

3であった。再発までの期間は平均2.6年、再発回数は初回から数えて2回がもっとも多かった。

再発時診断規準合致例の予後は、治癒25耳、改善18耳、不変10耳、悪化1耳、判定不能6耳であった。

調査票については平成13年度版でとくに問題がないと考え、次の全国疫学調査に使用できると考えた。

[参考文献]

- 1) 厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班平成11年度研究業績報告書, 2000.
- 2) 厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班平成12年度研究業績報告書, 2001.
- 3) 佐藤賢太郎、佐野 肇、新田光邦、鐵田晃久、岡本牧人：6カ月以上経過観察できた急性低音障害型感音難聴の検討1・Audiology Japan.43. 220-225. 2000.
- 4) 佐藤賢太郎、佐野 肇、新田光邦、鐵田晃久、岡本牧人：低音障害型急性感音難聴の臨床的検討。Audiology Japan 42 (5): 383-384, 1999.
- 5) 岡本牧人：血圧異常と耳症状。JOHNS 9: 969-973, 1993.

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

岡本牧人、村井和夫：急性低音障害型感音難聴再発例の検討。厚生労働省特定疾患対策研究受業事業前庭機能調査研究班、急性高度難聴調査研究班平成13年度合同総会、東京、2001.

[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

周波数	患者								健聴							
	125	250	500	1000	2000	4000	8000	125	250	500	1000	2000	4000	8000		
再発時聴力	41.1	41.0	28.6	13.4	9.9	9.9	14.3	18.1	16.6	13.0	10.0	9.1	8.3	12.1		
標準偏差	10.0	10.7	12.4	8.7	6.2	4.9	8.7	10.4	10.8	11.4	10.6	7.1	9.3	12.5		
症例数	60	60	60	60	60	60	60	53	53	53	53	53	53	53		
認定時聴力	23.4	21.2	15.3	9.6	8.4	7.9	13.9	16.2	16.2	12.9	10.0	8.9	7.9	11.7		
標準偏差	9.7	10.3	8.8	5.5	5.9	6.8	14.1	10.8	11.2	11.6	10.1	7.1	7.9	12.4		
症例数	53	56	56	56	56	56	56	45	47	47	47	47	46	47		

急性低音障害型感音難聴の診断規準（案）

急性高度難聴調査研究班班長 星 野 知 之（浜松医科大学耳鼻咽喉科）
 分科会員 村 井 和 夫（岩手医科大学耳鼻咽喉科）
 岡 本 牧 人（北里大学耳鼻咽喉科）
 共同研究者 佐 藤 宏 昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）

急性低音障害型感音難聴(acute low-tone sensorineural hearing loss)は、「原因なく突然、あるいは急性に発症した、めまいを伴わない低音型感音難聴」という基準によって選択された疾患である。

原因が不明で、発症が急速、めまいを伴わない低音域に局限する感音難聴についての報告は、1950年代に入ってWilliams²⁾らによって報告されて以来数多くみられる。本邦においても切替ら³⁾、神崎ら⁴⁾がめまいを伴わない反復性聴力障害という形で報告し、1980年代に入って阿部ら¹⁾、⁶⁾が本症に関する数多くの報告を行い、その病態について様々の角度から詳細な検討を行っている。

前述した基準によって選ばれた症例は急性低音障害型感音性難聴(小林ら⁵⁾)、低音障害型突発難聴(阿部ら¹⁾)、低音型突発難聴(阿部ら⁶⁾)、低音障害型突発性難聴(佐々木ら⁷⁾)、急性低音障害型感音難聴(山阻ら⁸⁾)、市村ら⁹⁾)など、いくつかの名称で報告されているが、その症例の選択基準はほぼ同一であり、また報告された症例もほぼ同じ病態を持つものが多数を占めていると考えられる。

本症の選択基準の一つに低音域に局限した感音難聴という項目があり、これは視覚的にオーディオグラムの聴力型が低音障害型を呈するということが一つの前提となっている。

今回これまでの多数の報告を参考として本疾患の診断規準(案)を作成したのでここに報告した。尚、急性低音障害型感音難聴の全国疫学調査結果はこの診断規準(案)によって全国から集計した症例の報告である。

急性低音障害型感音難聴の診断規準（案）

主症状

1. 急性あるいは突発性に蝸牛症状(耳閉塞感、耳鳴、難聴、自声強調、聴覚過敏など)が発症する。
2. 難聴は低音障害型感音難聴である。
3. 難聴の原因は不明または不確定である。

4. めまいを伴わない。

参考事項

1. 難聴に関しては以下の規準による。
 - (1) オーディオグラム低音域3周波数(125, 250, 500Hz)の聴力レベルの合計が70dB以上。
 - (2) 同様に高音域3周波数(2000, 4000, 8000Hz)の聴力レベル合計が60dB以下。
2. 蝸牛症状が反復する例がある。
3. 反復発症時に聴力レベルが診断基準に合致しない例、または聴力型が変化する例がある。
4. メニエール病に移行する例がある。
5. 時に両側性の例がある。
6. 上気道炎、過労、ストレスなどが先行することがある。

註1 本症は突発性難聴とは基本的には異なる疾患と考えられる(突発性難聴診断基準参照)。

註2 本症の診断にあたって、しばしば耳管狭窄症、滲出性中耳炎などのオーディオグラムが酷似することがあるので、低音域の骨導値を正確に測定することが重要である。

また鼓膜所見やティンパノグラムも参考にする。

註3 発症時に明らかな眼振はみられないが、軽いめまい感、浮動感を訴えることがある(特に眼振の検査法は問わない)。

註4 予後の判定規準を以下のように定める。

(1) 治癒

低音3周波数(125, 250, 500Hz)の聴力レベルがいずれも20dB以内に戻ったもの。あるいは健側聴力と同程度まで回復したとき。

(2) 改善

低音3周波数の聴力レベルの平均が10dB以上回復し、かつ治癒に至らないもの。

(3) 不変

低音3周波数の聴力レベルの平均が10dB未満

の変化。

(4) 悪化

(1) (2) (3) 以外のもの。

反復発症例で聴力レベルが診断規準に合致しない例、または聴力型が変化する例の予後判定規準は別に定める。

註5 1000Hzの聴力レベルについては、予後に対する影響があり、また35dB以下とするという意見もあるが、更に検討する必要がある。

[参考文献]

1. 阿部 隆：低音障害型突発難聴. 耳鼻咽喉科 54 (5), 385-392, 1982.
2. Williams HL, Horton BT & Day LA: Endolymphatic hydrops without vertigo. Arch Otolaryngol.51: 557-581,1950.
3. 切替一郎、松崎 力、星野知之:眩暈を伴わない反復性聴力障害の1例. 耳喉39 (10)、1059-1068, 1967.
4. 神崎 仁、古賀慶次郎、猪 忠彦、行木英生：めまいを伴わない可逆性および反復性感音難聴. 耳鼻臨床 64 (8), 834-845,1971.
5. 小林央雄、小林玲子：急性低音障害型感音性難聴. 耳鼻 (24) 656-659, 1978.

6. 阿部 隆、近 芳久、村井和夫、立木 孝：低音型突発難聴の臨床. 日耳鼻 91, 667-676, 1988.
7. 佐々木映子、河原田和夫、飯塚 謙:低音障害型突発性難聴の検討. 日耳鼻 92, 1449-144, 1989.
8. 山唄達也、塩野博己、野村恭也：急性低音障害型感音難聴を呈した外リンパ瘻の1例. 耳喉頭頸 60 (6), 451-454. 1988.
9. 市村恵一、池田利昭、田山二郎、丹生健一、室伏利久：耳閉感と急性低音障害型感音難聴.耳鼻臨床 82 (4), 529-535-、1998.

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

なし

[知的所有権]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

高度難聴症例の電気聴覚 —陰性例の臨床的検討—

分科会員 東野 哲也 (宮崎医科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 竹中 美香・和田 由起
西田 真・牛迫 泰明
小宗 静男 (宮崎医科大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

蝸牛神経機能が高度に障害された高度難聴症例の臨床的特徴を検討した。当科で電気聴覚検査を施行した後天性失聴患者 160 例のうち、少なくとも一側の耳が陰性と判定された例は 160 例中 14 例 (8.8%)、そのうち一側陰性例が 11 例 (6.9%)、両側陰性例が 3 例 (1.9%) であった。一側陰性例の多くは左右の失聴期間や原因が異なっており、一般に失聴期間が長く、先天聾、小児期からの詳細不明難聴、聴神経腫瘍、真珠腫術後など主たる原因であった。両側陰性例は 3 例とも両側進行性の後迷路性難聴を呈し、1 例は MRI で脳表ヘモジデリン沈着症、他の 2 例は特発性の auditory neuropathy と診断された。後者の病態分類が当面の課題と考える。

【研究目的】

求心性伝達物質であるグルタミン酸の興奮毒性や種々の栄養因子による保護作用など、蝸牛有毛細胞とらせん神経節細胞の相互作用が聴覚障害に深く関わることが明らかとなってきた。難聴発症のプロセスの違いによって蝸牛神経の障害程度にかなりの差が生じることが想定される。この問題は、人工内耳医療の観点からも重要な意味を有するが、難聴患者のらせん神経節細胞機能を臨床的に評価することは必ずしも容易でない。高度難聴患者の蝸牛神経機能評価法として現在使用されているのが、蝸牛近傍の電気刺激によって生じる聴覚心理学的反応(音感覚)を測定する電気聴覚検査である。今回は高度難聴患者に対して当科で行った電気聴覚検査成績を集計し、陰性例の難聴病態について臨床的検討を加えたので報告する。

【対象と方法】

1988 年から 2001 年までに、当科で電気聴覚検査を行った後天性失聴患者 160 例 (年齢 15 才～79 才) を対象とした。検査装置は Cochlear 社製 promontory

stimulator で、検査に用いた矩形波のパルス頻度は 50、100、200Hz、刺激電流は 0～500mA の範囲で連続的に増減した。電気聴覚「陰性」の判定は、音感覚が全く得られないか、音知覚閾値 (T レベル) が得られても疲労現象が高度なために快・不快レベルが測定できない場合とした。刺激電極として、1988～1997 年の検査症例 56 例には針電極、1996～2001 年の 104 例には鼓膜電極を使用した。針電極は鼓膜から刺入した電極先端を鼓室岬角に、鼓膜電極は鼓膜臍部に設置して電気刺激を行った。なお、1996～1997 年の 18 例に対しては両電極を用いて検査を行い、定性的な測定結果に差がないことを確認した。

【倫理面への配慮】

検査は人工内耳適応検査の一環として行われ、その診療録を retrospective に検討した。

【研究結果】

少なくとも一側の耳が陰性と判定された例は 160 例中 14 例 (8.8%) であった。このうち、一側のみ陰性であった一側陰性群が 11 例 (6.9%)、両側ともに陰性であった両側陰性群が 3 例 (1.9%) であった。

一側陰性群の症例一覧を表 1 に示す。陰性側の失聴原因としては先天性 (症例 1) または幼小児期か

表 1. 電気聴覚一側陰性群の症例一覧

症例	年齢・性	陰性側		陽性側		人工内耳手術例
		失聴原因	失聴期間	失聴原因	失聴期間	
1	55F	先天聾	55年	中耳炎術後	30年	陽性側
2	45F	詳細不明	>35年	ムンプス	15年	陽性側
3	72M	詳細不明	>69年	突発難聴	6年	陽性側
4	67M	詳細不明	>60年	突発難聴	24年	陽性側
5	50M	AT術後	4年	AT	1月	陽性側
6	65F	AT	2年	特発性	85dB*	未
7	68M	真珠腫手術	40年	突発難聴	8年	未
8	69F	真珠腫手術	40年	髄膜炎	2年	陽性側
9	58F	慢性中耳炎	22年	慢性中耳炎	50年	未
10	67F	髄膜炎	55年	髄膜炎	55年	陽性側
11	47F	敗血症/KM	26年	敗血症/KM	26年	未

AT: 聴神経腫瘍, KM: カナマイシン検与歴, *: 残存聴力

らの詳細不明の難聴（症例2～4）、聴神経腫瘍（症例5, 6）、真珠腫術後（症例2, 3）が主なものであり、対側（陽性側）より失聴期間が長い例であった。逆に、突発難聴や特発性難聴の臨床経過で失聴した4耳はいずれも電気聴覚陽性であった。本群11例中7例に対し、その陽性側に人工内耳手術を行い概ね良好な術後成績が得られている。

両側陰性3症例の臨床像の概略を示す。

症例A：初診時43歳男性。38歳から2年間、頭痛と嘔吐を繰り返したが原因不明のまま、両側難聴が進行した。初診時、平均47dBの感音難聴であったが疲労現象のため補聴器装用効果は殆ど得られなかった。47歳で両側聾に至り岬角刺激による電気聴覚検査を施行したが陰性、その後Jumbling現象、錐体路症状、嗅覚・味覚障害などが加わり、50歳時に蝸牛窓刺激による電気聴覚を再検したが陰性であった。当時新しく導入された超伝導MRIにより、脳表ヘモジデリン沈着症と診断された。

症例B：58歳、女性。13歳の頃より両難聴、耳鳴、ふらつきを自覚するようになった。17歳頃、左耳に補聴器装用を試みたが効果なく、以後、筆談に頼って生活してきた。純音聴力検査では左右ともに70dB程度であったが、語音明瞭度が右10%、左15%と悪く、Jerger III型を示した。ABRは両側無反応、蝸電図でAPは消失していたが良好なCMが両耳ともに検出された。右の温度眼振検査無反応、左は高度CPを示した。MRIで異常所見は認めなかった。

症例C：58歳、女性。12歳頃から両難聴、耳鳴が徐々に進行、20歳頃には会話聴取が不能となった。純音聴力検査では右76.3 dB、左92.5 dB、最高語音明瞭度が右10%、左15%、補聴器装用効果は認められなかった。ABR、蝸電図APともに両側無反応であったが、良好なCMが記録された。温度眼振検査は両側とも無反応であった。MRIの異常は認められなかった。

[考 察]

後天性失聴患者の9割以上が電気聴覚陽性であったことは、内耳障害が高度でも蝸牛神経機能は比較的保たれることを示している。おそらく、らせん神経節細胞が種々の栄養因子で保護されているためであろう。特に突発難聴や特発性難聴の全例が陽性であったことから、これらの難聴病態の主体が内耳であることが示唆される。しかし、左右の失聴原因・期間が異なる例の一部（7%）に一側陰性例が潜んでいることも確かであり、人工内耳の術側決定に本検査の

意義は大きいと考える。両側聴神経腫瘍の症例5において、手術で蝸牛神経を切断した側の電気聴覚のみ陰性であったことは、蝸牛神経機能の定性的な評価法としての本検査法の妥当性を示すものと考えられる。

両側陰性群の3例はいずれも両側の進行性後迷路性難聴の臨床経過を示しており、内耳性難聴とは異質の病態と考えられた。その中で症例Aについては数年の経過で他の脳神経症状や錐体路症状が加わり、脳のMRI所見で脳表ヘモジデリン沈着症の診断が確定した例である。当科初診から診断に至るまで約7年を要しているが、常伝導MRIから超伝導MRIという画像技術の進歩で臨床診断可能となった疾患として注目される。

症例B、Cの臨床像は驚くほど共通している。即ち、1) 難聴の家族歴がない中高年女性、2) 10歳代発症の両側進行性感音難聴で耳鳴を伴う、3) 補聴器装用を試みるも効果がなく装用歴がない、4) 純音聴力が比較的保たれているにも関わらず語音弁別能や補聴器装用効果が極端に悪い、5) ABR無反応、6) 蝸電図AP無反応だがCMが検出される、7) 温度眼振検査で両側CP、8) CT, MRIで中、内耳、中枢聴覚路に病的所見を認めない、9) 第VIII脳神経以外の神経症状を認めない、である。これらの所見はauditory neuropathyとして提唱されている疾患概念1, 2) に当てはまる。つまりABRが無反応であるにも関わらず蝸電図CMまたは耳音響放射が検出される難聴病態である。その障害部位としては内毛細胞、蝸牛神経およびそのシナプスが想定されるが、前庭神経症状を伴う症例B、Cにおいては第VIII脳神経レベルの機能障害の可能性が高い。いずれにしても本症は遺伝性、代謝異常、自己免疫、感染症、特発性など様々な病因で生じる症候群としてとらえるべきで、症例Aの脳表ヘモジデリン沈着症もその一病態である。症例B、Cは現時点では特発性とせざるを得ないが、今後の新たな病態分類を構築していく必要がある。

[参考文献]

- 1) Kaga K, Nakamura M, Shinogami M, et al.: Auditory nerve disease of both ears revealed by auditory brainstem response, electrocochleography and otoacoustic emissions. *Scand Audiol* 25:233-238, 1996.
- 2) Starr A, Picton TW, Sininger YS, et al.: Auditory neuropathy. *Brain* 119: 741-753, 1996.

[論文発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

第11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

急性一次ニューロン障害モデルにおける可逆性・非可逆性

分科会員 東野 哲也 (宮崎医科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 河野 浩万・堀之内 謙一
小宗 静男 (宮崎医科大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

ラット蝸牛の正円窓膜上にカイニン酸 60mM を 2 時間投与し、蝸牛電位の変化と組織像をを観察した。6 匹いずれもカイニン酸投与 2 時間後には、急激な CAP の低下を認めたが、14 日後には 6 匹中 3 匹で CAP の回復が認められた。回復が不完全であった 3 匹の組織所見は、高度のらせん神経節細胞の脱落所見にも関わらずコルチ器は正常であった。らせん神経節細胞の障害の程度が、この実験モデルでの聴覚障害の回復に係わる重要な要因であることが示唆された。

【研究目的】

昨年我々は、グルタミン酸レセプターのアゴニストであるカイニン酸 20mM をラット蝸牛の正円窓膜上に 30 分投与すると急激な CAP の低下をきたして、組織学的には内有毛細胞下の神経終末の膨化所見が観察されることを報告した。しかし、これらの変化は 1 週間後にはほぼカイニン酸投与前のレベルまでに回復した。一方 Juiz らは 1)、ラット蝸牛を 5 nM のカイニン酸で外リンパ灌流したところ、らせん神経節細胞消失を伴った不可逆性の CAP の低下をきたしたと報告している。今回我々は、局所投与するカイニン酸の濃度と投与時間を変えることにより非可逆性障害モデルを作成し、可逆性障害との差を組織学的に検討した。

【研究方法】

動物は、体重 160-200 g の wister 系ラットを 6 匹用いた。Xylazine (6 mg/Kg) 含ケタミン塩酸塩 (40mg/Kg) で麻酔後、posterior approach で骨包開窓し、正円窓膜を明視下とした。60mM カイニン酸生理食塩水溶液を 2 μ l、正円窓膜上に滴下し、2 時間後に拭き取った。蝸牛電位の測定は、銀ボール電極による蝸牛窓誘導で行った。刺激音は、CAP の測定には、8、12、16、20KHz の alternating mode の tone burst (立ち上

がり、立ち下がり 1 msec、持続時間 4 msec)、CM の測定には、condensation mode の tone burst (立ち上がり、立ち下がり 1 msec、持続時間 10msec) を用いた。外耳道入口部より 60cm 離れたスピーカーより、開放型音刺激系として検査音を与えた。蝸牛電位測定は、カイニン酸投与前、投与後 2 時間後、そして 14 日後に行った。蝸牛組織の採取は、深麻酔後、4% パラホルムアルデヒド+0.5% グルタルアルデヒドで灌流固定し、蝸牛を摘出、さらに同固定液で浸漬固定した。10% EDTA 溶液にて脱灰後、JB4 で包埋、3 μ m 厚の切片を作成、HE 染色し、光顕にて観察した。

【倫理面への配慮】

一連の実験は十分な麻酔下に行い、組織採取時も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】

カイニン酸投与 2 時間後には、昨年の報告同様、急激な CAP の低下を認めたが、CM はほとんど変化しなかった。組織学的には、内有毛細胞下の神経終末の空胞化所見を認めた。カイニン酸投与 14 日後には、3 匹で CAP の波形の回復を認めたが、3 匹ではほとんど回復してこなかった。(図 1) 14 日後に CAP

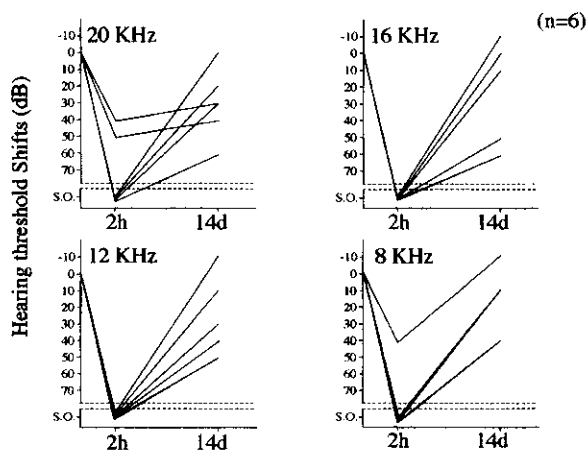


図 1 60mM カイニン酸 2 時間投与後の CAP の変化。

が回復しなかった蝸牛組織像では、コルチ器に変化は認めないものの、らせん神経節細胞の広範な脱落所見が認められた。CAPが回復した蝸牛組織像では、らせん神経節細胞の脱落は基底回転の一部に限られており、少なくとも第2回転より上方には明らかな脱落所見は認めなかった。(図2)

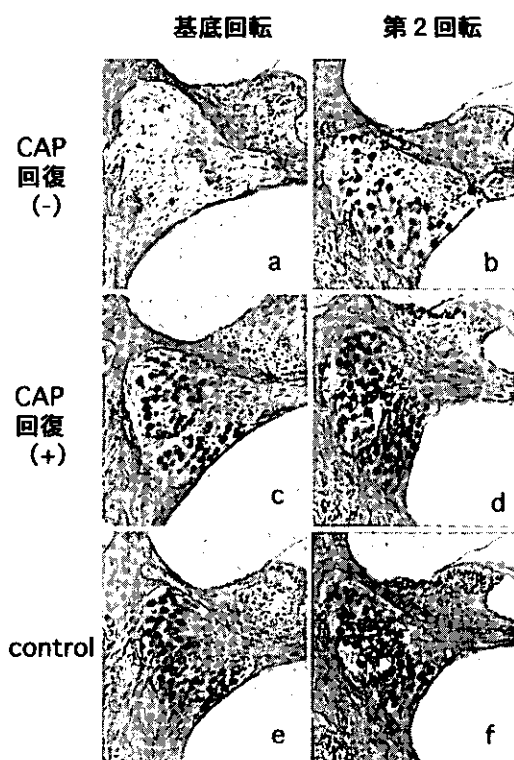


図2 60mM カイニン酸投与2週間後の蝸牛らせん神経節 (a, c, d: 基底回転, b, d, f: 第2回転)。a, b: CAP回復がなかった動物、c, d: CAPが回復した動物、e, f: コントロール動物。

【考 察】

非可逆性聴覚障害に至った蝸牛の組織所見では著明ならせん神経節細胞の脱落が観察されたのに対し、可逆性障害の蝸牛ではらせん神経節細胞が良好に保たれていた。このことから、らせん神経節細胞(細胞体)の障害程度がカイニン酸により生じた聴覚障害の可逆性を決める要因のひとつと考えられる。これまで蝸牛において種々の神経栄養因子やそのレセプターの発現の報告がなされており^{2, 3)}、カイニン酸による聴覚障害の回復現象にも、これらの神経栄養因子が関与していることが推察される。栄養因子の多くがらせん神経節細胞に発現していることから、その障害は栄養因子による細胞保護効果を低下させ、非可逆的なプロセスに陥る可能性が高い。したがって、この聴覚障害モデルにおける神経栄養因子の動態を明らかにすることが、グルタミン酸興奮

毒性によるらせん神経節細胞障害を抑制あるいは予防する新たな治療法の手がかりになるものと考えられる。昨年度報告した pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide はらせん神経節細胞に発現する栄養因子のひとつであり、現在このモデルに対する神経保護効果を検討中である。

【結 論】

ラット蝸牛の正円窓膜上にカイニン酸60mMを2時間投与するとCAPは急激に低下したが、14日後にはCAPが回復してくるものと回復してこないものが認められた。CAPが回復しなかった蝸牛組織像では、高度のらせん神経節細胞の脱落所見が観察されたのに対し、CAPが回復した蝸牛組織像では、基底回転で軽度のらせん神経節細胞の脱落を認めるのみで、第2回転以上では明らかな脱落所見は認めなかった。らせん神経節細胞の障害の程度が、この実験モデルでの聴覚障害の回復に係わる重要な要因であることが示唆された。

【参考文献】

- 1) Juiz JM, Rueda J, Merchan JA, Sala ML: The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear Res* 40: 65-74-51, 1989.
- 2) Stover T, Nam Y, Gong TL, Lomax MI, Altschuler RA: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor complex are expressed in the auditory nerve of the mature rat cochlea. *Hear Res* 155: 143-51, 2001.
- 3) Fritsch B, Silos-Santiago I, Bianchi LM, Farinas I: The role of neurotrophic factors in regulating the development of inner ear innervation. *Trends Neurosci* 20:159-64, 1997.

【研究発表】

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

第11回 日本耳科学会

【知的所有権の取得状況】

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

有毛細胞における神経伝達物質の自発的放出

分科会員 東野 哲也 (宮崎医科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 君付 隆・中島 崇博
小宗 静男 (宮崎医科大学耳鼻咽喉科)

〔研究要旨〕

蝸牛有毛細胞の神経伝達物質の放出、あるいは前駆物質の取り込みを、蛍光色素 (FM 1-43) を用い、単離生存細胞にて観察した。エンドサイトーシスによる取り込みは、細胞の上部 (頸部) で行われ、取り込まれた小胞は底部へと移動した。FM 1-43 投与中止により、色素強度は減少した。これは、エクソサイトーシスによる伝達物質の放出を意味する。これらの現象は、刺激を加えない定常状態で観察されたため、神経伝達物質の自発的な放出、あるいは前駆物質の自発的な取り込みの存在を示唆した。細胞により、エンドサイトーシスとエクソサイトーシスの均衡に差が認められた。

〔研究目的〕

蝸牛において、内有毛細胞から放出された神経伝達物質 (グルタミン酸) が、周囲の支持細胞に取り込まれ、支持細胞内でグルタミンに変換され、これが支持細胞から放出され、神経伝達物質 (グルタミン酸) の前駆物質として内有毛細胞に再取り込みされるという "glutamate-glutamine cycle" が提唱されている (1, 2)。これらの現象は、音刺激により増強されることが推定される。ところで、有毛細胞からの一次求心線維は、音刺激のない条件においても、自発的にスパイクを発生することが知られている (3)。このことは、定常状態においても自発的に glutamate-glutamine cycle が働いていることを示唆する。神経伝達物質 (グルタミン酸) の放出は、エクソサイトーシスにより、前駆物質の再取り込みはエンドサイトーシスにより行われるため、今回我々は、エンドサイトーシス、エクソサイトーシスを感知する蛍光色素 (FM 1-43) を用いて、蝸牛内有毛細胞の神経伝達物質の動態を調べた。

〔対象と方法〕

酵素 (trypsin) 処理、あるいは機械的操作により、モルモット蝸牛より内有毛細胞を急性単離した。内有毛細胞は、形態より同定可能であった。FM 1-43 (T-3163, Molecular Probe) は標準細胞外液に溶解させ (2-10 μ M)、細胞外より陽圧パフピペットで細胞全体に投与した。測定は、浜松フォトニクス社製 C-4880-80 画像システムを用いた。刺激光は 410nm 波長を中心とする band-pass filter を用い、励起光は 510nm 以上を透過させる high-pass filter を用いた。

〔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〕

刺激を与えない定常状態において、単離内有毛細胞に FM 1-43 を投与すると、まず細胞の上部 (頸部) でまず取り込まれ、その後次第に底部へと移動した。エンドサイトーシスにより取り込まれた小胞が、シナプスを形成する細胞底部へ向かって移動すると考えられた。FM 1-43 投与中止により、色素強度は次第に減少し、エクソサイトーシスによる神経伝達物質の放出が示唆された。この現象も、刺激を加えない定常状態で観察され、神経伝達物質の自発的な放出が考えられた。エンドサイトーシスとエクソサイトーシスが同程度認められる細胞が 63% (12/19)、エンドサイトーシス優位でエクソサイトーシスが弱い細胞が 26% (5/19)、エンドサイトーシスをほとんど認めない細胞が 11% (2/19) と、細胞による性質の差が認められた (図 1)。

〔考 察〕

音刺激あるいは虚血など、細胞に刺激の加わって

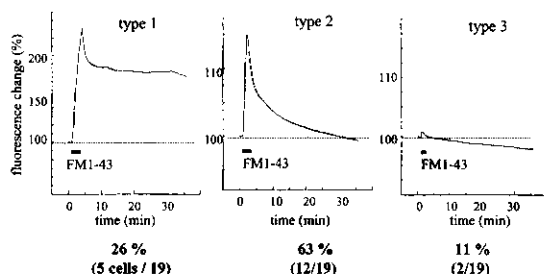


図1 細胞によるエンドサイトーシス、エクソサイトーシスの差。type 1: エンドサイトーシス(色素取り込み)が強いタイプ。type 2: エンドサイトーシスとエクソサイトーシス(色素放出)が均衡を保っているタイプ。type 3: エンドサイトーシスが弱いタイプ。

いない定常状態での神経伝達物質動態を観察した。内有毛細胞の頸部でのエンドサイトーシスによる膜取り込みと、取り込まれた小胞の細胞底部への移動が観察された。ホ乳類の有毛細胞におけるエンドサイトーシスは、外有毛細胞において、horseradish peroxidaseによる細胞頂部での取り込みが観察されている(4)。また、ハ虫類(カメ)の有毛細胞において、細胞上部のクチクラ直下と底部のシナプス領域の二ヶ所での膜の再取り込みが報告されている(5)。また、電子顕微鏡でも、モルモット内有毛細胞頂部の細胞膜の陥凹像が観察されている(未発表)。

細胞により、エンドサイトーシス、エクソサイトーシスの程度に差を認めた。音刺激のない定常状態においても、神経伝達物質の放出程度に細胞間の差があることを意味し、このことは誘因不明の感音難聴の発生機序の解明に、将来つながる可能性がある。

【結 論】

- (1) 1993年の突発性難聴全国疫学調査結果から急性低音障害型感音難聴がどのくらい含まれているかを検討した。
- (2) 2790症例中252症例が急性低音障害型感音難聴と考えられた。
- (3) 平均年齢は突発性難聴に比べて若く、女性に多

いことが判明した。

- (4) 突発性難聴全国疫学調査の登録患者のうち、9%が急性低音障害型感音難聴と判明した。

【参考文献】

- (1) Ottersen OP, Takumi Y, Matsubara A, et al.: Molecular organization of a type of peripheral glutamate synapse: the afferent synapses of hair cells in the inner ear. *Prog in Neurobiol* 54: 127-148, 1998.
- (2) Matsuda K, Ueda Y, Doi T, et al: Increase in glutamate-aspartate transporter (GLAST) mRNA during kanamycin-induced cochlear insult in rats. *Hear Res* 133: 10-16, 1999.
- (3) Evans EF: Cochlear nerve and cochlear nucleus. In: *Handbook of Sensory Physiology*. Vol V/2 (Keidel WD and Nefi WD eds.), 1-108, Springer-Verlag, Berlin, 1975.
- (4) Siegel JH, Brownell WE: Synaptic and Golgi membrane recycling in cochlear hair cells. *J Neurocytol* 15: 311-328, 1986.
- (5) Tucker T, Art J, Fettiplace R: Routes of calcium entry and extrusion in turtle hair cells. *Ann NY Acad Sci* 781: 123-137, 1996.

【研究発表】

〈論文発表〉

君付 隆、小宗静男、Jonathan F Ashmore: モルモット蝸牛内有毛細胞のシナプス小胞動態の光学的計測、*Otol Jan* 11 (2): 87-91, 2001

〈学会発表〉

なし

【知的所有権の取得状況】

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

内耳奇形マウスの聴覚と内耳形態について

分科会員 喜多村 健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 戸 叶 尚 史・岡 村 洋 沖 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)
野 瀬 俊 明 (三菱化学学生命科学研究所)
尾 崎 英 徳・川 上 潔 (自治医科大学生物学教室)

【研究要旨】

昨年、我々は内耳奇形と想定される Zfc-02 マウスの行動異常と難聴について解析した。その結果、聴覚においては、ホモ接合体、ヘテロ接合体ともに難聴が認められ、その聴覚閾値はホモ接合体のほうがヘテロ接合体よりも高かったことを報告した。今回は同マウスの内耳形態の解析を行ったので報告するとともに、新たに入手した転写因子変異によるホモ接合体のみに内耳障害が出現するマウスの、野生型とヘテロ接合体について、その聴覚と内耳形態についてもあわせて報告する。

【研究目的】

この研究の目的は、遺伝子操作をしたマウスの聴覚路の異常や聴覚閾値について、形態学的、電気生理学的に解析して、難聴や行動異常の原因をつきとめることにあり、ヒトの症候性、あるいは非症候性難聴に対する動物モデルを新たに確立することにある。

【研究方法】

Zfc-02は12週齢の野生型とホモ接合体、8週齢のヘテロ接合体を用いた。新たな系統のマウスに関しては野生型およびヘテロ接合体に対して4週齢から12週齢まで経時的に聴性誘発電位を解析した。方法はステンレス針電極を用い、鼻尖部に陽極、右耳後部に陰極、右大腿に接地電極を設置した。Zfc-02マウスに対しては、slope 0.1ms, duration 1ms, 10kHzのtone pipを外耳孔10cm前方より14.3Hzの頻度で与えた。新たに得られたマウスに対しては、slope 0.55ms, duration 2msのtone pipを用い、40Hzの頻度にて5.6kHzから32kHzまでの7周波数の解析も行った。なお、刺激音圧は各周波数の持続音にて補正した。誘発電位を記録したマウスはただちにホルマリンで全身還流固定し、EDTAによる脱灰、パラフィン包埋の過程の後、H-E染色を行って光学顕微鏡で観察

した。

【倫理面への配慮】

実験動物に関しては十分に麻酔を行い、苦痛を与えないように配慮した。

【結 果】

Zfc-02は野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体の順に聴力レベルの低下が認められた。H-Eによる解析においてはラセン神経節細胞数が、聴覚レベルに対応するように減少していた(図1)。新たな系統のマウスに関してはホモ接合体では内耳の形成が認められなかったが、ヘテロ接合体、野生型には聴覚(図2)、内耳形態ともに明らかな異常を認めなかった。なお、ホモ接合体は出生後間もなく呼吸不全により死亡した。

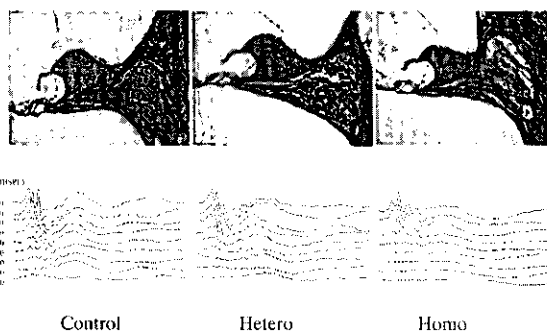


図1 Zfc-02における内耳形態とABRの比較。

Zfc-02は野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体の順に聴力レベルの低下が認められた。H-Eによる解析においてはラセン神経節細胞数が、聴覚レベルに対応するように減少していた。

【考 察】

昨年我々はZfc-02の難聴について、遺伝子挿入部位に何らかの突然変異が起ったためと推測したが、加齢性難聴の鑑別を行う必要があった。今回は8-12週齢の個体を解析することができた。B6における加

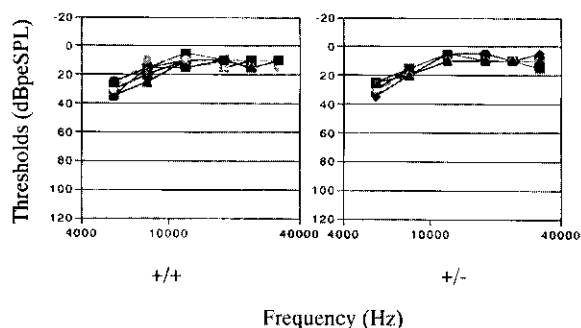


図2 新しい系統のマウスの野生型およびヘテロ接合体における重ね合わせ図。

野生型、ヘテロ接合体において聴覚閾値の差は認められなかった。

齢性難聴は10kHzにおいて、文献的には少なくとも24週齢以前には急激な聴覚レベルの低下はない¹⁾²⁾。また、形態学的な解析によればB6の加齢性難聴は有毛細胞の変性または消失、およびラセン靱帯の障害と考えられており、24週齢においてはラセン神経節の消失ははっきりしないという報告もある³⁾。

上記より、Zfc-02における難聴はラセン神経節細胞数の減少によるものと推測された。今後は蝸電図CMもしくはDPOAEによる蝸牛機能の評価、および走査型顕微鏡による有毛細胞の形態の観察が必要であると考えられる。新しい系統のマウスについては常染色体劣性遺伝形式の難聴が想定されるが、遺伝子の責任部位は同定されていない。両系統のマウスともに遺伝子解析が必要と考えられる。

【結 論】

Zfc-02における難聴はヒトにおける難聴の一つのモデルになる可能性があると考えられた。また新しい系統のマウスにおいては、常染色体優性遺伝形式の難聴モデルになる可能性があると考えられた。

【参考文献】

- 1) Parham K. Distortion product otoacoustic emissions in the C57BL/6J mouse model of age-related hearing loss. *Hear Res.* 112:216-34,1997.
- 2) Ou HC, Harding GW, Bohne BA. An anatomically based frequency-place map for the mouse cochlea. *Hear Res.* 145(1-2):123-9,2000.
- 3) Hequembourg S, Liberman MC. Spiral ligament pathology: A major aspect of age-related cochlear degeneration in C57BL/6 mice. *JARO.* 02:118-129,2001.

【研究発表】

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

1. Tokano H, Noce T, Kitamura K, Okamura H: A New Transgenic Mouse Showing Abnormal Behavior. *Molecular Biology*, Washington D.C. 2001
2. 戸叶尚史、野瀬俊明、岡村洋沖、瀧口賀隆、喜多村健：内耳奇形マウス (Zfc-02) における難聴と行動異常の解析：第11回日本耳科学会総会、神戸、2001
3. 赤須竜子、安斉政幸、横山峰介、戸叶尚史、岡村洋沖、喜多村健、野瀬俊明：Position-Effect CRE 発現 transgenic mouse に生じた聴覚異常変異の解析：第24回日本分子生物学会、横浜、2001

【知的所有権の取得状況】

〈特許取得〉

なし

〈実用新案取得〉

なし

〈その他〉

なし

光増感反応を用いたモルモット蝸牛外側壁の複数障害

分科会員 星野知之 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 竹下 有・岩崎 聡
 名倉 三津佳・渡邊 高広
 足守 直樹 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)
 梅村 和夫 (浜松医科大学薬理)

【研究要旨】

モルモットの蝸牛外側壁に約1 mm離れた場所に2カ所光増感反応を用いて障害を作成した。走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察すると、約1 mm離れて2カ所に障害が全例で作成されており、それに対応する有毛細胞は著しく障害されていた。障害間の血管条は正常に思われたが、それに対応する外有毛細胞にも障害を認めた。障害間の蝸牛内電位 (EP) は、3日、7日後では低下していたが、14日後には正常に回復していた。

【研究目的】

内耳性難聴の一つに血管条性難聴があげられる。血管条の障害が、ヒト蝸牛組織標本でみられるように多発性、散発性におこった場合1)に、どのような変化がおこるかを調べることは血管条性難聴を考える上で有用と思われる。今回我々は、光増感反応を用い、モルモット蝸牛第2回転に限局性障害を2つ作成し、障害間の形態学および生理学的変化を検討した。

【研究方法】

プライエル反射正常の白色モルモットをベントバルピタールにて麻酔。ventral approachにて左中耳骨包を開放し、蝸牛第二回転に黒紙(幅1 mm)を置き、左頸静脈よりRose Bengal(20mg/kg)を投与し、黒紙の頂側に径1 mmの緑色光(540nm, 8000ルクス)を10分間照射し、続いて同様の操作を黒紙の基底側で施行。障害作成後3日、7日、14日および28日後に断頭し、SEMで形態を観察。障害間の有毛細胞の残存数(内柱細胞10個の長さに対する有毛細胞の数)を計測し、Rose Bengalの代わりに生食を投与した対照群と比較した。障害作成後14日および28日後にdiaminobenzidine(DAB)にて染色し、光学顕微鏡にて血管網を観察。障害作成後3日、7日、14日後に障

害間のEPを測定し、それぞれの日時の対照群と比較検討した。

【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。

【結 果】

SEM上約1 mm離れた場所に2つの血管条の障害が認められた。障害間の血管条は正常と思われた。障害間の内有毛細胞には障害が認められなかったが、外有毛細胞には障害が認められた(図1)。障害間の有毛細胞の残存数は、7日および14日後において外有毛細胞第1,2列の残存数の有意な減少が認められた(表1)。また、障害作成後14日において、外有毛細胞の第1,2列の残存数が第3列に比べ有意に減

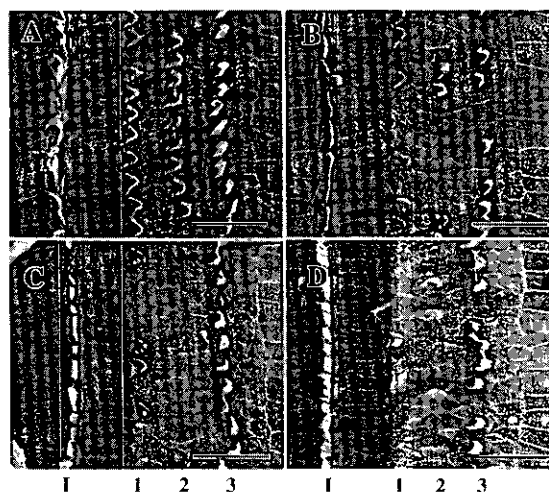


図1 障害間の有毛細胞の変化

A: 3日後 B: 7日後 C: 14日後 D: 28日後
 scale bar: 25 μ m

内有毛細胞(1)には変化を認めないが、外有毛細胞(1,2,3)とくに第1,2列目に変化を認める。

	IHC	OHC-3	OHC-2	OHC-1
control (n=4)	5.4±0.1	6.7±0.3	6.7±0.2	6.8±0.2
3日 (n=5)	5.2±0.3	4.8±1.9	4.4±1.5	4.9±0.6
7日 (n=5)	5.2±0.6	4.8±1.7	2.0±2.2*	2.6±1.8*
14日 (n=5)	5.4±0.3	5.5±0.5	2.3±1.4*	2.7±1.5*

表1 障害間の有毛細胞の残存数 * : P < 0.001

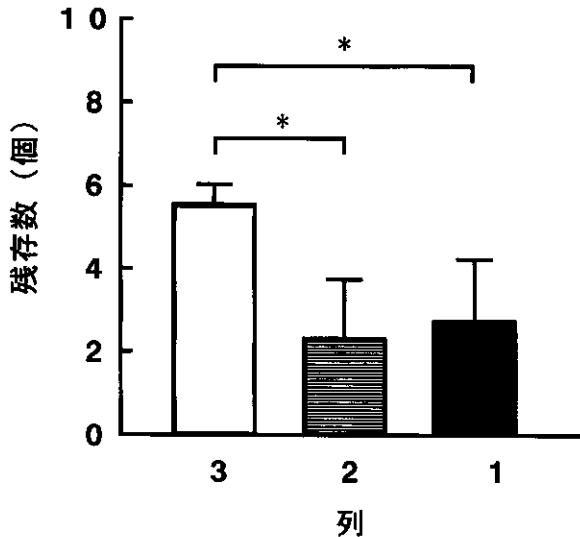


図2 障害作成後14日後の外有毛細胞の残存数
第1, 2列の残存数が第3列に比べ有意 (*: P < 0.001) に減少していた。

少していた (図2)。

DAB染色では、血管条の2カ所の障害部においては血管網が消失していたが、障害間では正常の血管網が残存していることが確認された。

障害間のEPにおいて、障害作成後3日および7日では対照群に比べ有意な低下を認めたが、14日後には回復していた。

[考 察]

蝸牛第2回転の血管条の約1 mm離れた2カ所に障害を作成したところ、障害部のみではなく障害間の血管条に対する有毛細胞にも変化をきたした。さ

らにその障害の進行は比較的ゆっくりであった。1カ所だけの血管条に障害を作成した場合、その障害は限局的かつ分節的である2)ことを考えると、今回の変化は2カ所の分節的な血管条の障害から2次的に起こった変化と考えられた。障害が複数に起こった場合には、血管条の障害部が微小でも広範囲の蝸牛障害が生じることが推察された。

[結 論]

血管条の約1 mm離れた2カ所に障害を作成したところ、障害部のみではなく障害間の血管条に対する有毛細胞にも変化をきたした。その部位のEPは一過性に低下をきたしたが、2週間後に回復した。

[参考文献]

- 1) Pauler M, Schuknecht HF. : Atrophy of the stria vascularis as a cause of sensorineural hearing loss. Laryngoscope 1988; 98: 754-9.
- 2) 星野知之: 限局性血管条障害、東京医学社、東京、1999

[研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

第11回 日本耳科学会総会

the 2002 ARO MidWinter Meeting

[知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案取得〉

なし

〈その他〉

なし

一過性虚血後の内耳有毛細胞の病態

分科会員 暁 清 文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 谷 口 昌 史・白 馬 伸 洋
佐 藤 英 光・兵 頭 純
大河内 喜 久・清 水 義 貴 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

一過性虚血後の内耳有毛細胞の病態を明らかにする目的で、スナネズミに15分間の内耳虚血を負荷し、その後の有毛細胞の経時的变化を核染色法、TUNEL染色法および透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した。その結果、蛍光顕微鏡下での観察やTEMの所見から、内有毛細胞に核の凝縮や断片化が認められ、アポトーシスと形態学的特徴が類似していた。このことより虚血性内耳障害においてアポトーシスが深く関与していることが示唆された。

【研究目的】

これまで我々はスナネズミを用いた虚血性内耳障害の研究を行い、虚血に対して内有毛細胞は外有毛細胞に比べて脆弱であり、虚血後、徐々に細胞が脱落することを報告してきた¹⁾。しかし、この細胞脱落がどのようなメカニズムで起こるかについては不明である。今回の研究では一過性虚血後の内有毛細胞の脱落メカニズムを明らかにする目的で、内有毛細胞の核染色やTUNEL染色を行って経時的に観察するとともに、透過型電子顕微鏡を用いて核の形態を詳細に検討した。

【研究方法】

対象および実験方法

実験動物にはスナネズミ(12~16週齢)を使用した。ハロセン吸入麻酔下に、仰臥位にて頸部正中切開を施行して両側の椎骨動脈を露出し、血流を15分間遮断、再開通することにより一過性内耳虚血モデルを作成した。

1. 蛍光顕微鏡による観察

虚血・再開通後30分、3、6、12時間、1、2、3、4日目に断頭し、速やかに蝸牛骨胞を摘出した。前庭窓、蝸牛窓を開放し蝸牛頂回転に設けた小孔より4%パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行なった。さらに同液にて2時間浸漬固定後、surface

preparationにて基底回転のコルチ器を採取し、Hoechst 33342による蛍光染色を行い内有毛細胞の核変化を観察した。

2. TUNEL染色による観察

虚血・再開通後12時間目に断頭し、速やかに蝸牛骨胞を摘出した。前庭窓、蝸牛窓を開放し蝸牛頂回転に設けた小孔より4%パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行なった。さらに同液にて2時間浸漬固定後、surface preparationにて基底回転のコルチ器を採取し、TUNEL染色を行い内有毛細胞の核変化を観察した。

3. 透過型電子顕微鏡による観察

虚血・再開通後12時間目に断頭し、速やかに蝸牛骨胞を摘出した。前庭窓、蝸牛窓を開放し蝸牛頂回転に設けた小孔より2.5%グルタルアルデヒドにて局所灌流固定を行った。さらに同液にて8時間浸漬固定後、surface preparationにて基底回転のコルチ器を採取した。Hoechst 33342による蛍光染色にて核の凝縮を示した内有毛細胞の標本を取り出し、2%オスミウム酸にて後固定を行いエポン包埋後、透過型電子顕微鏡(日立H800)にて核変化を観察した。

【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なった。

【結 果】

蛍光顕微鏡による観察では、内有毛細胞において虚血後脱落細胞が徐々に増加する進行性の細胞死が観察された。また、核の凝縮したアポトーシス様細胞は虚血・再開通後12時間をピークに3時間から2日目まで観察され、ピーク時のアポトーシス様細胞割合は4.8%であった。(図1)。また虚血・再開通後12時間目の内有毛細胞の核にはTUNEL陽性細胞を認め、透過型電子顕微鏡による観察では核のクロマチン凝縮が確認された。

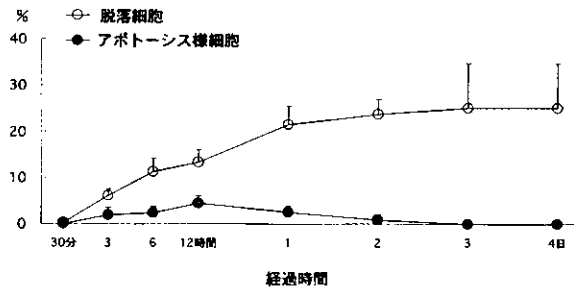


図1 虚血後の脱落細胞とアポトーシス様細胞割合。虚血・再開通後30分、3、6、12時間、1、2、3、4日目の内毛細胞における脱落細胞(○)とアポトーシス様細胞(●)の割合の平均値を示す。垂直線はそれぞれの標準偏差を示している。

[考察]

今回の実験結果より虚血後に核の凝縮所見を認め、進行性的内毛細胞障害にアポトーシスが深く関与していることが明らかとなった。脳科学領域では、Kirinoら2)が一過性脳虚血後海馬CA1領域において徐々に細胞死が進行することを報告し、この細胞死の原因は過剰なグルタミン酸であると考えられている3)。また組織学的検討において、Nitatoriら4)は虚血後、核凝縮などのアポトーシス様の形態学的変化が生ずると報告している。内耳においても内毛細胞にはグルタミン酸受容体が存在し5)、またグルタミン酸拮抗剤を蝸牛内に投与することにより内耳虚血後の内毛細胞障害が軽減することが証明されている6)ことから、今回の内毛細胞障害の機序の一つとして虚血によるグルタミン酸の放出が考えられる。虚血後のアポトーシスには他の機序も関与していると考えられ、その詳細については今後の研究課題としたい。

[結論]

虚血後の内毛細胞を組織学的に検討する目的で、15分間の内耳虚血負荷を行い、蛍光顕微鏡下に内毛細胞の経時的な核の形態変化の観察、TUNEL染色によるアポトーシスの検討、および透過型電子顕微鏡による核の観察を行った。その結果、核の凝縮といったアポトーシスと思われる形態学的特徴を認め、虚血性内耳障害にアポトーシスが深く関与していることが明らかとなった。

[参考文献]

1) Watanabe F, Koga K, Hakuba N, Gyo K : Hypother-

mia prevents hearing loss and progressive hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroscience* 102 : 639~645, 2000.

2) Kirino T : Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239 : 57~69, 1982.

3) Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH : Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43 : 1369~1374, 1984.

4) Nitatori T, Sato N, Waguri S, Karasawa Y, Araki H, Shibani K, Kominami E, Uchiyama Y : Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 15 : 1001~1011, 1995.

5) Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP : Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 16 : 4457~4467, 1996.

6) Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, Gyo K : Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. *J Comp Neurol* 418 : 217~226, 2000.

[研究発表]

〈論文発表〉

Hyodo J, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Shudou M, Taniguchi M, Gyo K : Hypothermia reduces glutamate efflux in perilymph following transient cochlear ischemia. *Neuroreport*.

12 (93): 1983-1987, 2001

〈学会発表〉

第10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

〈実用新案取得〉

なし

〈その他〉

なし

虚血性内耳障害に対する遺伝子治療

分科会員 暁清文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 白馬 伸洋・佐藤 英光
兵頭 純・谷口 昌史
大河内 喜久・清水 義貴 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

虚血性内耳障害の動物モデルを用いて、神経栄養因子の一つである GDNF をアデノウイルス・ベクターに組み込んで蝸牛内に投与し、内耳保護効果の有無と程度を検討した。その結果、内耳虚血前にウイルスベクターを蝸牛内に投与すると虚血 7 日目の CAP 閾値上昇や内有毛細胞脱落数がコントロールと比較して有意に抑制されることが示された。すなわち GDNF アデノウイルスベクターの投与は一過性内耳虚血による内耳障害を防御することが証明された。

【研究目的】

神経栄養因子の一つである GDNF には内耳障害を防御する効果のあることが報告されている¹⁾。本研究では、アデノウイルスをベクターとして用いて GDNF を蝸牛内に発現させ、一過性内耳虚血動物モデルにおける内耳保護効果について検討を行った。

【研究方法】

ハロセン吸入麻酔下に仰臥位にて耳胞を開放し、マニピュレータを用いて先端 100 μ m 径の針を正円窓に挿入し固定した。マイクロインフュージョンポンプによって、1) GDNF アデノベクター、2) LacZ 遺伝子を組み込んだ LacZ アデノベクター、3) 人工外リンパ液、各 2 μ l のいずれかを鼓室階に注入した。注入後 4 日目に頸部正中切開を施行して両側の椎骨動脈を露出し、血流を 15 分間遮断、再開通することにより一過性内耳虚血を負荷した。なお、蝸牛複合活動電位 (CAP) の測定は白金電極を顔面神経管内に挿入固定して行った。

1. CAP による聴力閾値の測定

刺激音にはクリックを用い、加算回数は 300 回とした。CAP の測定は虚血前、虚血 1、4、7 日後に行い、それぞれの群の閾値変化を経時的に求めた。

2. 蛍光顕微鏡による観察

虚血 1、4、7 日後に断頭し、速やかに蝸牛骨胞

を摘出した。前庭窓、蝸牛窓を開放し蝸牛頂回転に設けた小孔より 4% パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行った。さらに同液にて 2 時間浸漬固定後、surface preparation にて基底回転のコルチ器を採取し、蛍光染色を行い内有毛細胞の脱落細胞数を計測した。

【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。

【結 果】

CAP の経時的な閾値変化を図 1 に示した。3 群とも虚血開始直後より反応波形は消失し、最大刺激音圧 (110dB SPL) にも CAP は認められなかった。虚血 1 日目では LacZ アデノベクター注入群、人工外リンパ液注入群においては虚血前値と比較し、約 15dB の CAP 閾値上昇が認められたが、GDNF アデノベクター注入群では閾値上昇は有意に抑制されていた。

蛍光顕微鏡による観察では、虚血・再開通後 4 日目の内有毛細胞における脱落細胞割合は LacZ アデノ

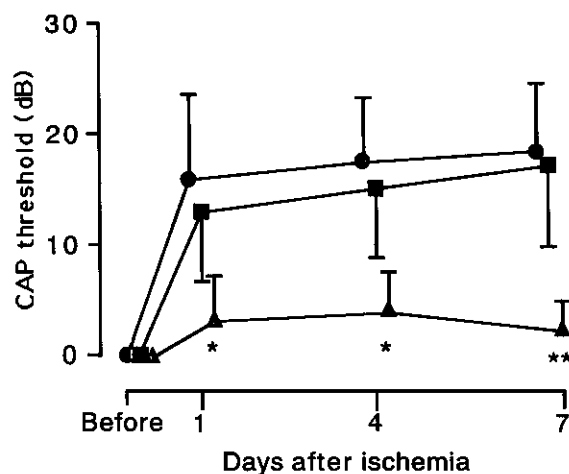


図 1 CAP 閾値の経時的変化。

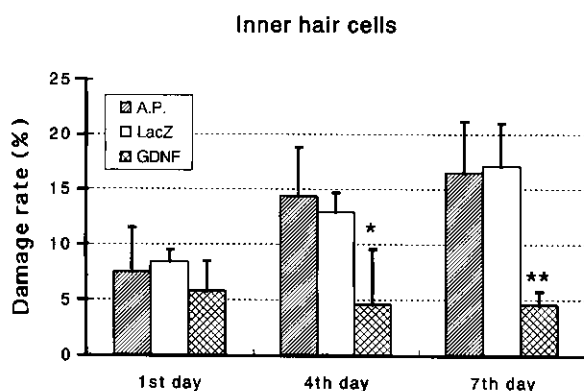


図2 内毛細胞における脱落細胞割合の経時的変化。

ベクター注入群、人工外リンパ液注入群においては約20%であった(図2)。一方、GDNFアデノベクター注入群では内毛細胞の脱落はほとんど認められなかった。

以上の結果から、アデノウイルスをベクターとしたGDNF遺伝子治療は内耳虚血障害に対し保護効果があることが示された。

[考察]

アデノウイルスは遺伝子ベクターとして安定していることから様々な全身疾患の遺伝子治療への応用が研究されており2) 3) 4)、耳科領域の研究においても最も有望な手段である。蝸牛は側頭骨によって囲まれた閉鎖空間内にあることから周囲組織へのウイルスの影響は比較的少なく、遺伝子治療の対象器官として適している。今回の研究ではGDNFアデノウイルスを内耳虚血前に蝸牛内に投与したところ虚血後の内耳障害が抑制された。今後はこのGDNFアデノウイルスを虚血後の障害が生じた段階で蝸牛内に投与し、その効果を検討する予定である。これにより今まで有効な治療法がなかった虚血性内耳障害の新たな治療法の開発をめざす。

[結論]

今回の研究により、GDNFアデノウイルスを一過性内耳虚血前に蝸牛内に投与した場合、虚血後の内耳障害が抑制されたことより、蝸牛は遺伝子治療の対象となりうる器官であることが示唆された。

[参考文献]

1) YLIKOSKI, J., PIRVOLA, U., VIRKKALA, J.,

SUVANTO, P., LIANG, X.Q., MAGAL, E., ALTSHULER, R., MILLER, J.M., SAARMA, M. (1998). Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear. Res.* 124, 17-26.

2) GASCHWIND, M.D., HARTNICK, C.J., LIU, W., AMAT, J., VANDE WATER, T.R., and FEDEROFF, H.J. (1994). Defective HSV-1 vector expression BDNF in auditory ganglia elicits neurite outgrowth: Model of treatment of neuron loss following cochlear degeneration. *Hum. Gene Ther.* 7,173-182.

3) LALWANI, A.K., WALSH, B.J., REILLY, P.G., MUZYCZKA, N., and MHATRE, A.N. (1996). Development of in vivo gene therapy for hearing disorders: Introduction of adeno-associated virus into the cochlea of the guinea pig. *Gene Ther.* 3, 588-592..

4) RAPHAEL, Y., FRISANCHO, J.C., and ROESSLER, B.J., (1996). Adenoviral-mediated gene transfer into guinea pig cochlea cells in vivo. *Neurosci.Lett.* 207, 137-141.

[研究発表]

〈論文発表〉

- Hyodo J, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Shudou M, Taniguchi M, Gyo K: Hypothermia reduces glutamate efflux in perilymph following transient cochlear ischemia. *Neuroreport.* 12 (93): 1983-1987, 2001
- Watanabe F, Hakuba N, Koga K, Hyodo J, Gyo K: Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroscience.* 102 (3): 639-645, 2001.

〈学会発表〉

第11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

〈実用新案取得〉

なし

〈その他〉

なし

音響外傷モルモットにおける Hypoxia inducible factor-1(HIF-1)の発現

分科会員 神 崎 仁 (慶應義塾大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 松 延 毅・小 川 郁
井 上 泰 宏・志津木 健
新 田 清 一・井 出 里 香 (慶應義塾大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

hypoxia-inducible factor(HIF-1)はレドックス感受性遺伝子転写制御因子の一つであり、低酸素による遺伝子発現制御に幅広く関わっていることが報告されている。急性感音難聴のモデルとして急性音響外傷モルモットを用いて、HIF-1の蝸牛内における発現を強大音非負荷モルモットと比較した。HIF-1発現はウエスタンブロットと免疫組織化学的手法を用いて行った。強大音負荷を行ったモルモットにおいては、蝸牛感覚上皮内の外有毛細胞において明らかなHIF-1発現の上昇がみとめられた。

【研究目的】

原核生物から真核生物にいたるまでほとんどすべての生物にとって酸素は必要不可欠な分子である。そのため酸素分圧が低下した状態(hypoxia)になるとさまざまな適応反応を行うことによって酸素供給を改善しようとする。最近になり、低酸素による遺伝子の誘導的転写に必要なエレメントがさまざまな遺伝子で同定され、低酸素依存的転写に必要なエレメントに結合し作用するhypoxia-inducible factor(HIF-1)が、多くの細胞および組織で働くことが明らかになってきている。HIF-1はHIF-1 α とHIF-1 β のサブユニットからなるが、低酸素に応答するのはHIF-1 α である。このHIF-1 α はレドックス感受性遺伝子転写制御因子の一つであり、低酸素による遺伝子発現制御に幅広く関わっていることが報告されている。一方、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。そこでモルモットの音響外傷モデルを用いて、蝸牛の音響外傷成立のメカニズムにおけるHIF-1 α の関与を検討したので報告する。

【研究方法】

動物はプライエル反射正常の有色モルモットを使用し、防音室内で105 dBオクターブバンドノイズ(4 kHz中心)を2時間および5時間曝露した。なお、我々の予備実験ではこの条件での5時間曝露で、約7日で回復する一過性聴力障害(TTS)をきたすことを確認した。強大音曝露後、直ちにネプタールにて麻酔後、断頭、顕微鏡下に蝸牛感覚上皮をダイセクションした。次に試料をホモジナイズし、SDS処理し、電気泳動後、PVDF膜に転写し、抗HIF-1 α 抗体、および二次抗体で処理後、化学発光を施した。また、強大音_時間曝露後の蝸牛感覚上皮については免疫染色も併せて行った。

【倫理面への配慮】

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も全身麻酔下で苦痛を与えずに行った。

【結 果】

ウエスタンブロットではコントロールに比べて強大音曝露2時間後に蝸牛感覚上皮と外側壁においてHIF-1 α の発現の上昇傾向が認められ、曝露5時間後には明らかな発現の増加が認められた(図1)。免疫組織化学においては強大音曝露後の蝸牛感覚上皮においては、三列の外有毛細胞において、HIF-1 α の強い染色が認められた(図2)。これは、強大音曝露により蝸牛内において酸化的ストレスが加わり、外有

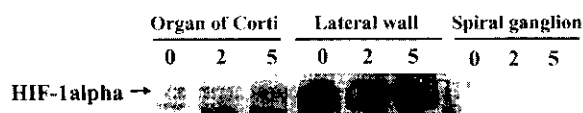


図1 : ウエスタンブロット所見。強大音曝露2時間後に蝸牛感覚上皮と外側壁においてHIF-1 α の発現の上昇傾向が認められ、曝露5時間後には明らかな発現の増加が認められた。

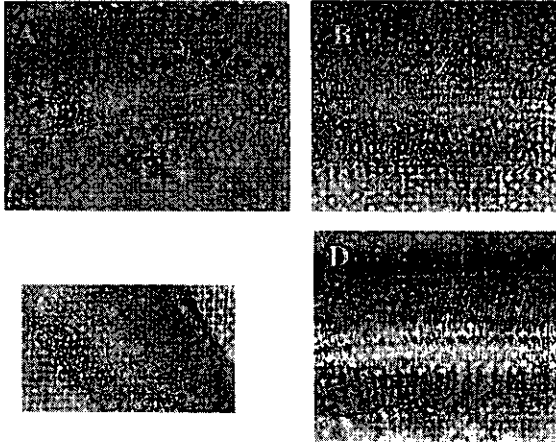


図2：免疫組織化学所見。強大音曝露後の外有毛細胞において、HIF-1 α の強い染色が認められた。

毛細胞がターゲットとなっている可能性が示唆された。音響外傷により、初期には外有毛細胞に主な変化が認められることより、音響外傷の分子メカニズムへのレドックス感受性転写因子の関与が考えられる。

[考察]

音響外傷モデルは急性感音難聴モデルの一つとして知られているが、その機序としては次のことが考えられる。まず第一に強大音曝露により内耳血流の低下が惹起され、内耳虚血が引き起こされること、第二に強大音曝露により内耳組織内のフリーラジカルの産生増加が認められることが実験的に報告されている。したがって強大における内耳障害はフリーラジカル産生増加による組織障害と密接な関係があることが明らかになってきている。我々は強大音曝露により内耳組織内のレドックス感受性転写制御因子の一つであるAP-1の活性が上昇することを報告した。HIF-1 α は、低酸素環境に応答して発現が増加し、またその他の転写制御因子であるAP-1やNF- κ B、Ref-1などの活性を増加させて、酸化ストレスに応答する種々の遺伝子発現を制御していると考えられている。内耳障害におけるレドックス制御機構およびこれらの転写制御のメカニズムを解明することは、急性感音難聴のメカニズムの解明および治療につながるものと考えられる。

[参考文献]

- 1) Curren C., Franza B.R.Jr.,: Fos and Jun, the AP-1 connection. *Cell* 55: 395-397, 1988.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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〉

第11回日本耳科学会

26th 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

〈実用新案取得〉

なし

〈その他〉

なし