Connexin-26 mutations in sporadic non-syndromal sensorineural deafness [letter] [see comments]. *Lancet*. 351 : 415, 1998
- 10) Lench NJ. Markham AF. Mueller RF. Kelsell DP. Smith RJ. Willems PJ. Schattelman I. Capon H. Van De Heyning PJ. Van Camp G. A Moroccan family with autosomal recessive sensorineural hearing loss caused by a mutation in the gap junction protein gene connexin26 (GJB2). *Journal of Medical Genetics*. 35 : 151-152, 1998
- 11) Storm K. Willocx S. Flothmann K. Van Camp G. Determination of the carrier frequency of the common GJB2 (connexin-26) 35delG mutation in the Belgian population using an easy and reliable screening method. *Human Mutation*. 14 : 263-266, 1999.
- 12) Antoniadis T. Rabionet R. Kroupis C. Aperis GA. Economides J. Petmezakis J. Economou-Petersen E. Estivill X. Petersen MB. High prevalence in the Greek population of the 35delG mutation in the connexin26 gene causing prelingual deafness [letter]. *Clinical Genetics*. 55 : 381-382, 1999.
- 13) Morell RJ. Kim HJ. Hood LJ. Goforth L. Friderici K. Fisher R. Van Camp G. Berlin CI. Oddoux C. Ostrer H. Keats B. Friedman TB. Mutations in the connexin26 gene (GJB2) among Ashkenazi Jews with non-syndromic recessive deafness [see comments]. *New England Journal of Medicine*. 339 : 1500-1505, 1998
- 14) Sobe T. Erlich P. Berry A. Korostichevsky M. Vreugde S. Avraham KB. Bonne-Tamir B. Shohat M. High frequency of the deafness-associated 167delT mutation in the connexin26 (GJB2) gene in Israeli-Ashkenazim [letter]. *American Journal of Medical Genetics*. 86 : 499-500, 1999
- 15) Abe S, Usami Si, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ : Prevalent connexin26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* ; 37 : 41-43 2000
- 16) Fuse Y. Doi K. Hasegawa T. Sugii A. Hibino H. Kubo T. Three novel connexin26 gene mutations in autosomal recessive non-syndromic deafness. *Neuroreport*. 10 : 1853-1857, 1999
- 17) 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

[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

難聴の原因遺伝子に関する研究

分担研究者 宇佐美 真 一 (信州大学耳鼻咽喉科学教室)

共同研究者 阿 部 聡 子・秋 田 二 朗
南 場 淳 司・新 川 秀 一 (弘前大学耳鼻咽喉科)
甲 田 英 子・塚 本 耕 二
木 村 至 信・高 橋 健 太 郎
浅 村 賢 二 (信州大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

外来を受診する難聴患者にどの程度遺伝子が関与しているかを検討すると共に、その臨床的特徴に関し検討した。その結果、現在明らかになっている遺伝子のうちミトコンドリア遺伝子1555変異およびコネキシン26遺伝子変異の頻度が多いことが明らかになった。またCTで前庭水管拡大を伴う症例では高率にPDS遺伝子の変異が見出されることが明らかになった。

【研究目的】

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て難聴の正確な診断、適切な治療に結び付けていく必要がある。今回、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すると共に、その臨床像に関し検討した。

【研究方法】

(1) 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PDS遺伝子、ミトコンドリア遺伝子変異、コネキシン(Cx)26遺伝子、ミオシンⅦa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。

(2) 頻度調査

報告されている原因遺伝子のうち症例数の多いミトコンドリア遺伝子(1555, 3243, 7445)、コネキシン26遺伝子、PDS遺伝子、ミオシンⅦa遺伝子変異の難聴患者に占める頻度を遺伝形式ごとに検討した。

【倫理面への配慮】

- (1) 遺伝子診断、検査に際しては日本人類遺伝学会およびアメリカ人類遺伝学会の倫理規定にしたがった同意書を作成し研究対象者のインフォームドコンセントを得ている。
- (2) 当該研究課題に関しては学内(弘前大学)の倫理委員会で承認されている。

【研究結果】

(1) PDS 遺伝子

Pendred 症候群 9 家系 (13 症例) における PDS 遺伝子変異の解析を行った結果、9 家系中 8 家系 (89%) に PDS 遺伝子の変異が見い出された。また「前庭水管拡大を伴った非症候性難聴」症例 19 家系のうち 11 家系 (58%) に合計 10 種類の PDS 遺伝子変異が同定された。

(2) コネキシン (Cx) 26 遺伝子

常染色体劣性遺伝形式をとる難聴家系 35 家系中 11 家系 (31%) に Cx26 遺伝子の変異が見い出された。

(3) ミトコンドリア遺伝子の変異

ミトコンドリア遺伝子変異 (1555, 3243, 7445) のうち 1555A->G 点変異を持つ症例が最も多く、外来を受診する感音難聴患者の約 3% に、またアミノ配糖体による難聴者の約 1/3 に変異が検出された。

(4) ミオシンⅦa 遺伝子

常染色体優性遺伝形式をとる日本人の 19 家系 (19 症例) および Usher 症候群 2 家系 (2 症例) の 21 症例について検討したがミオシンⅦa 遺伝子変異は見い出されなかった。

【考 察】

(1) PDS 遺伝子

PDS 遺伝子が Pendred 症候群の原因遺伝子であることが確認された。¹⁾ 近年 Pendred 症候群に高率に前

庭水管拡大を伴うことが明らかになってきている。そのような背景を考え合わせると「前庭水管拡大を伴った非症候群性難聴」症例とPendred症候群は一連の疾患群である可能性が高く両疾患群の間には多くの移行型が存在する可能性が考えられた。またH723R, 2111insGCTGG変異は「前庭水管拡大を伴う難聴」およびPendred症候群の両者に見られたことより、甲状腺腫に関与するもう一つの遺伝子が存在する可能性、あるいはcompound heterozygousの場合もう一方の変異が表現型を規定する因子になっている可能性が考えられた。今回検討したPendred症候群の患者の臨床像に関して検討したところ全例に前庭水管拡大が認められこの奇形が本症候群を診断する上での良い診断基準になりうる事が明らかとなった。また今回の症例では本疾患に合併することが多いとされる蝸牛の低形成(いわゆるMondini奇形)を伴っていないことから欧米の症例とは表現型に差があることが明らかとなった。また今回見いだされた変異のほとんどは欧米に報告されていない変異でありこの変異の差が臨床型の差と関連がある可能性も推測された。

(2) コネキシン (Cx) 26 遺伝子

現在のところ難聴と関連すると思われるコネキシン (Cx) 26 遺伝子変異が二十数個報告されているが中でもコードDNAの30-35番目の6個の連続するG(グアニン)の1個が欠失する35delG(文献により30delG)と呼ばれる変異が最も頻度が多く注目されている。欧米の報告では常染色体劣性遺伝をとる先天性の難聴家系の約半数にこの変異が確認されたとの報告があり、この遺伝子がかかなりの頻度で先天性の難聴患者に見いだされる可能性を示唆している。今回合計7種類の遺伝子変異が明らかになったが、特に235delC変異は変異アレルの約73%に見いだされた。²⁾興味あることに欧米人に多い35delG(30delG)変異は見いだされず日本人には稀な変異であることが明らかとなった。

難聴像に関しては先天性の高度難聴が多いが中には同じ種類の変異を持つにもかかわらず軽度から中等度の難聴を呈している症例もあり、難聴の成立には別の因子(遺伝子あるいは環境)が関与している可能性も考えられた。

(3) ミトコンドリア遺伝子の変異(1555A->G点変異)

頻度調査を行ったところ1555A->G点変異が多く見出され日常診療で注意しなければならない遺伝子の一つであることが明らかとなった。³⁾今回MASA法を用いたミトコンドリア遺伝子変異のスクリーニ

ングシステムが確立し、現在薬物カードの配付による予防を実施している。^{4) 5)}

(4) ミオシン VII a 遺伝子

ミオシン VII a 遺伝子はUsher症候群 I b型の原因遺伝子として知られているが、近年非症候群性難聴(DFNA11, DFNB2)にもミオシン VII a 遺伝子変異が認められ注目されている。中でも常染色体優性遺伝形式をとる日本人の難聴家系(DFNA11)においてcoiled coil regionにおけるフレームシフト変異が報告されていることから、日本人の難聴家系にミオシン VII a 遺伝子変異が深く関与している可能性がある。しかし今回の検討ではミオシン VII a 遺伝子変異が見いだされなかったことからミオシン VII a 遺伝子変異を持つ日本人家系は比較的稀であることが考えられた。

[結 論]

難聴患者には種々の原因遺伝子が関与していることが明らかとなった。これらの原因遺伝子を検索して得られた結果を、難聴の診断や治療に結びつけることが可能となるであろう。

[参考文献]

- 1) 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.
- 2) Abe S, Usami S, Shinkawa H, Kelley PM, Kimberling WJ. : Prevalent connexin 26 gene (GJB2) mutations in Japanese. *J Med Genet* 2000; 37 : 41-3.
- 3) Usami S, Abe S, Akita J, Namba A, Shinkawa H et al. : Prevalence of mitochondrial gene mutations among hearing impaired patients. *J Med Genet* 2000; 37 : 38-40.
- 4) Usami S, Abe S, Akita J, Shinkawa H, Kimberling WJ. : Sensorineural hearing loss associated with the mitochondrial mutations. In "Genetics in Otorhinolaryngology" *Adv Otorhinolaryngol*, Vol. 56 (eds. Kitamura K & Steel KP) 221-9 (Karger, Basel, 2000).
- 5) Usami S, Abe S, Shinkawa H, Inoue Y, Yamaguchi T. : Rapid mass screening method and counseling for the 1555A->G mitochondrial mutation. *J Hum Genet* 1999; 44 : 304-7.

[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

内耳奇形マウスで同定された Plasma Membrane Ca-ATPase 遺伝子変異

分科会員 喜多村 健 (東京医科歯科大耳鼻咽喉科)

共同研究者 高橋 克昌・玉川 雄也
石川 浩太郎 (自治医大耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

内耳奇形マウスとして報告されている *Wriggle Mouse Sagami (wri)* において, Plasma Membrane Ca-ATPase type 2 (PMCA2) 遺伝子の変異が疑われたため塩基配列を決定し, 予想通り同遺伝子1234位の点変異を同定した。対応するアミノ酸では412位のグルタミン酸がリジンへ置換されており, 内耳有毛細胞における特異抗体の染色性が低下していた。PMCA2遺伝子はヒトにおいては第3染色体短腕に存在するが, 同遺伝子異常によって生じるヒト疾患, 難聴家系はいまだ同定されていない。

【研究目的】

ヒトの先天性難聴はその約6割が遺伝性難聴と言われており, 難聴原因遺伝子の同定は, 治療法の乏しい感音難聴の病態解明に重要と思われる。ヒト内耳は生検ができない制約があるため, モデル動物を用いた研究が不可欠である。現在までに, 難聴モデルマウスの解析によって同定されたヒト難聴遺伝子は5つにのぼる¹⁾。今回我々は, 内耳奇形を持つ突然変異マウス *wri* の遺伝子解析を行うことによって, 難聴遺伝子の同定を行い, その遺伝子異常から生じる難聴の病態解明を試みた。

【研究方法】

wri マウスを十分なネブタール麻酔下で断頭し, 脳組織を直ちに液体窒素にて冷却した。TaKaRa RNA PCR kit にて得られた poly-A RNA より RT-PCR を行い cDNA を得た。PMCA2 の塩基配列 (GenBank No. AF053471) より 19 種類の primer を作製し, PCR 産物を精製後, 自動蛍光シーケンサにて全塩基配列を決定した。ホモ接合体, 野生型の塩基配列を専用プログラムで比較し, ホモ接合体における変異部位を同定した。各接合体, 他系統のマウスより得たゲノム DNA を PCR 増幅し, *Val I* による制限酵素解析を

行った。

内耳膜迷路を実体顕微鏡下に摘出し, 抗 Plasma Membrane Ca-ATPase 抗体 (PMCA 抗体) を用いた免疫組織学的観察を行った。観察には共焦点レーザー顕微鏡を使用した。

【倫理面への配慮】

実験は十分な麻酔下で行い, 断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

【研究結果】

ホモ接合体においては1234位のグアニンがアデニンに置換 (G1234A) されていた。G1234A 変異は制限酵素解析より他系統のマウスにはみられず, 遺伝子多型でないことが確認された。G1234A によってアミノ酸は412位においてグルタミン酸からリジンに置換されていた。

PMCA 抗体は野生型では外有毛細胞の聴毛と内耳有毛細胞の細胞体に強く染色されるが, ホモ接合体では聴毛の染色性はほぼ消失し, 内耳有毛細胞の染色性も減弱または散発的に消失していた (図1)。

【考 察】

内耳奇形マウスとして報告されている *wri* は, 難聴については優性遺伝をし, 行動異常については劣性遺伝をする。また, 生後早期から蝸牛と球形嚢とに変性を生じることが特徴である²⁾。1998年 *wri* と同様に難聴が優性遺伝, 行動異常が劣性遺伝をする突然変異マウス *Deafwaddler (dfw)* において PMCA2 遺伝子上の点変異が報告され³⁾, ほぼ同時期に同遺伝子の Knock-out マウスが難聴と行動異常を呈することが報告された⁴⁾。よって表現型の等しい *wri* においても同遺伝子変異が存在すると予想され, 前述のように遺伝子変異が同定された。

カルシウムは細胞のシグナル伝達に重要な役割を

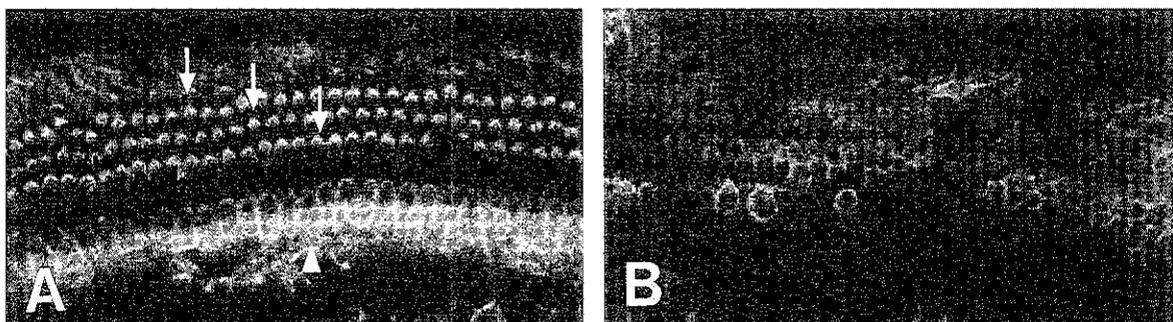


図1 抗PMCA抗体の免疫組織染色。A:野生型マウス。3列の外有毛細胞の聴毛(矢印)と1列の内有毛細胞の細胞体(矢頭)が染色されている。B:ホモ接合体マウス。外有毛細胞の聴毛は染色されず、内有毛細胞も散発的に染色されるのみである。

担っていると考えられている。有毛細胞においても聴毛が倒れることによって細胞は興奮し、機械的刺激受容体チャネル・膜電位感受性チャネルを介してカルシウムが細胞内に流入する。また細胞内に存在するカルシウムストア(滑面小胞体)からもカルシウムが放出される。細胞内カルシウム濃度は一旦上昇した後、PMCAからカルシウム排出機構によって通常濃度に戻る。内耳有毛細胞ではPMCA2が特異的に発現しているとの報告があり⁵⁾、*wri*ではPMCA2遺伝子異常によってカルシウム排出に異常が生じ、難聴ひいては内耳の形態異常をきたすと推測される。

ヒトとマウスとの染色体相同性の検索から、PMCA2はヒト第3染色体短腕(p25-26)に存在することが分かっている。しかし今のところ同部位に難聴を伴う疾患の原因遺伝子や難聴家系はリンクしていない。今後ヒト難聴疾患が同部位にリンクされ、PMCA2遺伝子異常がヒトにおける難聴の原因になる可能性がある。

【結 論】

難聴モデルマウス*wri*においてPMCA2遺伝子異常が難聴の原因であった。

【参考文献】

- 1) Probst, F.J., and Camper, S.A. The role of mouse mutants in the identification of human hereditary hearing loss genes. *Hear. Res.* 130 : 1-6, 1999.
- 2) Takahashi, K., Osawa, N., Ohmura, N., and Kitamura, K. Evaluation of inner ear histology and auditory brainstem response in *Wriggle Mouse Sagami*. *Acta Otolaryngologica* (Stockh) in press.

- 3) Street, V.A., McKee-Johnson, J.W., Fonseca, R.C., Tempel, B.L., and Noben-Trauth, K. Mutations in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene cause deafness in deafwaddler mice. *Nat. Genet.* 18 : 390-394, 1998.
- 4) Kozel, P.J., Friedman, R.A., Erway, L.C., Yamoah, E.N., Liu, L.H., et. al. Balance and hearing deficits in mice with a null mutation in the gene encoding plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 2. *J. Biol. Chem.* 273 : 18693-18696, 1998.
- 5) Furuta, H., Luo, L., Helper, K., and Ryan, A.F. Evidence for differential regulation of calcium by outer versus inner hair cells : plasma membrane Ca-ATPase gene expression. *Hear. Res.* 123 : 10-26, 1998.

【研究発表】

〈論文発表〉

Takahashi, K., and Kitamura, K. A point mutation in a plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene causes deafness in *Wriggle Mouse Sagami*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 773-778, 1999.

〈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

急性音響外傷における内耳組織転写因子活性の変化（第一報）

分科会員 神 崎 仁（慶應大耳鼻科）

共同研究者 松 延 毅・小 川 郁
井 上 泰 宏（慶應大耳鼻科）
萩 田 喜代一（摂南大薬学部）
Jochen Schacht（ミシガン大）

【研究要旨】

急性音響外傷は急性感音性難聴の代表的なモデルとして認識されているが、その成立機序、すなわち強大音がどのような機序で蝸牛組織に傷害を与えるかという疑問は現在までほとんど解明されていない。今回われわれは、有色モルモットに強大音（115dB octave band noise centered at 4 kHz, 5 hours）を与え、蝸牛感覚上皮、蝸牛血管条及びラセン神経節のそれぞれの組織中の転写制御因子活性（AP-1；activator protein-1）を測定した。強大音暴露により蝸牛感覚上皮および血管条における AP-1 活性は有為に上昇した。

【研究目的】

近年において強大音暴露による急性感音性難聴、いわゆる急性音響外傷のメカニズムとしてフリーラジカルの関与が示唆されているが、フリーラジカルなどの酸化ストレスが聴覚路に及ぼす影響、及びそれらが聴覚路の組織を細胞傷害や細胞死に至らしめる過程等、詳細は殆ど不明である。最近になり中枢神経系を中心に酸化ストレスが細胞内の多様な経路を経て最終的には様々なストレス応答タンパクを遺伝子を介して変化させることが報告されている。特に、それらストレス応答タンパクの遺伝子発現の制御はそれらのDNAの上流のプロモーター領域において、DNAの転写制御因子と称される一群のタンパクにより行われることが報告されている。本研究の目的は、聴覚に關与する内耳組織または細胞内における、強大音暴露等の酸化ストレスのシグナル伝達経路の解明、遺伝子発現制御様式の解明、ストレス応答遺伝子の同定、及びそれらをもとにして急性感音性難聴の治療法を追求することにある。

【研究方法】

プライエル反射正常の有色モルモットに対し、

PTS（permanent threshold shift）を起こしうる 115dB の 4 kHz を中心とするオクターブバンドノイズを防音室内で無麻酔下で 5 時間暴露した。強大音暴露後、直ちに断頭、蝸牛を摘出し顕微鏡下に蝸牛感覚上皮、蝸牛外側壁、及びラセン神経節を分画した後、各組織より細胞核抽出液を調整した。この細胞核抽出液中の転写制御因子の一種である AP-1 の DNA 結合能を、AP-1 のコンセンサス塩基配列を持つ 2 本鎖 DNA プローブを用いたゲル移動度シフトアッセイにより解析した。また、各細胞核抽出物を用い AP-1 の構成タンパクの一つである c-Fos に対する特異的抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った。さらに c-Fos mRNA は通常、cyclic AMP response element binding protein (CREB) のリン酸化により誘導されることにより phosphorylated CREB (pCREB) に特異的抗体を用いたウェスタンブロットティングを行った。

【倫理面への配慮】

本研究は、Guideline of University of Michigan's Committee on use and Care of Animals 及び慶應義塾大学医学部動物実験ガイドラインに準拠し行われた。

【研究結果】

³²P で標識した AP-1 プロローブは蝸牛感覚上皮、蝸牛外側壁及びラセン神経節の各々の核分画に対して異なった結合能を示した（図 1）。強大音負荷により AP-1/DNA 結合は蝸牛感覚上皮及び蝸牛外側壁において有意に上昇した（図 2）。ラセン神経節では有意な上昇はみられなかった。c-Fos に対する抗体を用いたスーパーシフトアッセイでは、強大音負荷による AP-1/DNA 結合の上昇に c-Fos が部分的に關与していることが示唆された（図 3）。しかしながら、pCREB に対するウェスタンブロットティングでは強大音負荷による AP-1/DNA 結合の上昇の CREB リン酸化との関係は認められなかった（図 4）。

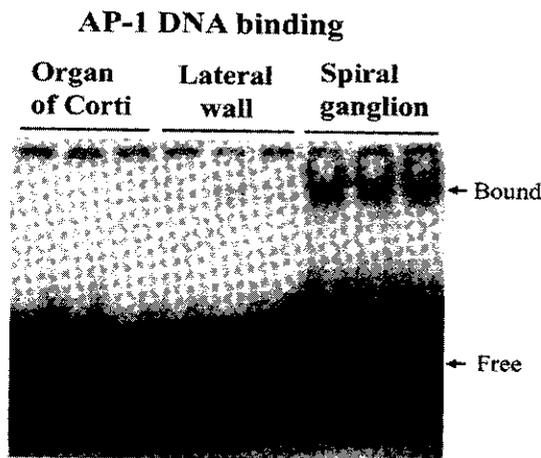


図1 各蝸牛組織中のAP-1/DNA結合(非刺激時)。らせん神経節が最も結合している。

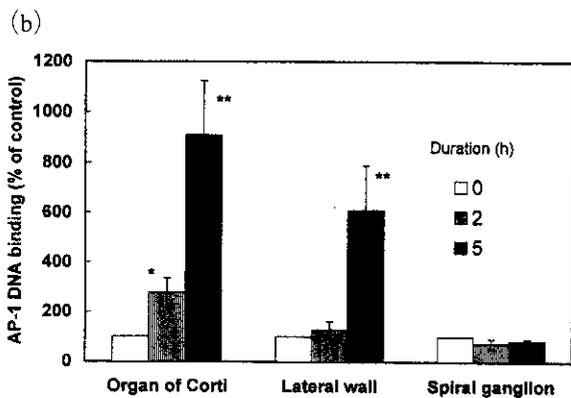
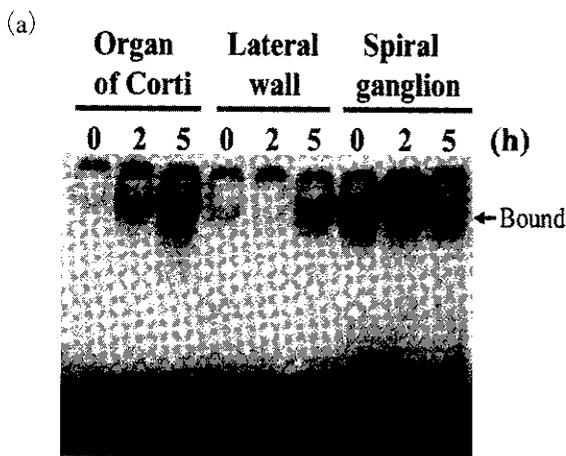


図2 AP-1/DNA結合への強大音負荷の影響。(a) ゲルシフトアッセイ。(b) AP-1/DNA bindingのデンストメトリーによる解析データ。強大音負荷により蝸牛感覚上皮及び外側壁で有為に増加している。

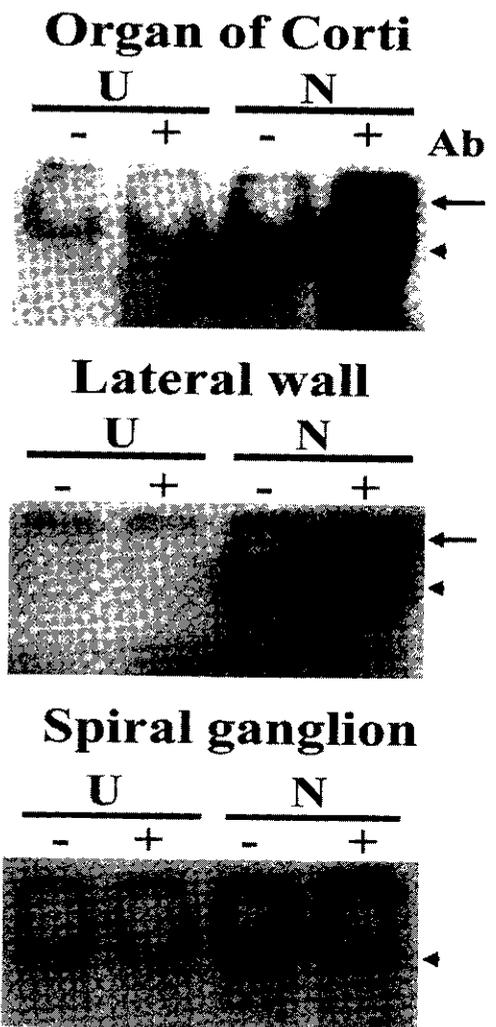


図3 抗c-Fos抗体によるスーパーシフトアッセイ。抗c-Fos抗体とAP-1/DNA complexを反応させることによりAP-1/DNA/antibody complexの泳動が遅れている。

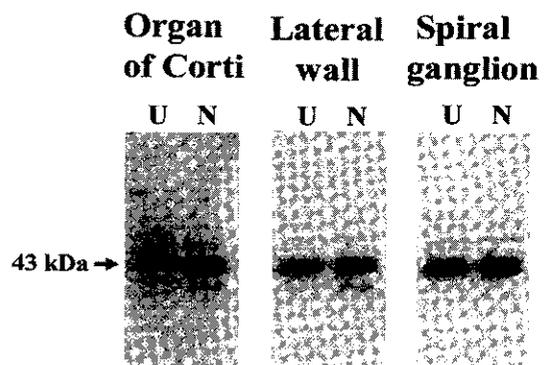


図4 pCREBに対するウェスタンブロッティング。強大音負荷群と非負荷群とでは有為差はみられなかった。

[考察]

急性音響外傷による蝸牛傷害にはフリーラジカル産生が関与しており、一種の酸化ストレスと考えられている。中枢神経系においては、酸化ストレスに反応する種々のいわゆるストレス応答タンパクの発現は遺伝子の転写制御因子により制御されていることが報告されている。本研究において、急性音響外傷による蝸牛傷害のメカニズムとして転写制御因子の一つであるAP-1が関与していることが示唆された。ストレス応答のメカニズムには様々なストレス応答伝達経路のクロストークがあり、今後のさらなる研究が必要である。

[結論]

モルモットに Permanent threshold shift (PTS) を引き起こしうる強大音負荷により蝸牛組織、特に蝸牛感覚上皮および蝸牛外側壁のDNA/AP-1結合が有意に上昇した。また、その反応には部分的にc-Fosが関与していることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Azuma Y., Ogita K., Yoneda Y.: Binding of double stranded oligonucleotide probes for particular transcription factors with leucine-zipper motifs in discrete brain structures of mice with acquired and inherent spontaneous seizure. *Neurochem. Int.* 29 : 323-333, 1996.
- 2) Curren C., Franza B.R.Jr.: Fos and Jun, the AP-1 connection. *Cell* 55 : 395-397, 1988.
- 3) Ohlemiller K.K., Dungan L.L.: In vivo measurement of cochlear reactive oxygen species (ROS) in mice; effect of noise exposure and cochlear ischemia. *Assoc. Res. Otolaryngol. Abstr.* 21 : 518, 1998.
- 4) Yamane H., Nakai Y., Takayama M., Iguchi H., Nakagawa T., Kojima A.: Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. *Arch. Otorhinolaryngol.* 252 : 504-508, 1995.
- 5) Yamasoba T., Schacht J., Shoji F., Miller J.F.: Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res.* 815 : 317-325, 1999.
- 6) Yoneda Y., Ogita K., Inoue K., Mitani A., Zhang L., Masuda S., Higashihara M., Kataoka K.: Rapid potentiation of DNA binding activities of particular transcription factor with leucine-zipper motifs in discrete brain structures of the gerbil with transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 667 : 54-66, 1994.

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

23rd Midwinter Research Meeting, Association for Research in Otolaryngology, St. Peters Beach, FL, 2000 (accepted).

[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

一過性虚血による内耳障害

分科会員 暁 清 文 (愛媛大耳鼻咽喉科)

共同研究者 白馬伸洋・古賀健一郎
 渡辺太志・兵頭純
 谷口昌史・佐藤英光 (愛媛大耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

スナネズミを用いて両側椎骨動脈の血流遮断—再開通を行うことにより内耳に一過性虚血を負荷し、虚血前後の蝸牛複合活動電位 (CAP) 閾値の変化とコルチ器の組織学的変化を検討した。その結果、虚血直後に CAP 域値は急激に上昇し無反応となったが、再開通と共に徐々に回復した。5分虚血群では1日後にはほぼ虚血前値にまで回復したが、4日目以降は再度上昇し、7日目には12.5dBの閾値上昇がみられた。組織学的には基底回転および第2回転の内毛細胞に遅発性細胞障害が認められた。一方、15分虚血群では1日後のCAP域値は20dBであり、その後、変化は認められなかった。組織学的には基底回転および第2回転の内毛細胞と外毛細胞に脱落がみられたが、障害の程度や範囲は内毛細胞が高度であった。

【研究目的】

感音性難聴の原因の一つとして内耳虚血が考えられており¹⁾、これまでも数多くの虚血性難聴に関する動物実験が行われてきた²⁾。しかし内耳道を走行する迷路動脈へのアプローチは困難であり、動物を長期間生かすことも難しく、一過性虚血の内耳に及ぼす影響についてはほとんど解明されていない。本研究は、ウイルス環が欠損した動物であるスナネズミを用いて両側椎骨動脈を一時的に遮断³⁾することにより内耳虚血を動物に負荷し、一過性内耳虚血の聴覚に及ぼす影響や虚血によって生じる有毛細胞の組織学的変化を明らかにすることを目的とした。

【研究方法】

酸素50%、笑気50%の混合ガスにハロセン3%を加え全身麻酔を施行した。経口挿管後に両側の椎骨動脈を剥離し、各々5gの重りを負荷して血流遮断を行った。CAP閾値の測定には立ち上がり、立ち下がり時間各1.25ms、持続時間10msの8kHzのトーン

バーストを用いた。記録電極は実験の1週間前にあらかじめ顔面神経管内に埋め込んでおいた。

有毛細胞の組織学的検討においては、聴毛染色用に rhodamine-phalloidin 染色を、核染色用に Hoechst 33342 を用い、蛍光顕微鏡下に聴毛と核の形態を同時に観察し、死細胞割合を算出した。

【倫理面への配慮】

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

【研究結果】

図1に虚血前後のCAP閾値の経時的变化を示す。虚血直後にCAP域値は急激に上昇し、今回用いた刺激装置の最大出力の音刺激(60dB)を与えても反応は認められなかった。5分虚血群では、血流を再開するとCAPは徐々に回復し、虚血後1日目にはほぼ虚血前値にまで回復した。しかし虚血後4日目以降に再度閾値は上昇し、虚血後7日目の平均値は12.5dBであった。一方15分虚血群では、血流再開後CAP閾値は徐々に回復するが、1日後には平均約20dBとなり、その後、7日目にかけて変化は認めなかった。組織学的には、5分虚血群では4日目までは聴毛や核の形態に異常はみられなかった。しかし7日目には基底

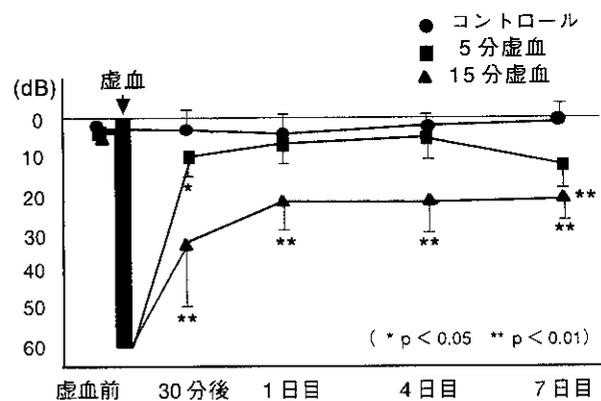


図1 CAP閾値の虚血前後の経時的变化。

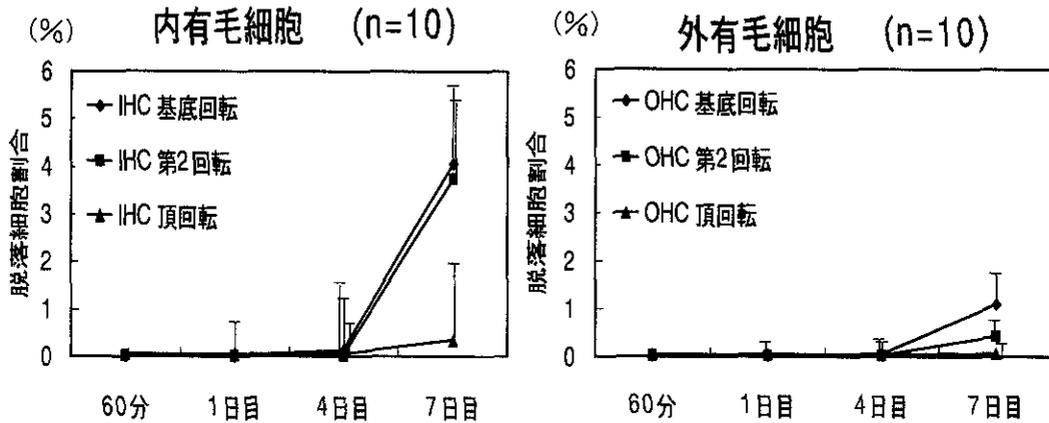


図2 5分虚血群における脱落有毛細胞の割合。

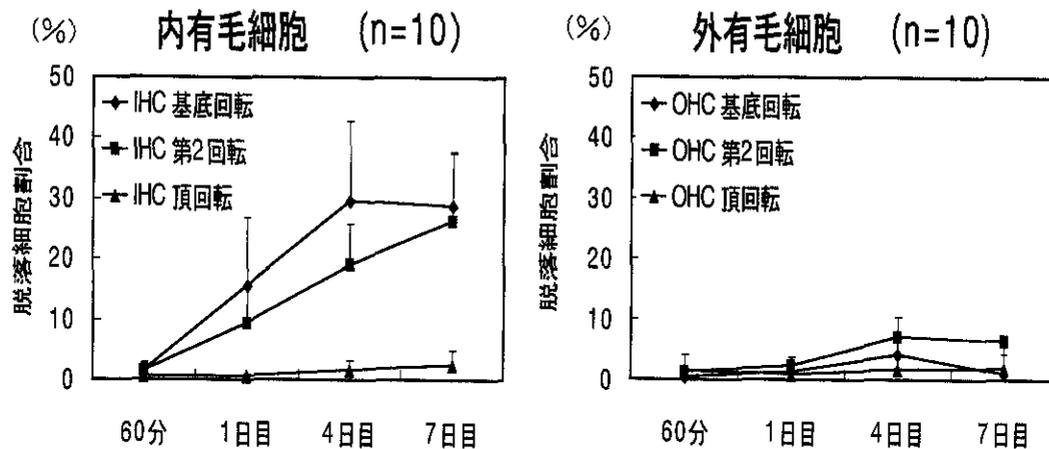


図3 15分虚血後群における脱落有毛細胞の割合。

回転と第2回転の内毛細胞に散在性に聴毛と核が共に脱落している所見がみられた(図2)。15分虚血群では、主に基底回転と第2回転において1日後からすでに脱落有毛細胞がみられ、その割合は経時的に増加した。この群では内毛細胞のみならず外毛細胞にも脱落がみられたが、その程度は前者の方が高度であった(図3)。

[考 察]

内耳の一過性虚血がどのような病変をもたらすかは急性難聴の原因を考える上で重要な課題である。本研究の結果、虚血時間が5分と短時間であれば内毛細胞に遅発性細胞死が生じること、また、その変化は基底回転と第2回転が中心であることが示された。一方、15分間の虚血では障害は回復することなく有毛細胞に不可逆的な変化をもたらす細胞死を来すことが示された。これらの過程には内因性のグルタミン酸や細胞内カルシウムが関与していると考えられるが、その詳細は不明である。今後、一過性虚血による内耳障害の機序を明らかにすると共に、障

害を予防ないし治療する方策についても検討したい。

[結 論]

5分虚血群では、7日目以降に一旦回復したCAP閾値が再度低下し、主に内毛細胞で遅発性細胞死が生ずることが示された。15分虚血群では、CAP閾値は1日目以降変化せず、組織学的には脱落細胞の割合が進行性に増加した。このような変化は基底回転と第2回転に顕著であった。

[参考文献]

- 1) Schuknecht HF: Pathology of the Ear. Boston; Harvard University Press, 1974: 319-30.
- 2) Kimura R, Perlman HB: Arterial obstruction of the labyrinth part I. cochlear changes. Ann Otol Rhinol Laryngol 1958; 67: 5-24.
- 3) Hata R, Matsumoto M, Hatakeyama T, et al.: Differential vulnerability in the hindbrain neurons and local cerebral blood flow during bilateral vertebral occlusion in gerbils. Neuroscience 1993; 56(2): 423-39.

[研究発表]

〈論文発表〉

- 1) Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Gyo K: Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hind brain ischemia in gerbil ; J Comparative Neurology (in press).
- 2) 古賀健一郎, 白馬伸洋, 渡辺太志, 兵頭 純, 暁清文, 他: 虚血性内耳障害におけるグルタミン酸の役割, 愛媛医学, 1999, 18, 146-151
- 3) 渡辺太志, 白馬伸洋, 古賀健一郎, 暁清文: 一過性内耳虚血後の遅発性聴力障害, Otol Jpn, 1999, 9, 17-21
- 4) 暁清文: 聴覚障害におけるグルタミン酸の役割, 耳鼻臨床, 1999, 92, 455-463

〈学会発表〉

第3回細胞死研究会

日本聴覚医学会第8回耳音響放射研究会

第44回日本聴覚医学会総会ならびに学術講演会

[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

耳毒性薬物投与による急性感音難聴モデルの内耳グルタミン酸動態 —細胞外カルシウム依存性の検討—

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・堀之内 謙一
春田 厚・小宗 静男 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

カナマイシン (KM) とエタクリン酸 (EA) の複合投与により生じるモルモット鼓室階外リンパのグルタミン酸 (GLU) 濃度動態と蝸牛電位の変化を記録した。2剤投与では、EA 静注約2時間後より急激な GLU の上昇が観察された。EA 投与後の複合活動電位の低下や組織所見より、GLU の起源が外有毛細胞崩壊によるものと推定された。しかし、灌流液中からカルシウムを除去した条件で、この GLU 上昇は完全に抑制され、外有毛細胞における KM 耳毒性発現に細胞外カルシウムの細胞内流入が深く関与していることが示唆された。

【研究目的】

蝸牛では求心性神経伝達物質とされるグルタミン酸 (GLU) も、過剰になると細胞傷害性に働くことが知られている。大量の GLU が放出される虚血や強大音負荷では、GLU の細胞傷害性が病態形成に大きく関与していると考えられている¹⁾。しかし、耳毒性薬物による内耳傷害の過程で GLU が果たす役割についてはまだ一定の見解はない。昨年、我々はカナマイシン (KM)、エタクリン酸 (EA) 投与前後のモルモット鼓室階外リンパにおける GLU 濃度の変化を検討し、2剤投与では、EA 静注2時間後ぐらいより急激な GLU の上昇が観察されることを報告した²⁾。今回は、本モデルにおける蝸牛電位の変化を観察するとともに、外リンパへの GLU 放出にカルシウム依存性があるかどうかを検討した。

【研究方法】

プライエル反射正常の体重 250-400g の白色モルモットを使用した。ネンプタルで全身麻酔後、気管切開を行い人工呼吸下に実験を行った。外リンパ GLU 測定は微小透析法と酵素蛍光検出法を組み合わせ、基底回転鼓室階の外リンパ液 GLU 濃度を連続

的に測定した²⁾。蝸牛電位測定は顎下部から中耳骨包を開き、蝸牛基底回転より 3M KCL ガラス毛細管電極で蝸牛内リンパ直流電位 (EP) と 4KHz トーンバースト (83dB SPL) に対する複合活動電位 (AP) を記録した。測定後は 10%ホルマリンで灌流固定し、光顕標本を作製した。

(実験1) KM・800mg/kg s.c. と同量の saline, EA・40mg/kg i.v. と同量の phosphate buffered salts (PBS) 投与の組み合わせにより以下に示す4群に分けた。1群: saline 皮下注3時間後に PBS 静注 (コントロール); 2群: KM・800mg/kg 皮下注3時間後に PBS 静注; 3群: saline 皮下注3時間後に EA・40mg/kg 静注; 4群: KM・800mg/kg 皮下注3時間後に EA・40mg/kg 静注, として、外リンパ GLU の経時的変化を記録した。

(実験2) 外リンパ GLU の上昇が確認された第4群について EP と AP の変化を記録した。また、カルシウムを除去した透析液を灌流して GLU 濃度を測定し、実験1の結果と比較した。

【倫理面への配慮】

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

【研究結果】

実験1において、コントロールおよび KM あるいは EA 単独投与を行った1, 2, 3群における GLU 濃度の変化はみられなかった。2剤複合投与を行った第4群で、EA 静注後約2時間で GLU の上昇が観察された (図1)。

第4群における蝸牛電位の変化を図2に示す。EP の低下は一過性であるが、AP は EP の低下にほぼ追従する一過性低下 (第1相) に続いて、EP 回復期 (EA 静注後1~2時間) に生じる2度目の低下 (第2相) が観察された。この第2相は観察時間内では非可逆

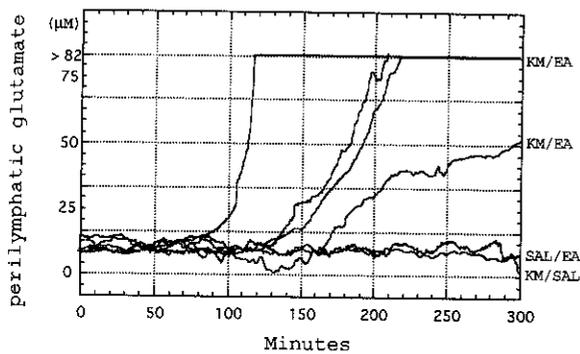


図1 各種薬剤投与時の鼓室階外リンパ中のグルタミン酸濃度 (GLU) の変化。コントロール、カナマイシン (KM/SAL) あるいはエタクリン酸 (SAL/EA) 単独投与群ではGLU濃度の変化はみられないが、2剤投与群 (KM/EA) では、EA静注約2時間後よりGLUの上昇が認められる。

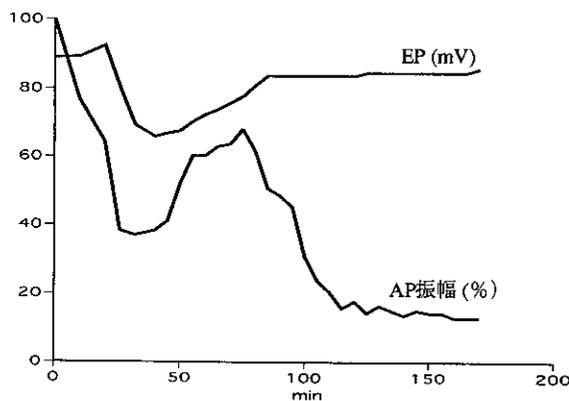


図2 2剤投与群(4群)におけるエタクリン酸(EA)静注後のEP(絶対値, mV)とAP振幅(EA投与開始直前の振幅に対する相対値, %)の変化。

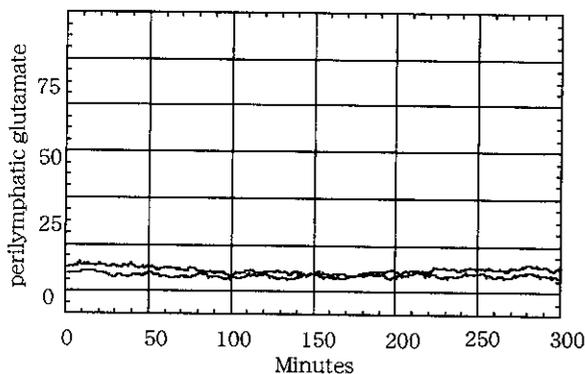


図3 カルシウムフリー条件下での各種薬剤投与時の鼓室階外リンパ中のグルタミン酸濃度の変化。図1でみられた2剤投与でのグルタミン酸上昇が全くみられない。

性であった。

透析液をカルシウムフリーにすると、実験1の第4群でみられたGLU放出が明らかに抑制された(図2)。組織学的検討でも実験1の第4群で認められた外有毛細胞の崩壊所見が、カルシウムフリー条件下では認められなかった。(図3)

[考察]

KMとEAの2剤投与時に観察されるGLU放出が、AP低下の第2相に一致することがわかった。AP低下の第1相はEAによる一過性EP低下が原因と考えられるが、第2相は組織学的にも確認された外有毛細胞障害によるものと思われる。したがって、EA静注後1~2時間で生じる外リンパGLUの上昇は、崩壊する外有毛細胞に由来することが推測される。しかもこの変化が、細胞外カルシウムに依存することが示されたことより、外有毛細胞障害の進展にカルシウムが深く関連していることが示唆される。

[結論]

KMとEAの2剤投与時に大量に放出されるGLUの起源として、崩壊する外有毛細胞由来のものが示唆される。外リンパ腔に放出されたGLUが興奮毒性を発揮することにより、KM毒性による有毛細胞障害を増強している可能性がある。細胞外カルシウムに依存したラジカル発生の機序など、有毛細胞障害におけるカルシウムの具体的役割について研究を進める必要がある。

[参考文献]

- 1) Eybalin M., Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol. Rev.* 73, 309-373, 1993
- 2) Matsuda K., Komune S., Tono T., Yamasaki M., Haruta A et al. A role of glutamate in drug-induced ototoxicity: In vivo microdialysis study combined with on-line enzyme fluorometric detection of glutamate in the guinea pig cochlea. *Brain Res.* 2000 (in press)

[研究発表]

〈論文発表〉

Matsuda K., Komune S., Tono T., Yamasaki M., Haruta A et al. A role of glutamate in drug-induced ototoxicity: In vivo microdialysis study combined with on-line enzyme fluorometric detection of glutamate in the guinea pig cochlea. *Brain Res.* 2000 (in press)

〈学会発表〉

日本耳科学会総会（1999）

Inner ear biology workshop（1998, Innsbruck）

[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

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide の 蝸牛内発現とその局在

分科会員 東野 哲也 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 河野 浩万・下 蘭 政 巳
小宗 静 男 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、グルタミン酸により誘導される種々の神経細胞内シグナルを増強する作用のある生理活性ペプチドである。求心性伝達にグルタミン酸を用いている蝸牛でも重要な役割を担っていることが示唆されるため、PACAPとそのレセプターの蝸牛内発現について分子生物学的手法を用い検討を行った。PACAPは、ラセン神経節細胞と血管条辺縁細胞に発現が認められ、そのレセプターの発現も RT-PCR で確認された。

【研究目的】

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) は、セクレチン/グルカゴン/vasoactive intestinal polypeptide ファミリーに属する新しいメンバーで、中枢神経系および末梢神経系における新しい神経伝達物質、神経調節因子として注目されている^{1), 2)}。現在 PACAP のレセプターには、3 種類 (PAC1, VPAC1, VPAC2) が同定されている¹⁾。PACAP の興味深い作用のひとつに、グルタミン酸により誘導される神経細胞内シグナルの増強作用がある³⁾。グルタミン酸は、蝸牛における求心性神経伝達物質であることから、PACAP が蝸牛においても神経調節因子として重要な役割を担っている可能性がある。昨年度、予備実験としてマウス蝸牛における PACAP の発現を RT-PCR 法により検討した結果を報告した。本年度は、ラット蝸牛における PACAP mRNA の局在と PACAP レセプターの発現について検討した結果を報告する。

【研究方法】

RT-PCR 法：動物は、体重 100-120g の wister 系ラットを用いた。ネブタール深麻酔後、断頭し蝸牛のみを摘出、RNA を抽出後、逆転写酵素により cDNA

を合成した。Positive control として脳を用いた。PACAP と PACAP レセプターにそれぞれ特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にてそのサイズを確認した。

RNA probe の作成：PACAP の PCR 産物をベクタープラスミドに組み込み、サブクローニングを行った。精製した recombinant plasmid を適当な制限酵素にて直線化し、In vitro transcription にてジゴキシゲニン標識のセンスとアンチセンス cRNA プローブを作成した。

In situ hybridization：wister 系ラットを麻酔後、4% パラホルムアルデヒド + 0.5% グルタルアルデヒド固定液で経心還流を行った後、蝸牛を摘出し同固定液にて一晩浸漬固定した。脱灰後パラフィンに包埋し 3 μm 厚の切片を作成した。脱パラ後、20 μg/ml の proteinase K 溶液中で 37℃、30 分間処理後、切片と cRNA プローブを一晩 45℃ で反応させた。洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体と反応させた後、発色反応を行った。

【倫理面への配慮】

組織採取は、多量の麻酔下で苦痛を与えずに断頭した後に行った。

【研究結果】

RT-PCR 法：PACAP とそのレセプター PAC1, VPAC1, VPAC2 すべての発現をラット蝸牛で認めた。ラット脳においても同じサイズの PCR 産物が認められた。

In situ hybridization 法：PACAP アンチセンスプローブを用いた In situ hybridization 法で、ラセン神経節細胞と血管条辺縁細胞に陽性反応が認められた (図 1)。陽性反応は、細胞質に局限して認められた。センスプローブと反応させた切片では、特異的反応は認められなかった。

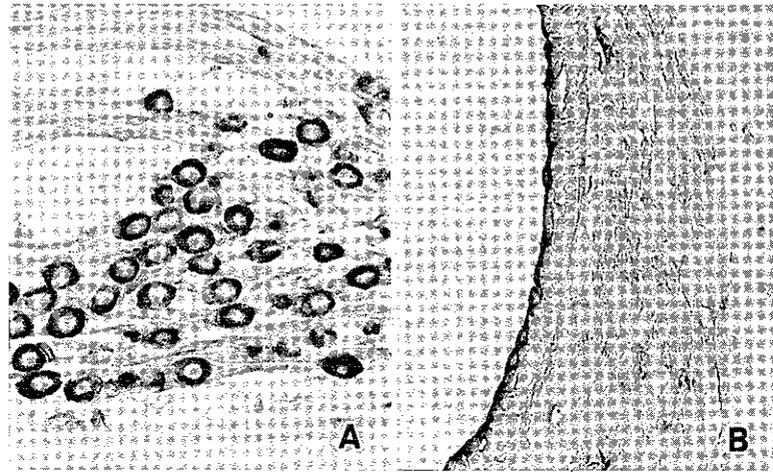


図1 PACAP アンチセンスプローブを用いた In situ hybridization 法。ラセン神経節細胞(A)と血管条辺縁細胞(B)に陽性反応が認められる。

[考 察]

PACAPがラセン神経節細胞に発現したことは、本ペプチドが蝸牛において神経調節因子として作用している可能性が示唆される。ラセン神経節細胞において、内毛細胞からのグルタミン酸シグナルの調節に関与し、ひいては興奮毒性の制御にも積極的に関わっている可能性がある。蝸牛管側壁では、PACAPが血管条辺縁細胞から内リンパ液中に分泌され、血管条 (autocrine) や内リンパ嚢 (paracrine) に作用して内リンパ液の恒常性に関与している可能性も考えられる。

PACAPは脳において神経栄養因子としての作用が証明されており⁴⁾、グルタミン酸による興奮毒性を制御する治療薬として臨床応用も期待される。蝸牛においても細胞受傷性を制御するペプチドとして役割を演じている可能性が高い。内耳におけるレセプターの局在と機能的役割について現在検討中である。

[結 論]

ラセン神経節細胞と血管条辺縁細胞にPACAPの発現が認められ、レセプターである PAC1, VPAC1, VPAC2の発現も確認された。本ペプチドが蝸牛において、神経調節因子や神経栄養因子として機能している可能性が示唆される。

[参考文献]

- 1) Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, et al : Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164 : 567-574, 1989.

- 2) Arimura A : Perspectives on pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the neuroendocrine, endocrine, and nervous systems. *Jpn J Physiol* 48 : 301-331, 1998.

- 3) Stella N and Magistretti PJ : Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) potentiate the glutamate-evoked release of arachidonic acid from mouse cortical neurons. Evidence for a cAMP-independent mechanism. *J Biol Chem* 271 : 23705-23710, 1996.

- 4) Morio H, Tatsuno I, Hirai A, et al : Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Research* 741 : 82-88, 1996.

[研究発表]

〈論文発表〉

Kawano H, Shimozono M, Tono T, Miyata A, Komune S : The expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide mRNA in the cochlea of rats. *Brain Res* (submitted).

〈学会発表〉

第9回 日本耳科学会総会

[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

限局性蝸牛障害モデルにおける NMDA 受容体の役割

分科会長 星野知之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 大 蝶 修 司・竹 下 有
 岩 崎 聡・森 田 浩 史
 水 田 邦 博 (浜松医大耳鼻咽喉科)
 梅 村 和 夫 (浜松医大薬理)

【研究要旨】

急性感音性難聴の原因の一つとして血管条の血流障害が考えられている。これまで我々は光増感反応をもちいてこの血管条障害の動物モデルをつくり様々な検討を行ってきた。今回はグルタミン酸受容体拮抗薬の一つである(+)MK-801をもちいて本モデルにおける内耳障害について形態学的、生理学的に検討した。グルタミン酸受容体拮抗薬の前投与によって光増感反応による内耳障害は軽減することができた。

【研究目的】

近年、急性感音難聴、ことに聴力が回復しうる難聴の原因のひとつとして蝸牛血流障害や血管条障害が考えられている。従来、蝸牛血流障害の病態解明のために様々な実験モデルが作製されてきたが、蝸牛に外科的侵襲を加えることなく任意の部位に障害をつくることはできなかった。我々は、光増感反応を利用してモルモットの蝸牛外側壁(血管条を含む)に限局障害をつくることに成功し、さらに血管条の障害が蝸牛有毛細胞に与える影響について形態学的に検討し、これまで発表してきた。今回は、NMDA受容体拮抗薬である(+)MK-801を投与し、このモデルにおける内耳障害について形態学および生理学的に検討したところ、興味ある知見を得たので報告する。

【研究方法】

プライエル反射陽性の白色モルモット雄62匹(260-350g)を用いた。pentobarbital 30 mg/kg i.p.の全身麻酔下においてventral approachにて左中耳骨包を開放した。(+)MK-801 (0.1mg/kg or 0.3mg/kg) or saline i.p.の10分後に外頸静脈よりRose Bengal (20 mg/kg) or salineを投与し、緑色光を蝸牛外側壁接線方向に照射することによって障害を作成した。形態学的検討

は(+)MK-801投与群とsaline投与群につき照射1週間後に走査型電子顕微鏡(SEM)にて蝸牛有毛細胞の残存数を計測(n=20)し、生理学的検討は照射前および24時間後に蝸牛神経複合活動電位(CAP)閾値を測定(n=42)した。

【倫理面への配慮】

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

【研究結果】

SEMにより観察した有毛細胞数の変化について示す(図1A, B)。内有毛細胞については有意な変化は認めなかった。外有毛細胞については光増感反応のみの群では有意に($p<0.01$)減少を認めたが、(+)MK-801投与にて(0.1mg/kg, 0.3mg/kg)この減少は有意に($p<0.01$)抑制された。CAPの変化については、照射前においてはどの群間にも有意差を認めなかった。24時間後において光増感反応のみの群はコントロール群に比べ有意に($p<0.01$)CAP閾値の上昇を認めたが、(+)MK-801投与にて(0.1mg/kg, 0.3mg/kg)閾値上昇は有意に($p<0.05$)抑制された(図2)。

【考 察】

光増感反応を用いて、モルモット蝸牛外側壁に限局した障害を作製し、その蝸牛外側壁障害によって外有毛細胞の障害が二次的に引き起こされ、この内耳障害はNMDA受容体拮抗薬によって形態学的にも生理学的にも軽減することができた。

今回の結果より、光増感反応による蝸牛障害において、グルタミン酸の関与が示唆された。

【結 論】

グルタミン酸受容体拮抗薬である(+)MK-801の投与によって光増感反応による蝸牛限局性障害モデル

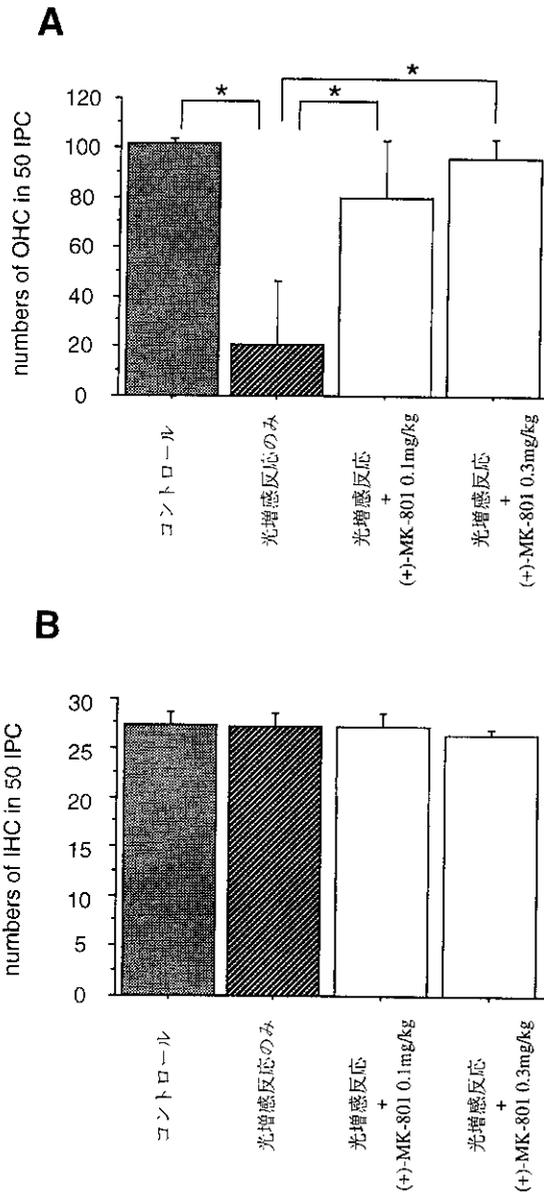


図1A SEM写真上にてカウントした外有毛細胞数。コントロール群に対して光増感反応のみの群では有意に細胞数の減少を認めるが、(+)-MK-801投与群においてはどちらの濃度においても細胞数の減少を有意に抑制した。

図1B SEM写真上にてカウントした内有毛細胞数。どの群においても有意な変化を認めなかった。

において、その内耳障害は形態学的にも生理学的にも軽減することができた。本モデルは内耳性難聴、特に血管条性難聴の病態解明および治療に役立つものとする。

[参考文献]

1) Ocho, S., Iwasaki, S., Umemura, K. and Hoshino, T.

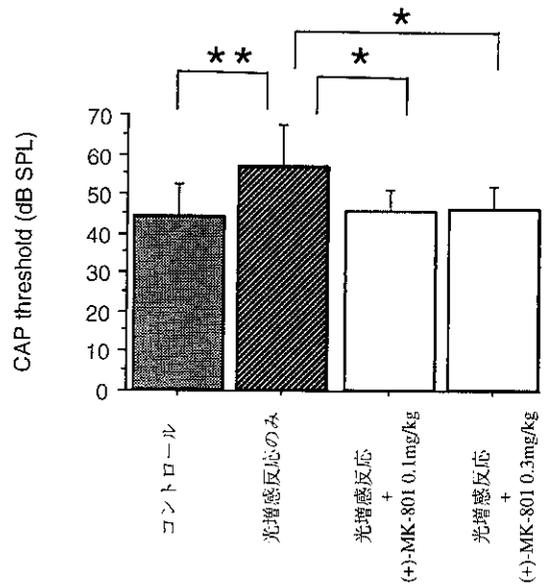


図2 照射24時間後のCAP閾値の変化。コントロール群に対して光増感反応のみの群では有意に閾値の上昇を認めたが、(+)-MK-801投与群においてはどちらの濃度においても閾値の上昇を有意に抑制した。

A new model for investigating hair cell degeneration in the guinea pig following damage of the stria vascularis using a photochemical reaction (in press) European Archives of Oto-Rhino-Laryngology

[研究発表]

〈論文発表〉

Ocho, S., Umemura, K. and Hoshino, T. Effects of a NMDA receptor antagonists, (+)-MK-801, in photochemical injury of the guinea pig inner ear. (in submitting)

〈学会発表〉

第9回 日本耳科学会総会

[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