

## E. 結 論

メニエール病の病因の一つとして内耳における免疫反応が示唆され、患者血液中より免疫複合体あるいは内耳に対する抗体が検出されている。本実験は、陽性に荷電したヒストンを用いて自己免疫疾患を有しない個体でも内耳局所において抗原抗体反応に基づく免疫沈着が起こりうることを証明した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- ・ 朴沢 孝治：耳介の解剖. JOHNS 17, 2, 11-14, 2001
- ・ Hozawa K., Furukawa K., Shoji F., Kakehata S., Takasaka T., : Surgical management of adhesive otitis media. Proceedings of the 7th International Symposium on Recent Advances in Otitis Media. edit. DJ.Lim, et al. BC Decker, 2001
- ・ 朴沢孝治：外耳、中耳. CLENT 21 No. 6 聴覚 pp 65-68、2000 野村恭也他編、中山書店

### 2. 学会発表

- ・ Koji Hozawa : Distribution of Glycoconjugates in Tectorial Membrane. 6th International Society of Otopathology, HFS Society
- ・ 朴沢孝治、香取幸夫、高橋千穂：咽喉頭異常感症に対するプロトンポンプインヒビターの治療効果. 日本耳鼻咽喉科学会総会
- ・ Koji Hozawa, Seiji Kakehata, Mika Adachi, Tomonori Takasaka : Cytokine and Pathogenesis of Attic Cholesteatoma. 6th International Conference on Cholesteatoma and Ear Surgery
- ・ Seiji Kakehata , Koji Hozawa, Hiroshi Daido, Tetsuaki Kawase, Tomonori Takasaka : Evaluation of the Retraction Pockets by Microfiberoptic Endoscopy
- ・ Koji Hozawa, Yukio Katori, Chiiho Takahashi : Achromatic Analysis of Post-laser surgery Voice of Patients with Laryngeal Cancer. 6th International Symposium of Phonosurgery Thyroplasty for Presbyphonia

## G. 知的所有権の取得状況

なし

#### IV. 分 担 研 究 報 告

## 1. 感音難聴患者末梢血のリンパ球分画の変化：第2報

八木聰明、ルビーパワンカー、池園哲郎、愛野威一郎、馬場俊吉（日本医科大学 耳鼻咽喉科）

### [Abstract]

Immunological alterations in the lymphocyte profile in sensorineural hearing loss -Toshiaki Yagi, Ruby Pawankar, Tetsuo Ikezono, Ichiro Aino, Shunkichi Baba.

Nippon Medical School, Department of Otorhinolaryngology.

[Purpose] The present study was designed to investigate the changes in the phenotypes and function of lymphocytes in the peripheral blood of patients with sensory neural hearing loss and its relation to disease.

[Method] Peripheral blood lymphocytes were purified from patients with sudden deafness, Meniere's disease, delayed hydrops, cholesteatoma, otosclerosis and normal subjects. Analysis for the phenotypes of lymphocytes was performed using two colour flow cytometry.

[Results] In Sudden deafness, delayed hydrops and Meniere's disease the proportion of CD4+ T cells were decreased leading to a lower CD4 : CD8 ratio as compared to that in normals. A significant increase in the proportion of memory T cells (CD4+ CD45RO+ ) was also observed in these patients. Furthermore, in Meniere's disease there was a reduction in the proportion of suppressor T cells (CD8+ CD11b+ ), and an increase in CD4+ HLA-DR+ cells and gd T cells. Alterations were also observed in gd T cell subsets.

[Conclusion] Based on the central premise that the source of immunocompetent cells in the inner ear are from the systemic circulation, the changes in the proportion of lymphocyte subsets in the peripheral blood may at least in part reflect alterations in the proportion and phenotypes of lymphocytes in the inner ear also. Further studies are ongoing to precisely elucidate the functional alterations in these lymphocytes.

### [はじめに]

Several studies have suggested an immunological etiology in inner ear disease. It is also said that these immune-mediated inner ear diseases result in rapid progressive, bilateral sensory neural hearing loss (SNHL). Moreover, the clinically beneficial effect of steroids in the treatment of some of these SNHL further support an immune-mediated etiology in at least some of these inner ear diseases. Again, studies show that the major source of immunocompetent cells in the inner ear may be derived from the peripheral circulation. However, there are no detailed studies on the characteristics of lymphocyte subsets in the peripheral blood of patients with sensorineural hearing loss. The present study was designed to elucidate the changes in the phenotypes and status of activation of lymphocyte subsets in the peripheral blood compartment of patients with sensory neural hearing loss (SNHL), TCR usage, cytokine profile and response to specific antigen.

### [対象と方法]

Ten millilitres of peripheral blood was collected from patients with sudden deafness, Meniere's diseases, delayed hydrops, cholesteatoma, otosclerosis and normal individuals. The lymphocytes were purified by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation. Subsequently, the lymphocytes were stained with the relevant monoclonal antibodies to various cell surface antigens and the lymphocyte subsets were then analyzed by two colour flow cytometry using a FACS Scan.

(Becton & Dickinson) The proportion of lymphocyte subsets were then calculated and compared with that of normal subjects.

#### [考案・結論]

In Sudden deafness, delayed hydrops and Meniere's disease the proportion of CD4+ T cells were decreased and therefore the lymphocyte profile showed a lower CD4 : CD8 ratio as compared to that in normals. On the other hand, there was an a significant increase in the proportion of memory T cells (CD4+ CD45RO+ ) in these patients. Furthermore, in Meniere's disease there was a reduction in the proportion of suppressor T cells (CD8+ CD11b+ ), and an increase in CD4+ HLA-DR+ cells and gd T cells. Alterations were also observed in gd T cell subsets.

Based on the central premise that the immunocompetent cells in the inner ear originate primarily from the systemic circulation, the changes in the proportion of lymphocyte subsets in the peripheral blood may at least in part reflect certain alterations in the proportion of immunocompetent cells in the inner ear also. Further studies are ongoing to precisely elucidate the functional alterations in these lymphocytes.

#### [参考文献]

- 1) Harris JP, and Ryan AF. Fundamental immune mechanisms of the brain and inner ear. *Otolaryngol Head & Neck Surg* 112 (6) 639-653.
- 2) Ikeda K, Kobayashi T, Itoh Z, et al. Immunological alteration of the serological test in bilateral sensorineural hearing loss. *ORL Otolaryngol Related Spec.* 51: 268-275, 1989.
- 3) Mayot D, Bene MC, Dron K, et al. Immunological alterations in patients with sensorineural hearing loss. *Clinical Immunology & Immunopathology.* 68: (1) 41-45, 1993.
- 4) Savastano M, Raffael C, De Franchis, Andreoli C. Antigen non-specific immunological tests in progressive sensorineural hearing loss. *Eur Archives of Oto-Rhino-Laryngology.* 251 (5) : 275-7, 1994.
- 5) Kanzaki J, Inoue Y, O-Uchi T. Immunological findings of serological tests in steroid responsive sensorineural hearing loss. *Acta Oto-Laryngologica.* 514 : 66-69, 1994.
- 6) Iwai H, Tomoda K, Inaba M, et al : Evidence of cellular supplies to the from the systemic circulation. *Acta Oto-Laryngologica.* 115 (4) 509-11, 1995.
- 7) Garcia-Berrocal JR, Vargas JA, Ramirez-Camacho RA, et al. Deficiency of naive T cells in patients with sudden deafness. *Arch Otolaryngol Head & Neck Surg* 123: 712-717,1995.

## 2. 2次元電気泳動法による内耳自己抗原の検索

八木聰明、池園哲郎、齋藤明彦、新藤 晋、ルビーパワンカー、大久保公裕（日本医科大学 耳鼻咽喉科）  
大森 彬（三菱化学生命科学研究所）

### [Abstract]

Detecting inner ear autoantibody by 2-D gel electrophoresis

Toshiaki Yagi (1) Tetsuo Ikezono (1) Akihiko Saitoh (1) Susumu Shindo (1) Ruby Pawankar (1)  
Kimihiro Ohkubo (1) Akira Omori (2)

(1) Dept. of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

(2) Mitsubishi kasei Institute of Life Science

[Purpose] The aim of the present study was to identify the autoantibody in patients with sensorineural hearing loss (SNHL) using 2D western blotting.

[Method] Bovine inner ear tissue were subjected to 2-D gel electrophoresis. The first dimension electrophoresis was done using an electrofocusing apparatus, Multiphor II, and Immobiline Dry Strips. Strips were casted onto slab gels and the second-dimension separation was performed. Protein containing regions detected by Coomassie blue stain were excised and subjected to N-terminal or internal amino acid sequencing using reverse-phase HPLC apparatus and an automated gas phase protein sequencer. For western blotting, 2-D gels were blotted onto PVDF membranes in semidry blotting apparatus. The blots were incubated with sera from SNHL patients for 12 hours and IgGs bound to the target antigens were detected.

[Results] Autoantibodies in the serum of 5 patients with delayed endolymphatic hydrops and one case with Meniere's disease were analyzed. HSP70, enolase  $\alpha$  and F1-ATPase were detected as autoantigens.

[Conclusion] Screening of sera from SNHL patients by 2-D gel western blotting and direct protein sequencing might give us a clue to find the inner ear specific pathogenic antigens. Discovery of these antigens will lead us towards therapeutic options, such as antigen specific immunotherapy, for SNHL.

### [はじめに]

自己免疫反応によって難聴が生じている可能性があるのは、両側進行性感音性難聴、ステロイド依存性難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫等である。しかし、ヒト難聴症例の内耳生検は一般に行われておらず、病理所見が得られることは非常に稀である。ここに自己免疫性難聴の研究の難しさがあり、病理組織学的に自己免疫性難聴が完全に証明されているとは言い難い。（両側進行性難聴患者の剖検例で内耳にリンパ球浸潤が著明にみられたとする報告が1例ある<sup>1)</sup>）。

そこで、難聴症例の血中抗内耳抗体を検出する試みがなされ、1次元電気泳動ウェスタンブロットにより自己抗原を検出した報告が相次いだ<sup>2)</sup>。当科でもいくつかの陽性バンドを報告してきた<sup>3)</sup>。諸外国の報告も参考にすると、これらの自己抗原の中でも68kDa抗原が最も疾患特異性が高いものと考えられ、1995年にこの68kDa抗原はHSP70だと報告された<sup>4)</sup>。その後、その他の施設からも同様の報告が相次いだ。

しかし、昨年度のAROでのKresge Hearing Res Instituteの報告によると抗HSP70抗体の陽性率は難聴患者と正常聴力患者との間で差は無かった。さらに、メニエール病患者における抗HSP70抗体の検出率は正常聴力患者との間で差は無かったことが報告された<sup>5)</sup>。今まで、最も疾患特異性が高いと思われてきた抗HSP70抗体の臨床上的有用性は否定されつつある。このように現在のところ自己免疫性感音性難聴の原因抗原の候補はいくつか報告されているものの、診断に有用な原因抗原を同定するには至っていない。

一方、我々の動物実験の結果、牛内耳蛋白で感作したマウスの内耳にリンパ球主体の炎症細胞浸潤が生ずること<sup>6)</sup>、感作マウスのリンパ球の受身移入で、正常マウスの内耳にリンパ球浸潤、内リンパ水腫が惹起されることが明らかになった<sup>7)</sup>。これらの結果は、内耳に臓器特異的な自己抗原が存在する事を強く示唆している。

今回の研究の目的は自己免疫性内耳障害（これには前庭機能障害、難聴の両方が含まれる）の原因抗原の探索である。今までの1次元ウェスタンブロッティングでは、患者血清中の自己抗原蛋白はバンドとして検出され、その分子量で議論されてきた。この方法ではそのバンドの中には数種類の蛋白が含まれている。2次元ウェスタンブロッティングでは陽性蛋白はスポットとして検出され、抗原蛋白を直接同定できる。このため同定した蛋白そのものの臨床的意義を議論する事が出来る。

### [対象と方法]

①牛内耳から蛋白を抽出する。②固定化pH勾配ゲルストリップを用いて1次元目の等電点電気泳動を行う。③SDS変性下平板ゲル電気泳動で2次元目の分子量で分ける泳動を行う。④2次元ウェスタンブロッティングを行い、感音難聴患者の血清と反応させることで陽性スポットを同定。⑤陽性蛋白スポットのアミノ酸配列を解析。

### [結果]

#### 2次元ウェスタンブロッティングの結果

遅発性内リンパ水腫患者5例、メニエール病患者1例の血清が認識した蛋白は以下のようであった。

#### a. HSP70（6例中2例より検出）

SLEなどの主要な自己免疫疾患では、抗HSP70抗体は陰性であり、自己免疫疾患の中でも陽性になる疾患はクローン病など非常に稀である。感音難聴患者での抗HSP70抗体は何らかの意義があるであろう。

#### b. enolase $\alpha$ （6例中3例より検出）

DLE、Cancer associated retinopathy、Primary Sclerosing Cholangitis、Inflammatory Bowel synd.などで自己抗原となる事が知られている。

#### c. F1-ATPase（6例中2例より検出）

自己免疫性胃炎(悪性貧血)、原発性胆汁性肝硬変で自己抗原となっている。renal tubular acidosisで、その活性が落ちている事が知られている。

### [考案・結論]

今回検討した6例の自己抗体が認識する抗原としてATP合成に関与する蛋白が同定された。この蛋白は内耳特異的ではなくubiquitousなものであった。ubiquitousな蛋白でも臓器特異的疾患の抗原となることは良く知られている（例えばDMのグルタミン酸デカルボキシラーゼなど）。今後症例を増やしていくと、発症の原因となる抗原、内耳炎を増悪させ難聴を進行させるような抗原、内耳炎の結果生じた自己抗体が認識する抗原など、おそらく、数個の蛋白が自己抗原として同定されることが予測される。他の自己免疫疾患と同様に、それぞれの自己抗原に対する陽性率から、疾患との関連性、重要性を検討する。自己抗原の同定が、内耳性難聴、めまいの病態解明、発症予防、難聴の治療など多くの問題解決に寄与する事が期待される。

### [参考文献]

- 1) Schuknecht HF: Ear pathology in autoimmune disease. Adv Otorhinolaryngol 1991;46:50-70.
- 2) Harris JP, Sharp PA: Inner ear autoantibodies in patient with rapidly progressive sensorineural hearing loss. Laryngoscope 1990 May;100(5):516-24

- 3) 小坂 和己ら 感音難聴患者の内耳自己抗体に関する研究 1997 日耳鼻100(2): 205-212
- 4) Billings PB, Keithley EM, Harris JP; Evidence linking the 68 kilodalton antigen identified in progressive sensorineural hearing loss patient sera with heat shock protein 70. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1995 Mar;104(3):181-8
- 5) Rauch SD, Zurakowski D, Bloch DB, Bloch KJ; Anti-heat shock protein 70 antibodies in Meniere's disease. *Laryngoscope* 2000 Sep;110(9):1516-21
- 6) Tomiyama S, Jinnouchi K, Ikezono T, Pawankar R, Yagi T : Experimental autoimmune labyrinthitis induced by cell-mediated immune reaction. *Acta Otolaryngol* 1999;119(6):665-70
- 7) Ikezono T, Tomiyama S, Pawankar R, Jinnouchi K, Suzuki Y, Yagi T : Passive transfer of the experimental autoimmune labyrinthitis. *Audiol Neurootol* 2000 5(5):292-9

### 3. 内耳プロテオーム解析によるCOCH遺伝子発現の検討

八木聡明、池園哲郎、新藤晋、ルビーパワンカー（日本医科大学 耳鼻咽喉科）

渡邊 篤（日本医科大学 第2生化学）

大森 彬（三菱化学生命科学研究所）

#### [Abstract]

Proteomic analysis of the COCH gene expression in the inner ear

Toshiaki Yagi (1) Tetsuo Ikezono (1) Susumu Shindo (1) Ruby Pawankar (1) Akira Omori (2) Atsushi Watanabe (3)

(1) Dept. of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School, Tokyo

(2) Mitsubishi kasei Institute of Life Sciences

(3) Dept. of Molecular Biology, Nippon Medical School, Tokyo

[Purpose] In order to better understand the cause of hereditary hearing impairment, we have performed a proteomic analysis of the inner ear proteins using 2D-GE.

[Method] Bovine inner ear tissue were subjected to 2-D gel electrophoresis. The first dimension electrophoresis was done using an electrofocusing apparatus, Multiphor II, and Immobiline Dry Strips. Strips were casted onto slab gels and the second-dimension separation was performed. Protein containing regions detected by Coomassie blue stain were excised and subjected to N-terminal or internal amino acid sequencing using reverse-phase HPLC apparatus and an automated gas phase protein sequencer.

[Results] In the process of analysis, we have found very unique properties of the bovine homolog of protein product of the human COCH gene product. The COCH gene is responsible for one of the hereditary hearing impairment, DFNA9, and was recently suggested to be the possible genetic factors contributing to Meniere's disease. The Coch protein occupies 70% of bovine inner ear proteins and is composed of 16 different protein spots, with charge and size heterogeneity. Heterogeneity of this protein suggests that the Coch gene expression is processed in several ways, at the transcriptional and/or posttranslational level.

[Conclusion] Much knowledge has accumulated about the hereditary hearing impairment genes, however, little research has been done regarding the protein products of those genes. This is the first report to characterize the Coch protein. Study of the Coch protein might provide more information on the mechanism of hearing and vestibular disorders.

#### [はじめに]

ポストゲノムプロジェクトの研究課題が各分野で模索されている。中でも、2次元電気泳動法を用いたプロテオームプロジェクトは大きな注目を集めており、既にいくつかの分野で重要な知見が得られている。DNA、蛋白データベースが非常に発達している現在、このデータベースを有効活用すれば蛋白の部分配列を解析することにより、迅速に蛋白を同定しその生理的意義、病理学的動態を検討することが出来る<sup>1)</sup>。このプロジェクトでは遺伝子レベルではなく蛋白レベルに焦点をあてている。その理由は、病気の発症、増悪、治癒等のプロセスを実際に生じさせているのは蛋白だということにある。変異した遺伝子が機能しない不完全な蛋白を作り、これが難聴、めまいを起こさせる。将来的に治療法の開発まで視野に入れた場合、蛋白レベルの研究を欠かす事は出来ない。

内耳研究の分野ではThalmanらが、1990年に2次元電気泳動法を用いて内耳組織蛋白の解析を行い、



organ of corti protein 1、2等の蛋白を同定した。しかし、当時は蛋白同定に関わるデータベースは現在のように充実しておらず、その後の大きな発展は見られなかった<sup>2)</sup>。

今回我々はウシ内耳蛋白のプロテオーム解析を行い非常にユニークな知見を得た。

#### [対象と方法]

①牛内耳から蛋白を抽出する。②固定化pH勾配ゲルストリップを用いて1次元目の等電点電気泳動を行う。③SDS変性下平板ゲル電気泳動で2次元目の分子量で分ける泳動を行う。④蛋白スポットのアミノ酸配列を解析。⑤データを集積 内耳蛋白の2次元電気泳動マップ作成する事で内耳プロテオーム解析を進める。

#### [結 果]

常染色体優性遺伝性難聴の一つである、DFNA 9の原因遺伝子、COCH<sup>3)</sup>の蛋白産物が内耳の構成蛋白の70%を占めること、COCH遺伝子産物は3つの異なったN末端をもち、等電点も異なる全部で16個の蛋白から構成されているというユニークな事実を明らかにした<sup>4)</sup>。内耳蛋白2次元泳動の全体像 (fig. 1 a) と、COCH蛋白部分の拡大図 (fig. 1 b) に示した。

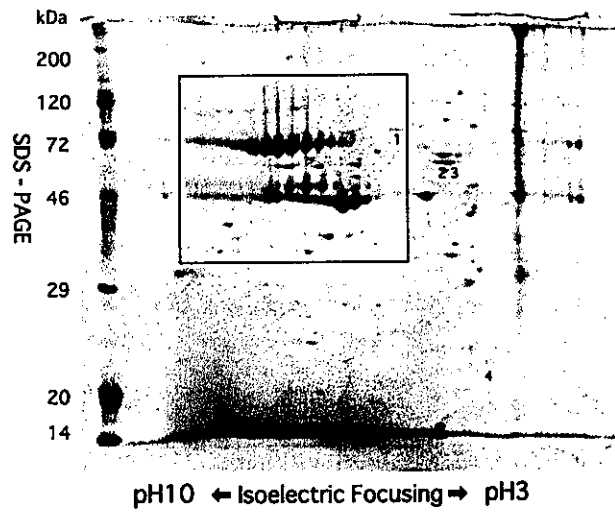
#### [考案・結論]

COCH遺伝子は最近メニエール病の発症に関わり、めまいをも起こす原因となる遺伝子であることが示され<sup>5)</sup>、上記蛋白レベルでの発現の特異性も併せて考えると内耳機能にとって非常に重要な遺伝子であることは間違いない。今後はCOCH遺伝子産物の組織内局在、内耳の部位別の発現パターン等について更に検討を加え機能解析を行いたい。

#### [参考文献]

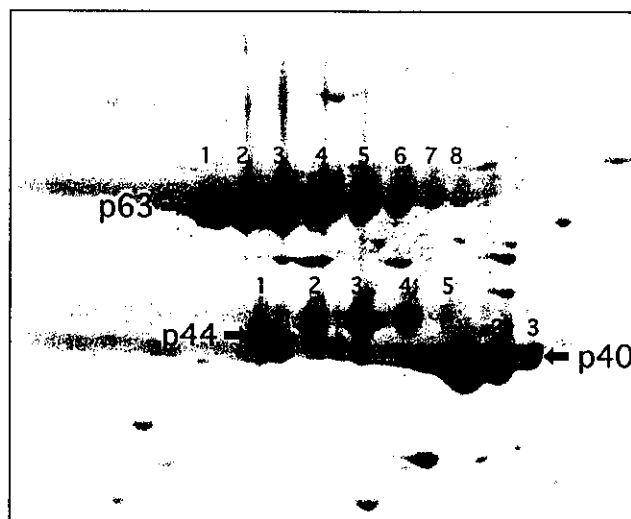
- 1) Walter P. Blackstock and Malcolm P. Weir : Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. Trends in Biotechnology 17;121-127 1999
- 2) Thalmann I, Takahashi K, Varghese J, Comegys TH, Thalmann R : Biochemical features of major organ of corti proteins (OCP-1, OCP-2) including partial amino acid sequence. Laryngoscope 1990; 100: 99-105.
- 3) Robertson, N.G., Lu, L., Heller, S., Merchant, S.N. et al. : Mutations in a novel cochlear gene cause DFNA9, a human nonsyndromic sensorineural deafness with vestibular dysfunction. Nature Genet., 20, 299-303. (1998)
- 4) Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T : Identification of the protein product of the Coch gene - hereditary deafness gene - as the major component of bovine inner ear protein. Biochimica Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease (in press)
- 5) Fransen E, Verstreken M, Verhagen WI et al. : High prevalence of symptoms of Meniere's disease in three families with a mutation in the COCH gene. Hum Mol Genet 1999 Aug;8(8):1425-9

fig. 1a



1. B S A
2.  $\alpha$  - tublin
3.  $\beta$  - tublin
4. O C P - 2

fig. 1b



\*ナンバリングされたスポットは、すべてCOCH遺伝子産物

## 4. 内耳有毛細胞の分化と再生

伊藤壽一（京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学講座耳鼻咽喉科・頭頸部外科学）

### [Abstract]

Survival of adult-derived neural stem cells in the cochlea

Juichi Ito, Department of Hearing and Speech Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University

Cell cultures of fetal inner ear sensory epithelial cells have not been established yet because of difficulties in isolating a sufficient number of cells required. Here we succeeded in establishing such culture system.

Embryonic day 12 rat otocysts were dissociated mechanically, and plated in serum-free media with epidermal growth factor (EGF). Seven days in vitro, epithelial-like colonies developed. These colonies expressed cytokeratin that is an epithelial cell marker and nestin that is a neural stem cell marker. Mesenchymal cells and Schwann cells mostly died under this culture condition. These results suggest that EGF-responsive fetal sensory epithelial cells are undifferentiated.

### [はじめに]

近年中枢神経の研究領域において、旺盛な自己複製能と様々な細胞へ分化が可能な多分化能を持つ胎仔幹細胞や神経幹細胞などの未分化な細胞が損傷した神経系の機能を回復させるために利用できるのではないかと注目されている。すでに神経幹細胞の培養系は確立されており<sup>1), 2), 3)</sup>、神経細胞の分化・再生の研究として、さらには、移植療法など臨床応用を考慮した研究が進められている<sup>4)</sup>。

内耳有毛細胞は音響や耳毒性を持つ薬物、加齢により損傷し、一旦脱落してしまうとその後再生しない。そのため、有毛細胞の脱落により聴覚・平衡覚が失われてしまえば、その機能は永久に回復しない。しかし、器官培養系では成熟した哺乳動物においても有毛細胞の再生が起こることが知られており<sup>5)</sup>、中枢神経系と同様に生体内では本来持っている再生能力が何らかの機構で抑制されていることが示唆される。一方で、未分化な細胞は移植された場に応じて分化する能力を持っていることが知られており<sup>6), 7)</sup>、損傷した内耳感覚器に対しても幹細胞や前駆細胞などの未分化な細胞は移植の材料として利用できるのではないかと考えられる。

しかしながら、現在までのところ、内耳感覚上皮の幹細胞や前駆細胞は単離同定されていない。内耳は有毛細胞などの感覚上皮細胞のみならず、神経細胞やシュワン細胞、線維細胞など様々な細胞で構成されるため、感覚上皮細胞を単離し培養に必要な数を集めることが困難であり、感覚上皮細胞を培養する方法が確立されていないことも幹細胞や前駆細胞を単離できていない原因の一つと考えられる。今回我々は、耳胞感覚上皮細胞の分裂に重要な役割を果たしているEGF<sup>8), 9), 10)</sup>に着目し、幹細胞や前駆細胞が豊富に存在すると考えられる胎生12日のラット胎仔の耳胞から感覚上皮細胞を選択的に培養する方法を確立した。

### [方法]

胎生12日のWistar系ラットの胎仔耳胞細胞を用い初代培養を行った。耳胞周囲の中胚葉組織を可及的に除去した後、耳胞を機械的に分散し24穴培養プレート内のリジン処理されたカバーガラス上に1穴あたり $1.5 \times 10^5$ 個の細胞を播種した。培養液には神経細胞を培養するために開発されたN2サプリメント(Gibco)とDMEM/F12 (Gibco)を組み合わせた無血清培地に上皮増殖因子 (epidermal growth factor: EGF, Pepro Tech, 40ng/ml) を添加した培地 (EGF培地) を用いた。対照としてEGF無添加の培地を用いた。培養開始後3日目に培地を交換し、培地交換と同時に細胞のDNA合成能を調べるため、5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, 10mM, Sigma) を培地に加えた。

培養7日目に4%PFAで固定し、細胞がどのような性質を持つのか免疫蛍光抗体法で調べた。一次抗体に、サイトケラチン(Sigma)、S-100(Sigma)、カルビンディン(Chemicon)、ネスチン(American Research Products)、glial fibrillary acid protein (GFAP, Sanbio)、ニューロフィラメント(200kD, Boehringer Mannheim)に対する抗体を用いた。二次抗体には蛍光色素Alexa 594で標識された抗マウスまたは抗ウサギ IgG抗体 (Molecular Probes) を用いた。アクチン線維は Alexa Fluor 488ファロイジン (Molecular Probes)を用いて可視化し、BrdUの取り込みはFITC標識された抗BrdU抗体(Becton Dickinson)を用いて調べた。培養細胞の核は4,6-diamino-2-phenylidole (DAPI, Boehringer Mannheim)で染色した。

## [結果]

EGF培地では、敷石状細胞が上皮様の斑状単層性のコロニーを形成した。これらの細胞は、サイトケラチン及びネスチンに対し免疫反応が陽性であったが、S-100、カルビンディン、GFAP、ニューロフィラメントに対しては陰性であった。また、細胞の核にはBrdUの取り込みが認められた。

## [考案・結論]

胎仔期の内耳では、サイトケラチンは感覚上皮細胞で発現し、神経細胞やシュワン細胞、線維芽細胞では発現しない<sup>11)</sup>。耳胞を摘出する際に耳胞感覚上皮以外の中胚様組織や神経組織を完全に除去することはできなかったが、EGF培地で上皮様のコロニーを形成した細胞は、サイトケラチンを発現していたが、神経細胞のマーカーであるニューロフィラメントやグリア細胞のマーカーであるGFAPは発現していなかった。EGF培地でコロニーを形成した細胞は、形態的にも免疫細胞学的にも、感覚上皮細胞由来と考えられた。また、EGF培地ではサイトケラチン陰性の線維芽細胞やシュワン細胞の増殖は抑制され、感覚上皮細胞のコロニーを単離する事が可能であった。

EGF培地でコロニーを形成した感覚上皮細胞は成熟した内耳で発現されるS-100やカルビンディン<sup>12), 13)</sup>に対しては陰性であったが、神経幹細胞のマーカーであるネスチンに対し陽性であった。ネスチンは当初、神経上皮幹細胞に特異的に発現する中間系フィラメントとして報告された<sup>14)</sup>が、現在では様々な系統の幹細胞で発現することが知られ、内耳感覚器においても、有毛細胞や支持細胞などに分化する幹細胞や前駆細胞などの未分化な細胞との関連が示唆されている<sup>15)</sup>。今回用いた胎生12日の耳胞には最終分裂以前の幹細胞や前駆細胞が存在すると考えられており<sup>16)</sup>、それら未分化な感覚上皮細胞がEGFに反応しコロニーを形成した可能性がある。

EGFは様々な細胞の分裂促進因子として知られ、コロニーを形成した細胞の核にBrdUが取り込まれていることや、山下ら<sup>8)</sup>やZhengら<sup>9)</sup>の報告からも、EGFは感覚上皮細胞の分裂増殖を促進していると考えられる。しかし、EGFを含まない無血清培地ではほとんどすべての細胞が死滅し、無血清培地だけでは感覚上皮細胞は生存できなかったことから、EGFは胎仔感覚上皮細胞の分裂のみならず、生存にも重要な役割を果たしていると思われる。内耳感覚上皮は発達期にEGF receptorを発現していることから、EGFは発達過程の感覚上皮細胞の生存と増殖の制御に関与している事が示唆される<sup>10)</sup>。

最近では不死化遺伝子を導入し、感覚上皮細胞を未分化な状態に維持し単離する試みがなされている<sup>15), 17), 18), 19)</sup>。しかしながら、不死化された細胞は導入遺伝子により人為的に増殖と分化が制御されており、移植療法などの臨床応用を前提とした研究には、より正常に近い形質を持つ不死化遺伝子の導入されていない細胞が有用であると考えられる。

本研究で用いたような無血清培地はその組成が分かっているため、ホルモンや栄養因子、増殖因子を適切に組み合わせて、目的とする細胞を選択的に培養することや培養細胞の増殖・分化を制御することが可能であるといわれている<sup>20)</sup>。今回の実験では、EGFを添加した無血清培地を用いることにより線維芽細胞やシュワン細胞の増殖を抑え、胎仔内耳感覚上皮細胞を選択的に培養することが可能であった。また、培養された感覚上皮細胞は未分化な状態であることが示唆された。今後、このような培養細胞を用いて内耳有毛細

胞の再生を目指した研究が期待される。

**[参考文献]**

- 1) Reynolds BA, Tetzlaff W, Weiss S : A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12 : 4565-74, 1992
- 2) Reynolds BA, Weiss S : Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Bio* 175 : 1-13, 1996
- 3) Palmer TD, Takahashi J, Gage FH : The adult rat hippocampus contains primordial neural stem cells. *Mol Cell Neurosci* 8 : 389-404, 1997
- 4) Svendsen CN, Smith AG : New prospects for human stem-cell therapy in the nervous system. *Trends Neurosci* 22 : 357-64, 1999
- 5) Lefebvre PP, Malgrange B, Staecker H, et al.: Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells. *Science* 260 : 692-5, 1993
- 6) Gage FH, Coates PW, Palmer TD, et al.: Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 11879-83, 1995
- 7) Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, et al.: Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283 : 534-7, 1999
- 8) Yamashita H, Oesterle, EC : Induction of cell proliferation in mammalian inner-ear sensory epithelia by transforming growth factor alpha and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 : 3152-5, 1995
- 9) Zheng JL, Helbig C, Gao WQ : Induction of cell proliferation by fibroblast and insulin-like growth factors in pure rat inner ear epithelial cell cultures. *J Neurosci* 17 : 216-26, 1997
- 10) Zin A.: Spatial expression patterns of epidermal growth factor receptor gene transcripts in the postnatal mammalian cochlea. *Hearing Research* 141 : 19-27, 2000
- 11) Kuijpers W, Peters TA, Tonnaer EL, et al.: Expression of cytokeratin polypeptides during development of the rat inner ear. *Histochemistry* 96 : 511-21, 1991
- 12) Dechesne CJ, Thomasset M : Calbindin (CaBP 28 kDa) appearance and distribution during development of the mouse inner ear. *Brain Res* 468 : 233-42, 1988
- 13) Pack AK, Slepecky NB : Cytoskeletal and calcium-binding proteins in the mammalian organ of Corti. *Hear Res* 91 : 119-35, 1995
- 14) Lendahl U, Zimmerman LB, McKay RD : CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60 : 585-95, 1990
- 15) Kalinec F, Kalinec G, Boukhvalova M, et al.: Establishment and characterization of conditionally immortalized organ of corti cell lines. *Cell Biol Int* 23 : 175-84, 1999
- 16) Ruben RJ : Development of the inner ear of the mouse: a radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryngol Stockh* 220: 1-44, 1967
- 17) Zheng JL, Lewis AK, Gao WQ : Establishment of conditionally immortalized rat utricular epithelial cell lines using a retrovirus-mediated gene transfer technique. *Hear Res* 117 : 13-23, 1998
- 18) Holley MC, Nishida Y, Grix N : Conditional immortalization of hair cells from the inner ear. *Int J Dev Neurosci* 15 : 541-52, 1997
- 19) Rivolta MN, Grix N, Lawlor P, et al.: Auditory hair cell precursors immortalized from the mammalian inner ear. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 265 : 1595-603, 1998
- 20) Freshney, RI : Culture of Animal Cells. A John Wiley and Sons Inc Publication, 2000

## 5. 人工内耳術後めまいの年次発生率の解析

久保 武、山本好一、井脇貴子 (大阪大学大学院 耳鼻咽喉科)

### [Abstract]

A sequential study for the occurrence rate of dizziness following cochlear implant.

Takeshi Kubo (1), Koichi Yamamoto (2), Takako Iwaki (3)

Department of Otolaryngology, Osaka University Graduate School of Medicine

[Purpose] A sequential study for occurrence rate of dizziness after cochlear implant operation.

[Method] The occurrence rate of dizziness after cochlear implant was studied on the basis of operations conducted from 1991 to 2000. Subjects were 161 cases, in which pre- and post-lingual deaf subjects, aged from 2 to 82 y.o. were included. Three groups of dizziness were noted such as the dizziness occurred immediately after the operation and subsided within one month (immediate type), the one lasted over one month (continuous type) and the vertigo abruptly occurred later than one month (delayed vertigo).

[Results] When the occurrence rate was compared with our own previous study, a slight decrease for immediate dizziness was noted. However, there was no difference in delayed vertigo. As far as the etiology of deafness is concerned, the immediate dizziness was found in each group of etiology, but delayed vertigo was not in meningitis group. As delayed vertigo occurred abruptly and lasted for a long period, this type of dizziness was the most hazardous.

[Conclusion] Dizziness after cochlear implantation does not depend on the technical refinement, but more depend on the pre-operative vestibular condition.

### [はじめに]

人工内耳埋め込み術後におこる合併症の一つとしてめまいがある。このめまいの発生率は、報告により0.4-47%まで様々である<sup>1) - 6)</sup>。この理由として、対象となった症例、取り上げるめまいの種類、手術手技などが影響していると考えられる。我々は、人工内耳術後のめまい(術後めまい)が、術直後型、持続型、遅発型に分類できることを報告してきた<sup>5), 7)</sup>。

本研究では、術後めまいの発生率を年次により検討し、その発生原因について考察した。この結果を1997年迄の集計結果と比較し、発生傾向に差があるかどうかについても検討した。

### [対象と方法]

当科にて、1991年から2000年4月までに人工内耳埋め込み術をおこなった症例164例を対象にして、術後めまいの発生率を調べた。人工内耳埋め込み症例の年齢は2-82歳にわたり、失聴時期別には言語習得前失聴者、言語習得後失聴者とにわけられる。前者のグループの失聴原因は、先天聾、髄膜炎後聾、妊娠時のウイルス感染、遺伝性症候性難聴であった。前者のグループの失聴原因は、原因不明の進行性感音性難聴が約半数をしめ、他は薬剤性、内耳炎、髄膜炎などであった。術後めまいを、術後1ヶ月以内に消退する術直後型、1ヶ月以上続く持続型、1ヶ月を過ぎてから発作性におこる遅発型とに分類し集計した。

### [結 果]

図1に、術直後型、遅発型および持続型めまいの発生率を、1997年迄のものと比較して示した。この結果、術直後型めまいは、31%から27%とやや減少傾向を示した。他方、遅発型めまいは16%から17%と変化なく、持続型めまいは2%から5%と微増傾向を示した。

図2に、1991年から2000年4月までの年次別手術件数と、術後めまいの年次別発生率を示した。術直後

型めまいは、1997年をピークに近年は減少傾向がみられる。遅発型めまいは、2000年度の集計を除いて発症のみられなかった年はなく、毎年起こって他、しかし、年次による発生率に一定の傾向はみられなかった。失聴原因別めまいの発生率を図3に示す。術直後型めまいの発生は、失聴原因に関係なく起こっている。他方、遅発型めまいの発生はアミノグリコシド系抗生物質によって失聴した薬剤性群に高く、髄膜炎例にはみられなかった。

図4にめまいの持続時間を、術直後型めまいと遅発型めまいとで比較して示した。術直後型めまいは殆どが30分以内の短時間のものであった。また、その起こり方は、体動時の誘発性めまいが多かった。他方、遅発型めまいの持続時間は、30分以上6時間以内が36%、6時間以上3日以内が40%、3日以上持続するめまいが16%と、長時間持続するものであった。遅発性めまいの多くは、自発性発作性におこりその持続時間も長いことから、人工内耳手術の合併症として比較的重篤なものと考えられる。

また、遅発性めまいの随伴症状として、嘔吐、嘔気が75%にみられた他、術側の耳鳴がめまい時に増大する例、人工内耳の聞き方の異常、すなわち音が響く、こもって聞こえるといったことが、それぞれ66.7%にみられた。このようなはメニエール病にみられる随伴症状と類似しており、遅発性めまいの多くが術側の内耳障害に起因していることを示唆するものであった。

#### [考察・結論]

術後めまいの発生率は研究者により様々であり、0.4%から47%に及ぶ。近年の報告では、高い発症率を指摘する報告が多い。

術直後めまいの発生原因として、

- 開窓部よりの外リンパ瘻
- 異物に対する免疫反応（漿液性内耳炎）
- 電極装入による内耳障害（物理的、化学的、環境要因）

が考えられている<sup>6)~8)</sup>が、このうちの外リンパ瘻や電極装入による物理的障害については手術手技の向上により予防可能になる事が推察される。今回の我々の年次推移からの検討では、術直後型めまいの発生率にわずかな減少傾向がみられた。他方、遅発性めまいには一定の傾向はなかった。この事実より、術直後型めまいは、人工内耳電極手術手技の向上により減少する可能性がある。

失聴原因別めまい発生率の検討から、術直後めまいは失聴原因に関係なく起こるが、遅発型めまいは薬剤による失聴例に多く、髄膜炎例にはみられなかった。これらの群の術前前庭機能の状態が、遅発型めまいの発生に関係していると考えられ、今後すべき問題と思われる。人工内耳術後の遅発型めまいは最近まで注目されいなかった疾患であるが、近年このめまいに関する報告が散見されるようになった。下記に我々が渉猟した報告例を示す。

- Huygen PLM (1994)<sup>4)</sup>; 2 case report
- Nakai Y (1997)<sup>9)</sup>; 1 case report
- Ito J (1998)<sup>10)</sup>; 8% out of 55 cases
- Kubo et al (2000)<sup>7)</sup>; 49% out of 94 cases

今後、蝸牛軸密着型電極をもつ人工内耳が普及していくので、この場合に術後めまいの発生がどう推移するか注意深く見守る必要がある。

本研究のまとめを下記に示す。

- 1) 術直後型めまいの発生率は43.3%、遅発性めまいの発生率は17.1%であり、2年前の統計と大きな差はなかった。
- 2) 人工内耳術後のめまいを年次別、失聴原因別に調べた。術直後型めまいは減少傾向にあったが、遅発性めまいの発生率に一定の傾向はみられなかった。
- 3) 失聴原因別統計では薬剤性群に遅発性めまいの発生が多かった。

**[参考文献]**

- 1) Cohen N, Hoffman RA, Stroschein M: Medical or surgical complications related to the nucleus multichannel cochlear implant. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988;97(Suppl 1):8-13
- 2) Harrison HC, Gibson WPR: Complications of cochlear implantation in children. *Transplants and Implants in Otology* (Ed.N. Yanagihara and J Suzuki), 1992;327-330, Kugler(Amsterdam)
- 3) Broek VD, Huygen PLM, Mens LHM, et al : Vestibular function in cochlear implant patients. *Acta Otolaryngol*(Stockh) 1993;113: 263-265
- 4) Huygen PLM, Hinderink JB, Broek VD, Borne VD, Brokx JPL, Mens LHM, Admiraal RJC. The risk of vestibular function loss after intracochlear implantation. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 1995; Suppl 520: 270-272
- 5) 守田雅弘、久保武、渡辺雄介他：人工内耳手術後のめまい・平衡障害の検討. *Equilibrium Res* 1995 ; 54 : 307-311
- 6) Kempf HG, Johann K, Lenarz T. Complications in pediatric cochlear implant surgery. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1999; 256: 128-132
- 7) Kubo T, Yamamoto K, Iwaki T, Doi K, Tamura M. Different forms of dizziness occurring after cochlear implant. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (in press)
- 8) Black FO, Lilly DJ, Peterka RJ, Fowler LP, Simmons FB. Vestibulo-ocular and vestibulospinal function before and after cochlear implant surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1987; 96 (Suppl 128):106-109
- 9) Nakai Y, Sakashita T, Kubo T, Ymane H, Matsutani H, Kato A, Iguchi H, Takayama M, Ito J. Temporal bone pathology of a patient with cochlear implant. *ORL* 1997; 59: 230-234
- 10) Ito J. Influence of the multichannel cochlear implant on vestibular function. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1998; 118: 900-906



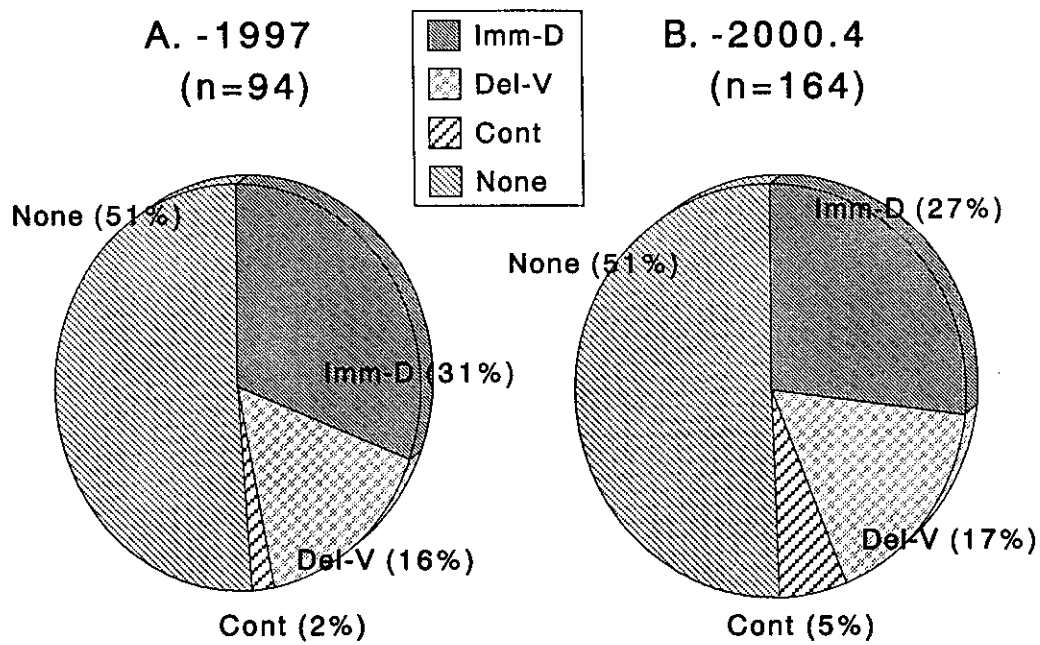


図1. 人工内耳術後めまい発生率の比較  
1998年までの統計と2000年4月までの発生率を比較した。

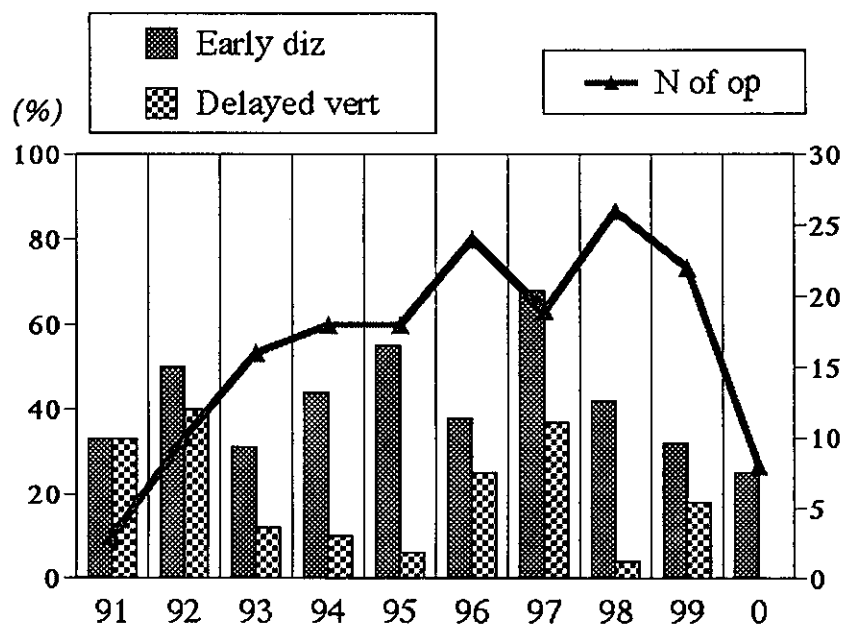


図2. 人工内耳術後めまい発生率の年次推移

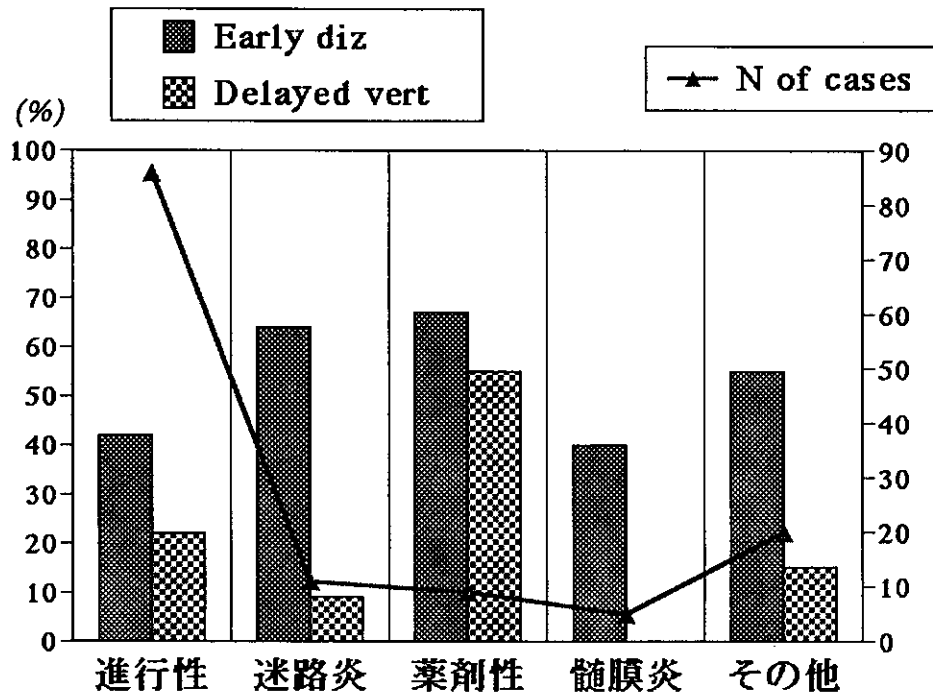
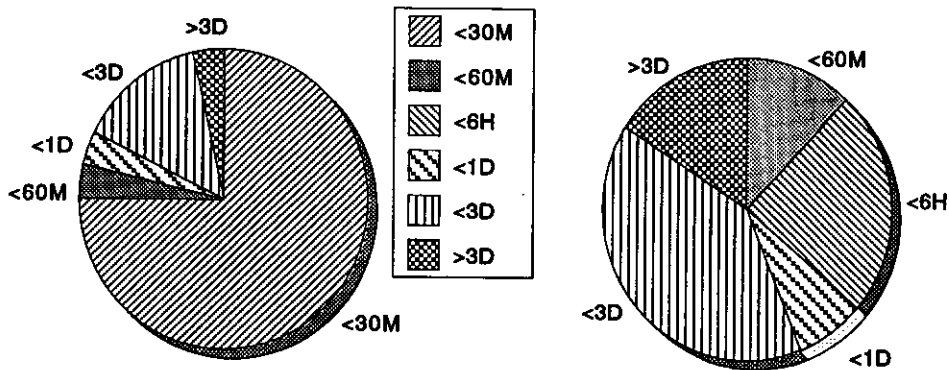


図3. 人工内耳術後めまいの失聴原因別発生率

A. Early-D Group

B. Delayed-V Group



<30M: Less than 30 min; <60M: Less than 60 min; <6H: Less than 6 hours;  
 <1D: Less than 1 day; <3D: Less than 3days; >3D: 3 days or more

図4. 術直後型めまいと遅発性めまいの持続時間比較

## 6. メニエール病の遺伝子解析 (第2報)

久保 武、土井勝美、布施愉香、松代直樹 (大阪大学大学院 耳鼻咽喉科)

### [Abstract]

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of KCNE1 and KCNE3 genes in Meniere's disease

Takeshi Kubo, Katsumi Doi, Yuka Fuse, Naoki Matsushiro

Department of Otolaryngology and Senory Organ Surgery, Osaka University Graduate School of Medicine

The aim of this study was to detect mutation of KCNE1 and KCNE3 genes in Meniere's disease (MD) for better understanding of molecular mechanism underlying the development of endolymphatic hydrops. KCNE1 and KCNE3 genes of Meniere's disease patients were amplified by PCR. Each DNA fragment was purified, then direct-sequenced by using ABI Prism700I. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs), 112G/A of KCNE1 gene and 198T/C of KCNE3 gene, were identified. Since we have confirmed the expression of KCNE1 and KCNE3 mRNAs in the rat inner ear, the result suggests that two SNPs of KCNE1 and KCNE3 genes may be related to the genetic background for the development of endolymphatic hydrops and the cause of Meniere's disease.

### [はじめに]

内耳におけるK<sup>+</sup>イオン輸送は内耳電位の発生に必須の要素である。K<sup>+</sup>イオン輸送は、同時に、内リンパ液の産生・吸収においても重要な機能を果たしていると考えられ、KCNE1 (別名IsK1) と称されるK<sup>+</sup>チャネルのノックアウトマウスでは内リンパ液の産生が障害され、内リンパ腔の消失を惹起することが報告されている<sup>1)</sup>。また、KCNE familyに属するK<sup>+</sup>チャネルとしてはKCNE1~KCNE4の4種類が同定されているが<sup>2)</sup>、我々は、KCNE3が内リンパ液の吸収部位である内リンパ嚢に強く発現していることを確認している。メニエール病の発症、内リンパ水腫の形成にKCNE1、KCNE3遺伝子が関与している可能性を考慮して、今回、これら2つのK<sup>+</sup>チャネル遺伝子の変異の有無について解析を行った。

### [対象と方法]

厚生省前庭斑研究、AAO-HNSの診断基準に従い、メニエール病確実例と考えられる患者36症例よりゲノム抽出を行った。静脈血の採取に先立ち、患者には十分なインフォームド・コンセントを与えて研究内容に了解を得た。KCNE1、KCNE3遺伝子の塩基配列から、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作成してPCR法によりそのcoding region全長を増幅した。増幅された遺伝子断片を回収した後、直接シーケンシング法によりその塩基配列を決定して、遺伝子変異の有無を確認した。

### [結果]

1. メニエール病確実例ゲノム中に、KCNE1遺伝子の112G/A変異を同定した(図-1)。
2. メニエール病確実例ゲノム中に、KCNE3遺伝子の198T/C変異を同定した(図-2)。

### [考案]

メニエール病内リンパ水腫の形成機構は現在も不明であるが、内耳液の産生・吸収に関連する分子、すなわち、水代謝、電解質代謝に関与するチャネルの質的・量的な異常がその形成に関与するものと推察される。K<sup>+</sup>イオンは内耳電位の発生および内耳液の産生に必須のイオンであり、内耳におけるK<sup>+</sup>イオン輸送の障害から難聴・めまいが発症することは容易に想像される。今回、解析を行ったKCNE1、KCNE3遺伝

子とともに、RT-PCRの結果から、蝸牛、内リンパ嚢の両部位に発現しており、内耳におけるK<sup>+</sup>イオン輸送に必須の分子であると推察される。これまでに、KCNE1遺伝子ノックアウトマウスでは、内リンパ腔の消失が惹起されることが報告され<sup>1)</sup>、また、同遺伝子の変異により感音難聴と不整脈(QT延長)を特徴とするJervell Lange-Nielsen症候群が発症することも報告されている<sup>3)</sup>。今回、メニエール病確実例ゲノム中に、KCNE1遺伝子の112G/A変異、KCNE3遺伝子の198T/C変異を同定したが、正常ゲノム中にもこれらの変異が確認されることより、両変異ともいわゆるsingle nucleotide polymorphisms (SNPs) と考えることが出来る。しかしながら、上述の通り、KCNE1遺伝子、KCNE3遺伝子は、いずれも内耳での発現が確認され、また、内リンパ液の産生、内リンパ水腫との関連を示唆する報告もあることから、これらのSNPsがメニエール病の発症に何らかの遺伝的背景を与える可能性が推察される。今後、日本人ゲノム中での、これら2つのSNPsの発現頻度、パターンを解析することが必要となる。

**[参考文献]**

- 1) Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, et al: Inner ear defects induced by null mutation of the isk gene. *Neuron* 1996; 17: 1251-1264.
- 2) Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, et al: A constitutively open potassium channel formed by KCNE1 and KCNE3. *Nature* 2000; 403: 196-199.
- 3) Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, et al: KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genet* 1997; 17: 267-268.

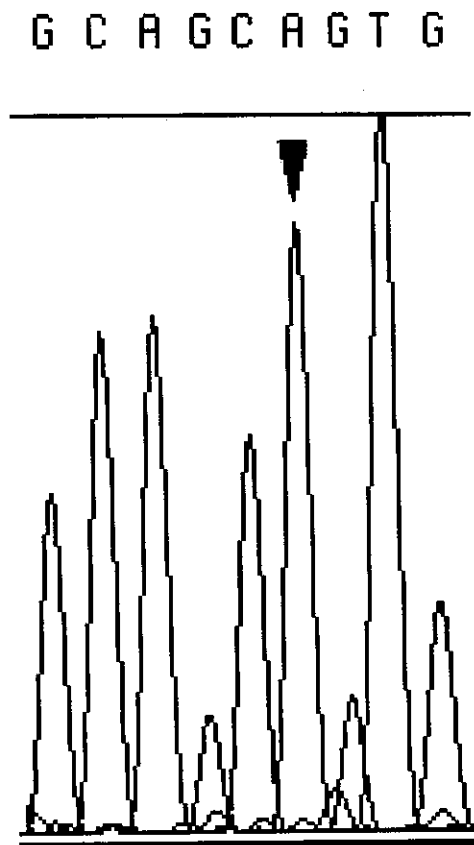


図 1

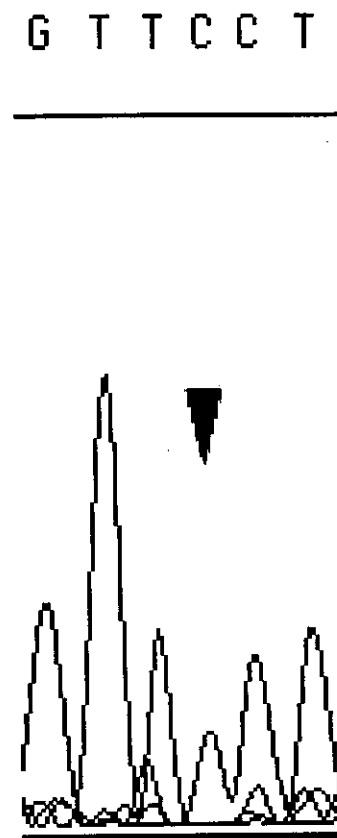


図 2