

图 11

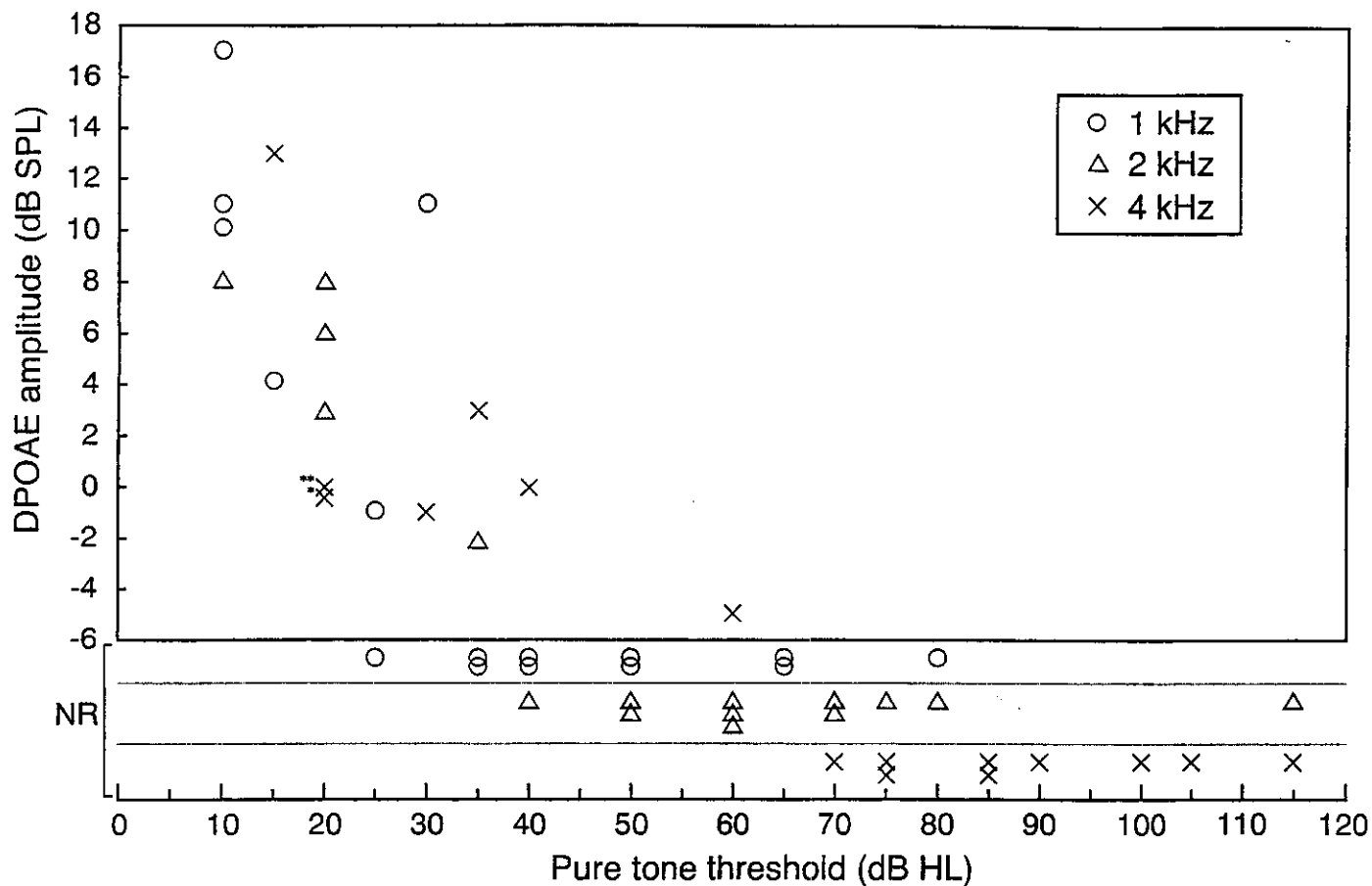


表 1

Subject ID	Right Ear				Left Ear					
	PTA 2-4 kHz (dB HL)	Threshold*1 (dB nHL)		Latency*2 (msec)		PTA 2-4 kHz (dB HL)	Threshold*1 (dB nHL)		Latency*2 (msec)	
		I	V	I	V		I	V	I	V
III-2	55	90	70	1.9	5.9	60	—	90	—	7.1
IV-4	80	—	70	—	6.4	87.5	—	70	—	6.8
IV-11	72.5	—	80	—	5.9	67.5	80	70	2.2	6.0
IV-35	92.5	105	100	—	—	115	—	105	—	—
V-7	115	—	—	—	—	110	—	105	—	—
V-10	115	—	—	—	—	115	—	—	—	—
V-12	115	—	—	—	—	115	—	—	—	—

PTA 2-4 kHz = average of pure tone thresholds at 2000 and 4000 Hz ; \*1 = thresholds of wave I and wave V ; \*2 = latencies of wave I and wave V with the click stimulation at 90 dB nHL.

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

コネキシン 26 遺伝子変異による聴覚障害に関する研究

分担研究者 松永達雄 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科  
研究協力者 宇佐美真一 信州大学医学部耳鼻咽喉科教授  
新美成二 国際医療福祉大学言語聴覚センター教授  
廣田栄子 国際医療福祉大学言語聴覚障害学科教授  
熊ノ御堂浩 国際医療福祉病院耳鼻咽喉科講師

研究要旨：本研究では主としてコネキシン 26 遺伝子変異による難聴者における、本遺伝子の変異パターンと聴覚障害の特徴の関係を解明することを目的とした。原因不明の難聴者およびその血縁者においてコネキシン 26 遺伝子を検討し、変異を同定された例において聴覚障害の臨床的特徴を検討した。これに基づき日本人における変異パターンと効率的スクリーニング法を提案した。さらに後天性、進行性難聴との関連する変異パターンおよび A1555G ミトコンドリア DNA 変異との相互作用により後天性、進行性難聴を生じる可能性を持つ変異パターンを同定した。

A. 研究目的

コネキシン 26 遺伝子変異による難聴の診断と治療の向上のため、原因不明の難聴における本遺伝子変異の関与、遺伝子変異と聴覚障害の関係、および聴力像の特徴を解明することを目的とした。

B. 研究方法

対象は原因不明の難聴者およびその血縁者とした。対象者の聴覚障害の病歴を本人あるいはその身近な血縁者より聴取して解析するとともに、承諾を得られた対象者に対して各種聴覚検査およびコネキシン 26 遺伝子変異と A1555G ミトコンドリア DNA

変異の遺伝子検査を施行した。本研究は国立病院東京医療センター倫理審査委員会の承認および被験者からのインフォームドコンセントを得て施行された。

### C. 研究結果

本研究で同定されたコネキシン 26 遺伝子変異の各変異パターンの allele 数を表 1 に記した。計 75allele が同定され、235delC 変異が 36allele で約半数であり、それ以外はいずれも 10allele 未満であった。

605ins46 は今回の検討で新たな変異パターンとして発見された。また T86R と T123N はこれまでに報告されていない変異であるが、その病的意義については現在検討中である。

コネキシン 26 遺伝子変異が同定された難聴症例を発症時期および変異接合体の組み合わせで分類し、それぞれの変異部位を表 2 に記した。頻度の高い 4 変異パターン(235delC、G45E、Y136stop、V37I)が、ヘテロ T123N 変異の 1 例以外の全員で同定された。

難聴者における変異接合体のパターンは、ホモ接合体はすべて 235delC

であり 7 人で同定された。複合ヘテロ接合体は 13 人で同定され、このうち 10 人で 235delC のヘテロ接合体を伴った。ヘテロ接合体の単一での同定が 11 人で認められ、このうち 1 人は A1555G ミトコンドリア DNA 変異が重複して同定された。本例は小児期に発症して進行性の経過をとり高度難聴に至っており、アミノグリコシド投与歴を持たなかった。また、近い血縁者で難聴を有するものを認めなかった。

235delC 変異は先天性難聴例では 25 人中 20 人でホモあるいはヘテロ接合体として同定されたが、後天性難聴者では 6 人中 2 人でヘテロ接合体として同定されたのみであった。一方、V37I 変異は先天性難聴例では 25 人中 2 人でヘテロ接合体あるいは複合ヘテロ接合体として同定されたのみであったが、後天性難聴では 6 人中 3 人でヘテロ接合体として同定された。

### D. 考察

コネキシン 26 遺伝子には、これまでに 60 以上の変異パターンがあることが報告されているが、今回の結果より日本人難聴者におけるコネキシ

ン 26 遺伝子のスクリーニングには、日本人に頻度の高い 4 変異パターン (235delC、G45E、Y136stop、V37I) のみの検討ではほぼ 100%に近い感度で選別が可能であると考えられた。これらはいずれも点変異であるため PCR-RFLP 法を用いることによりシーケンスを必要とせずに、迅速かつ経済的に変異を検出することが可能である。

またこれまで先天性難聴の主たる原因として考えられていたコネキシン 26 遺伝子変異が後天性、進行性難聴にも関与している可能性が示された。この場合には、変異パターンも先天性難聴と異なり V37I が主に認められた。今後、これらの症例の臨床的、聴覚医学的特徴を解析していく予定である。

今回検討した後天性、高度難聴の 1 例では、ヘテロのコネキシン 26 遺伝子 235delG 変異と A1555G ミトコンドリア DNA 変異が重複して同定された。本例はアミノグリコシド使用歴がなく、近い血縁者に難聴者を認めなかった。このことよりコネキシン 26 遺伝子 235delG 変異は A1555G ミトコンドリア DNA 変異との相互作用に

よって難聴発症を促進しうる可能性が考えられた。先の報告で 299-300delAT コネキシン 26 遺伝子変異と A1555G ミトコンドリア DNA 変異では、相互作用が認められなかったことより、コネキシン 26 遺伝子の変異パターンによって相互作用に違いがある可能性が示唆された。

#### E. 結論

- 1) 日本人の先天性および後天性難聴における、コネキシン 26 遺伝子の変異パターンを解明した。
- 2) 日本人では頻度の高い 4 種類の点変異の検査のみで、ほぼ 100%近い感度でコネキシン 26 遺伝子変異のスクリーニングが可能であると考えられた。
- 3) 後天性、進行性難聴の原因としてコネキシン 26 遺伝子の変異の関与が疑われた。
- 4) 一部のコネキシン 26 遺伝子変異パターンでは、A1555G ミトコンドリア DNA 変異との相互作用により難聴発症が促進される可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

I. Yuge, A Ohtsuka, T. Matsunaga,  
S. Usami. Identification of  
605ins46, a novel GJB mutation in  
a Japanese family. *Auris Nasus  
Larynx* 29:379-382, 2002

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1

同定されたコネキシン26遺伝子の変異パターン

変異部位	既知変異						新規変異	未報告変異		計	
	235delC	G45E	Y136stop	V37I	R143W	299-300del	176-191del	605ins46	T86R		Y123N
allele数	36	9	8	6	4	3	2	2	4	1	75

コネクション26遺伝子変異

備考

発症時期	接合体	既知変異						新規変異		未報告変異	
		235delC	G4SE	Y136stop	V37I	R143W	299-300del	176-191del	605ins46	T86R	T123N
先天性難聴	CH	●							●		
	CH	●							●		
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	不明	●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	H	●●									
	不明	●									
newCH	●										
newCH	●										
不明	●										
不明	●										
不明	●										
不明	●										
先天性難聴	不明										
不明	不明										
不明	不明	●									
不明	不明										
DH	DH	●									

A1555G変異

CH: 接合ヘテロ, H: ホモ, newCH: 新規変異伴う接合ヘテロ, DH: 異なる遺伝子変異の重複, 不明: 単一のヘテロ変異のみ同定

厚生科学研究費補助金 (感覚器障害研究事業)  
分担研究報告書

遺伝子変異の疑われる進行性感音性難聴における  
難聴遺伝子スクリーニング

研究協力者 鈴木 隆史 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科  
分担研究者 松永 達雄 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科

研究要旨：原因不明感音性難聴において比較的頻度の高いミトコンドリア難聴遺伝子、コネキシン難聴遺伝子変異に対するPCR-RFLP法による効率的なスクリーニング法を確立した。

A. 研究目的

分子生物学の進歩にともない近年これまで原因不明とされてきた難聴遺伝子のいくつかが特定されはじめている。症候性難聴は遺伝性難聴の約30%をしめ、現在までに400種以上の症候群が知られている。難聴のほかに症候をともなう症候性難聴ではその存在を念頭において診察をおこなっていれば診断をすることは可能である。しかし難聴のみが主症状である非症候性難聴では遺伝性難聴であるか否かの診断は困難である。なかでも劣性遺伝形式をとる難聴に関しては両親が無症候のキャリアーとなるため、なおさら診断が困難である。実際それらを全て調べるのは技術的、経済的、倫理的な面を考えると不可能でありそれらのなかでも比較的頻度の高い進行性難聴

をしめす遺伝子につき、できるだけ簡便になおかつ正確な検査をめざし、そのスクリーニング法を確立する。

B. 研究方法

今回ターゲットとする難聴遺伝子はその頻度からミトコンドリア難聴遺伝子2種 (Mt 1555変異、Mt 3243変異)、コネキシン26遺伝子変異5部位 (235delC、V37I、G45E、Y136X、R143W) とした。簡便になおかつできるだけ迅速に診断できる面を考慮して、遺伝子変異部位はPCR-RFLP法による検出とした。(図1)

検査は、①患者静脈血よりDNAの抽出、②PCR法にて変異部位を含む領域を増幅、③制限酵素にて目的部位を切断、④アガロースゲルにて電気泳動し遺伝子変異の有無を判定する。



尚、Cx26 134 A→G 変異については適切な制限酵素が見当たらなかったため、134番目のコドンがA（アデニン）、G（グアニン）のときにそれぞれ増幅をしめすよう、PCR設定をした。PCR条件およびプライマーは（表1）（表2）のように設定した。電気泳動に関してはミトコンドリア遺伝子に対して1.5%、コネキシン遺伝子に対しては3.0%アガロースゲルを使用し、エチジウムブロマイドによる

染色を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では難聴者およびその血縁者の遺伝子解析を行うため、「ヘルシンキ宣言」および「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守してすすめた。また倫理審査委員会の審査・承認による研究の適正性の確保、事前の十分な説明と同意をふまえた上でおこなった。

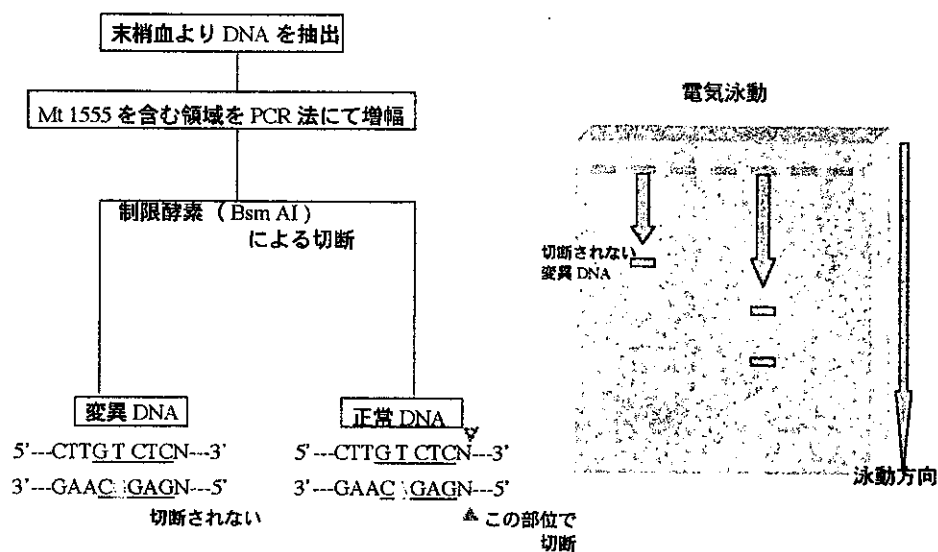


図1 ミトコンドリア1555変異におけるPCR-RFLP法

正常DNAの場合制限酵素がこの下線部を認識して切断される。1555変異のある遺伝子ではアデニンがグアニンに置き換わっているため切断されない。これらを電気泳動してみると正常DNAは切断され2本のバンド、変異DNAは1本のバンドとして検出されることとなる。

### C.結果

ミトコンドリア難聴2種、コネキシン26難聴5部位について、原因不明感音性難聴における難聴遺伝子スクリーニングを確立した。

Mt1555変異、コネキシン26変異5部位に関してはそれぞれの変異が

あると分かっている患者についてスクリーニング検査が正確であることを確かめた。実際の電気泳動所見の一部を（図2）に示す。

現時点でデータ解析をおえた進行性感音性難聴患者30名については、いずれの変異も検出されなかった。

	Detection	PCR 条件	sense primer	antisense primer	Restricted Enzyme
Mitochondria Mutation	Mt 1555 A→G	#1	5'-GTAAGAAGAGTTAGGTCAAGG-3'	5'-TACATAGACGGGTGTGCTCTT-3'	Bsm AI
	Mt 3243 A→G	#2	5'-AAGGTTGTTGTTCAACGA-3'	5'-AGCGAAGGTTGTAGTAGCC-3'	Apa I
Connexin 26 Mutation	235del C	#3	5'-TGTGTGCATTGCTTTTCCAG-3'	5'-GGTTGCCTCATCCCTCAT-3'	Apa I
	V371 (109 G→A)			5'-CACCTCCTTGGCAGCCACCA-3'	Bss SI
	G45E (134 G)			5'-AAAGTCGGCCTGCTCATCTC-3'	-----
	G45E (134 A)			5'-AAAGTCGGCCTGCTCATCAT-3'	-----
	Y136X (408 C→A)			5'-CCGGAAGAAGATGCTGCTTCT-3'	Sfc I
R143W (427 C→T)	#4	5'-ATCACTACTTCCCATCTCC-3'	5'-TGGGCCGGGACACAAAGCAG-3'	Scr FI	

(表1) PCR-RFLP プライマーと制限酵素  
#1、2、3、4 については (表2) 参照

	DNA Polymerase activation	denaturation	annealing		extension	cycle
# 1	95°C, 5min	94°C	30sec	55°C	30sec	30
# 2			60sec	60°C	60sec	
# 3			60sec	58°C	60sec	35
# 4			30sec	55°C	30sec	

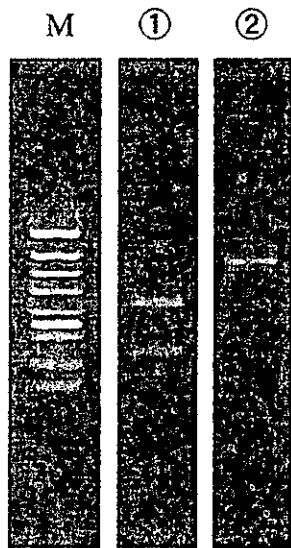
(表 2) PCR Condition

Applied Biosystems社 AmpliTaq Goldをもちいることにより  
Hot start法とした

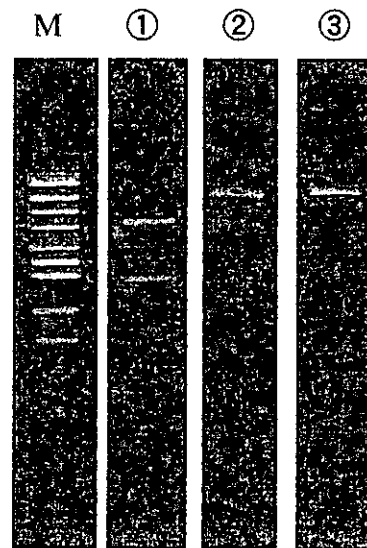
#### D. 考察

Mt 1555 A→G変異は アミノグリコシド難聴の多くを占めることでも知られ、ある報告では 感音性難聴で 外来受診をした患者の 3% にこの変異を認めたとの報告もある。Mt 3243 A→G変異は、ミトコンドリア脳筋症の MELAS、 遺伝性糖尿病の遺伝子としても知られる。糖尿病患者の 1% にこの変異が認められているという報告がありまたこの変異が認められる患者の 76% に難聴をみとめるという。Mt 1555 は 全てのミトコンドリアDNAに変異を持つホモプラスミーの遺伝形式をとり、この検査での sensitivity は高いと考える。逆に、Mt3243変異に関しては個体により、臓器により変異ミトコンドリア遺伝子の分布が異なるヘテロプラスミーの遺伝形式をとり、末梢血での変異DNA量が少ない場合、本検査にて False negative となりうる可能性がある。ある Mt3243変異患者の内耳の変異DNAの割合が80%以上であるのに対し末梢血では25%であったとの報告もある。定量的 PCR、蛍光プライマーをもちいる、染色法の工夫など Sensitivity のさらに高い検査法の確立が課題となり、現在検討中である。

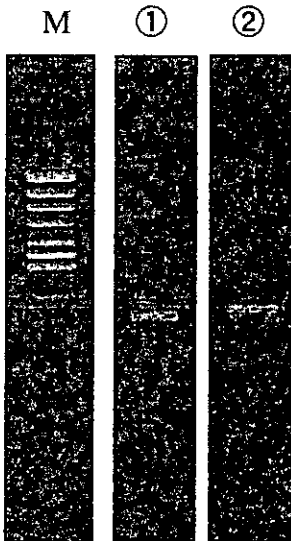
コネキシンは細胞間輸送をつかさどるギャップジャンクション関連遺伝子で、コネキシン26による難聴はすべてあわせると劣性遺伝形式の難聴の1/3から1/2を占めるといわれている。先天性難聴が多くをしめるが、進行性感音性難聴をしめすものも指摘されている。コネキシン遺伝子変異部位は多岐にわたっており、種族間においても多様性がある。欧米人では35delCが多くを占めるのに対し日本人では235delCが過半数を占める。また逆に日本人では35delCはほぼみとめられないといっている。現時点ではコネキシン26遺伝子変異はGJB2エクソンを全てシークエンスすることによってなされてきたが、このスクリーニングによりコネキシン26難聴の検索にはこのたび実施した5部位でコネキシン26難聴のほぼ全体をカバーすることになると考えている。コネキシン26に関してはスクリーニングとして、より少ない手順でおこなえるようPCR条件等を簡便化した。134G→A変異に関しては変異部位に対応する制限酵素が見あたらなかったため、変異があればPCRにて増幅され変異がなければPCRにて増幅されないような条件を設定した。T<sub>m</sub>温度から



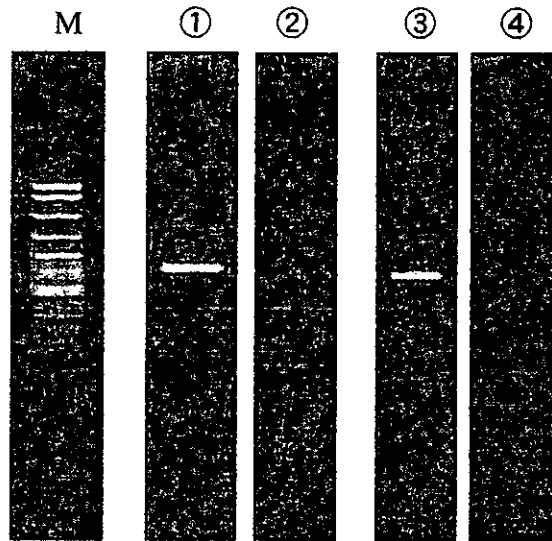
Mt 1555 スクリーニング  
 M:  $\phi$  X174/Hinc II Marker  
 ①: 正常例  
 ②: Mt 1555 変異例



Cx26 235delC スクリーニング  
 M:  $\phi$  X174/Hinc II Marker  
 ①: 正常例  
 ②: 235delC 変異例 (Heterozyous)  
 ③: 235delC 変異例 (Homozyous)



Cx26 109 G→A スクリーニング  
 M:  $\phi$  X174/Hinc II Marker  
 ①: 正常例  
 ②: 109G→A変異例 (Heterozyous)



Cx26 134 G→A スクリーニング  
 M: pBR322/Msp I Marker  
 ①②: 正常例  
 ③④: 134G→A 変異 (Heterozyous)  
 ①および③が134部位がGのとき  
 ②および④が134部位がAのとき

(図2) スクリーニング電気泳動所見

annealinng timeを2種類に設定しPCR条件も2条件にそろえた。制限酵素温度もすべて同じ37℃とし、大量勝つ迅速なスクリーニングを可能とした。

#### E.結論

ミトコンドリア難聴2種、コネキシン26難聴5部位に関してスクリーニング法法を確立した。患者検体においてそのスクリーニングを開始した。

#### F.研究発表

なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

内耳ミトコンドリア障害モデルの作製

研究協力者 保谷則之、岡本康秀 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科  
分担研究者 松永達雄 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科

研究要旨：①ミトコンドリア遺伝性難聴の内耳障害のメカニズム解明、治療法の開発のため、ミトコンドリア障害難聴モデルの作製を行った。②ミトコンドリアトキシン 3-nitropropionic acid (3NPA)のラット蝸牛への局所投与により、内耳性難聴を起こすことに成功した。③ミトコンドリア機能障害による内耳障害の病態を検討し治療法を開発するためのモデルとなりうると考えられた。

A. 研究目的

ミトコンドリア病の代表と考えられるミトコンドリア脳筋症の3大病型（MELAS, MERRF, 慢性進行性外眼筋麻痺）はいずれも高率で難聴を合併し、糖尿病患者の約1%はMELASと同様の遺伝子変異を持ち、高率で難聴を発症する。またミトコンドリア1555変異はアミノグリコシドに対する耳毒性の感受性を高める特徴がある。これらのいわゆるミトコンドリア遺伝性難聴は、内耳に障害がある内耳性難聴であることは報告されているが、ミトコンドリア機能低下が内耳性難聴を発症するメカニズムについては解明されていない。そこで本研究ではミトコンドリア遺伝性難聴患者における内耳障害のメカニズム解明と治療法の実験的検討のためミトコンドリア障害難聴モデル動物を作製することを目的とする。

B. 研究方法

ミトコンドリアを障害するミトコンドリア

トキシンには 3-nitropropionic acid (3NPA)を用いました。3NPAは分子量119 M.W, サトウキビやピーナッツに繁殖するカビによって作られる natural toxin である。作用機序はミトコンドリア電子伝達系の複合体IIの酵素であるコハク酸脱水素酵素を不可逆的に阻害することにより酸化リン酸化を障害することであり、実験的には全身のおよび局所投与で線状体に apoptosis を誘導して障害し不随意運動を起こすことから、ハンチントン病のモデル作成に用いられている。

対象には体重180～210gのSprague-Dawley Ratを用い、全身投与と局所投与とを行った。

全身投与実験では急性群と慢性群の2群に分けて投与を行った。急性群(n=4)では3NPA 30mg/kgを腹腔内にone shotで投与し、投与前、3時間後、24時間後にABR測定を行った。慢性群(n=4)ではネブタール40mg/kg腹腔内注射で麻酔後alzet社製浸透圧ポンプを腹腔内に埋込み、

24mg/kg/dで 4週間持続投与を行い、ABR 測定を一週毎に行った。

局所投与実験では、正円窓を経由して3NPAの投与を行った。3NPAの濃度別に500mM群(n=5)、200mM群(n=7)、50mM群(n=5)の3群に分け、生理食塩水を投与したものをコントロール(n=5)とした。

局所投与はネンブタール40mg/kg腹腔内注射による麻酔下に、まずABR測定において対側耳からの反応を除外するため、右蝸牛を機械的に破壊し、さらに左中耳骨胞を開放し、Becton-Dickinson社製ポリエチレンチューブPE10を直径150 $\mu$ mまで細く加工したものをmicromanipulatorを用いて正円窓窩に留置し、シリンジポンプで1.5 $\mu$ l/minの速さで2分間薬剤の滴下を行い、ゼラチン小片で正円窓窩をパッキングした後、閉創した。正円窓を経由して薬

物を投与した際の内耳薬物動態のシエーマを図1に示す。正円窓を通過して鼓室階(ST)に入った薬物は蝸牛孔を経て前庭階(SV)に達する場合と内リンパ腔(ELS)を通過して前庭階に浸透する場合とが考えられる。どちらを経由しても最終的には前庭階から前庭(V)へと到達することが期待できる。

ABR測定は投与前、1時間、3時間、1日、3日、7日後に行った。刺激音には20、16、12、8kHzのtone burstを用い、加算回数は512回とした。測定限界となる音圧(scale out)はそれぞれの周波数で79、80、96、93dBであった。各周波数毎に5dB間隔で刺激を行い、聴覚閾値を決定した。

実験動物に対しては衛生的な環境での飼育、適切な栄養、苦痛を最小限とするために十分麻酔をかけてからの外科処置、絶命といった動物愛護上の配慮を行った。

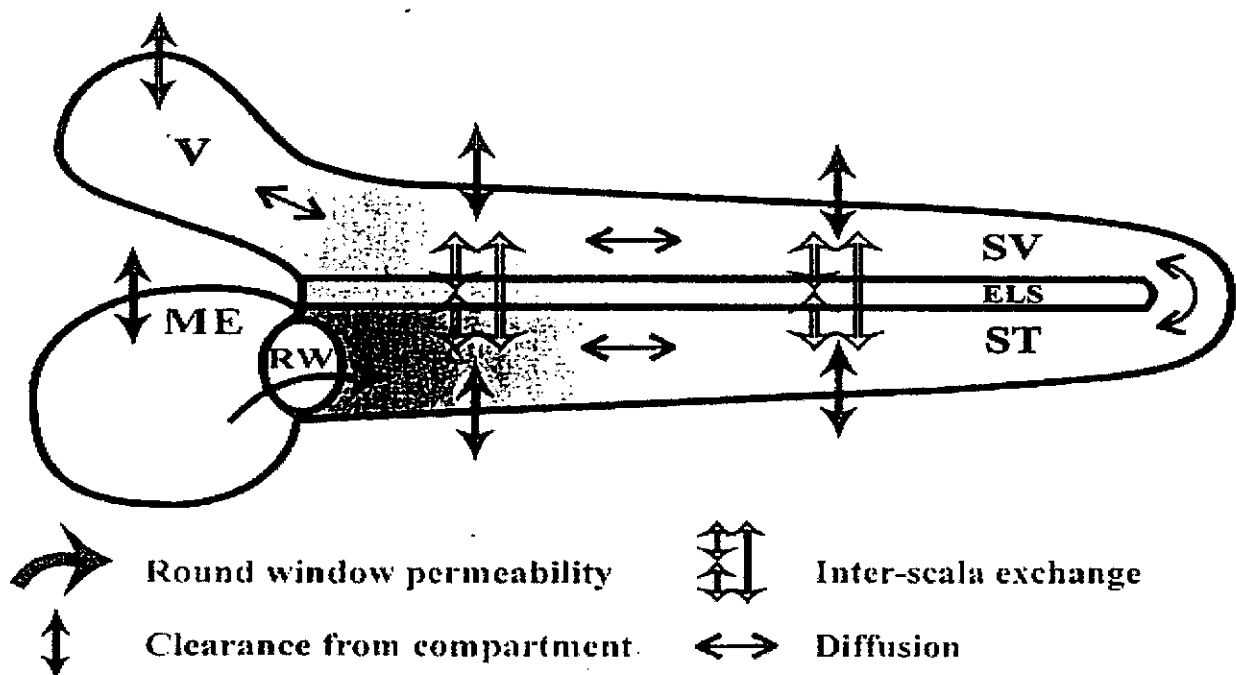


図1 正円窓経由内耳薬物動態

### C. 研究結果

全身投与実験では、急性群では全例で 3NPA の中枢症状と考えられる不動化が認められたが、ABR 閾値上昇は認められなかった。慢性群では 4 例中 3 例が 4 週までに死亡したが ABR 閾値上昇は認められなかった。

局所投与実験での各周波数における ABR 閾値の経時変化を図 2 に示す。20kHz において、500mM 群では 3NPA 投与後 1 時間で著明な閾値上昇を認め、全例で 3 時間経過時には scale out となり、一週間経過後も ABR の回復は認められなかった。200mM 群の平均でも 1 時間で聴覚閾値が上昇し、3 時間以後は 40db 程度の閾値上昇が認められたが、3 日目以後閾値が回復する傾向が認められた。しかしながら 7 例中閾値がほとんど上昇しない例が 2 例、scale out の例が 3 例あり、閾値のばらつきが認められた。50mM 群、コントロール (NaCl 群) では聴覚閾値の上昇はほとんど認められなかった。閾値変化について周波数毎の差違は認められなかった。

また、局所投与実験では 3NPA によると思われる死亡例はなく、良好な体重増加、と運動を認めたが、聴覚閾値上昇を認めた例では投与 1 日後に眼振が出現、3 日目以後は 3NPA 投与側が下になるよう首を傾げる姿勢が認められ、前庭器の障害を示唆した。

### D. 考察

全身投与実験では急性群と慢性群の 2 群とも聴覚閾値の上昇を認めなかった。急性群では 3-NPA の中枢症状と考えられる不動化が認められたことから、内耳における

3NPA の感受性は線状体より低いと考えられた。

慢性群では 4 例中 3 例が死亡した。3NPA の大量投与では線状体だけでなく腎臓あるいは肝臓の障害が出現することが報告されており、死因が腎障害または肝障害であれば内耳における 3NPA の感受性はこれらの臓器より低いことになる。これらのことから、3NPA の全身投与では難聴モデル動物の作製は困難であると考えられた。

局所投与実験では dose dependent な聴覚閾値上昇が認められた。3NPA の作用機序はミトコンドリア電子伝達系の酵素を不可逆的に阻害することによる酸化リン酸化の障害であり、正円窓膜を通過した 3NPA が内・外リンパ液に浸透して内耳組織のミトコンドリアを傷害し、聴覚閾値上昇を引き起こしていることが考えられた。

今回の実験では 200mM 投与群においてその他の群と比較して聴覚閾値のばらつきを認めた。一般にミトコンドリア病では各臓器毎に障害されたミトコンドリアの比率が一定数を越えると発症し、それ以下だと発症しない閾値効果という特徴があり、臨床像の多様性の原因となっている。正円窓から内耳への薬物の移行には正円窓付近の解剖の variation により、多少の差が生じていると考えられることから、内耳ミトコンドリアが障害を受ける閾値が 200mM 付近であると考えたと ABR のばらつきが説明できる。すなわちミトコンドリア病の閾値効果のため、内耳内薬物濃度がわずかに下がると ABR は正常となり、わずかに上がると著明な ABR 閾値上昇をきたすことになる。

今回の局所投与実験では内耳以外を障害



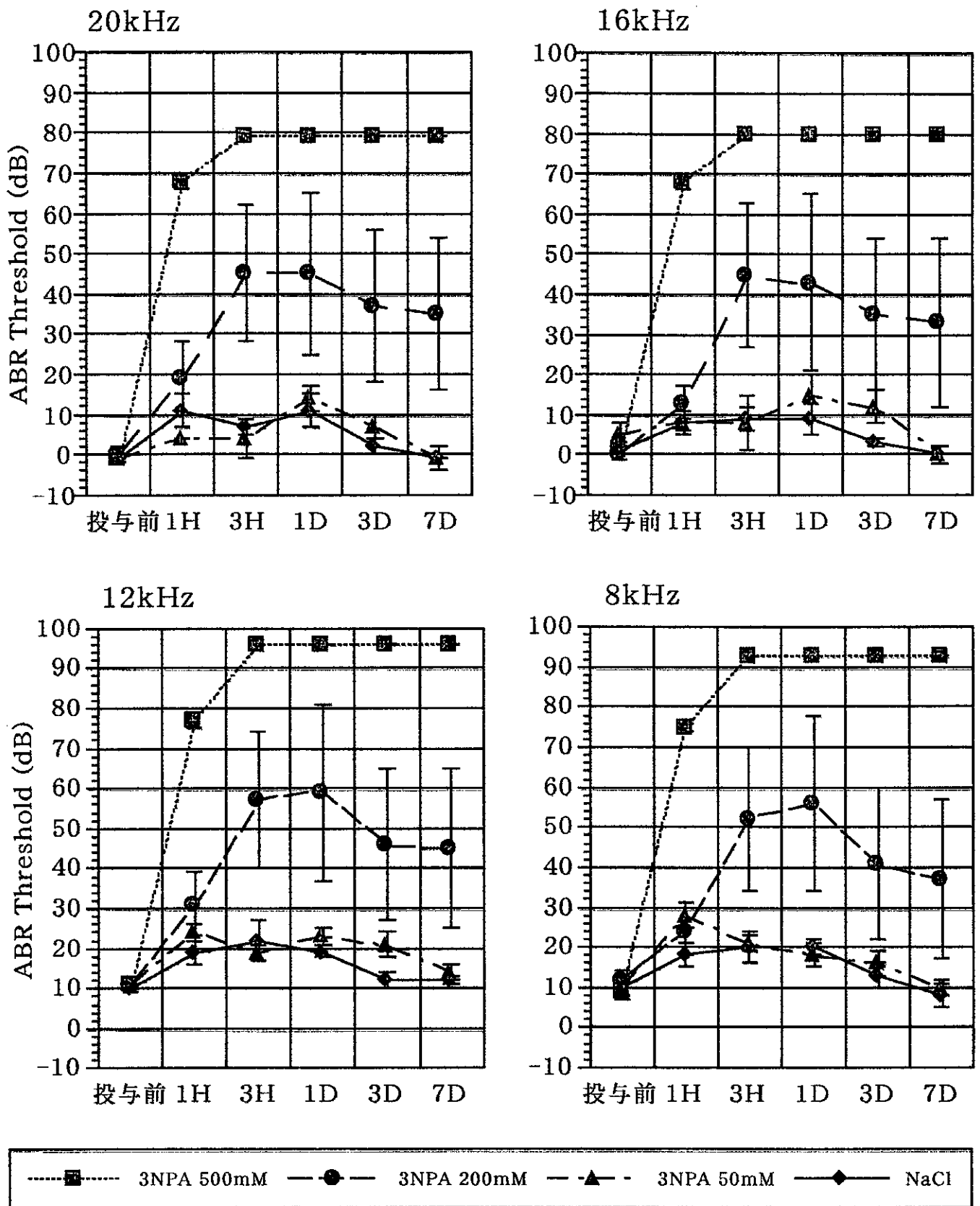


図2 局所投与群の各周波数におけるABR閾値変化

しないため個体のロス（死亡例）がなく、高濃度（500mM）の投与を行えば確実に閾値上昇を来すことから、ミトコンドリアの障害が内耳を傷害するメカニズムを検討するためのモデルとなりうることが示唆された。本法を用いて作製した内耳障害を超微形態的、酵素組織学的、免疫組織学的に検討することにより、ミトコンドリアの障害が聴覚を障害する病態の解明に貢献し、さらには実験的治療の検討を行うことが期待された。

#### E. 結論

ミトコンドリア遺伝性難聴の内耳障害のメカニズム解明、治療法の開発のため、ミトコンドリア障害難聴モデルの作製を行った。ミトコンドリアトキシシン 3-nitropropionic acid (3NPA)のラット蝸牛への局所投与により、内耳性難聴を起こすことに成功した。ミトコンドリア機能障害による内耳障害の病態を検討し治療法を開発するためのモデルとなりうると思われた。

#### F. 研究発表 なし

厚生科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）  
分担研究報告書

ミトコンドリア障害難聴モデルにおける病態の解明

研究協力者 岡本 康秀、保谷則之 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科  
分担研究者 松永 達雄 国立病院東京医療センター耳鼻咽喉科

研究要旨：内耳においてミトコンドリア障害がどのようなメカニズムで難聴を発症するのかまだ解明されていない。そこで、ミトコンドリアトキシン 3-nitropropionic acid (3-NPA)をラットの蝸牛へ局所投与され不可逆性閾値上昇を認めた難聴モデルラットを用い、透過型電子顕微鏡により病態解明を形態学的に検討した。ミトコンドリア障害のみられる部分は、特に蝸牛外側壁に強く、次にラセン神経節にみられ、外有毛細胞、内有毛細胞には変化が乏しかった。このことから本モデルにおける不可逆性閾値上昇は蝸牛外側壁の機能障害が主たる原因と考察した。今後このモデルラットを用いることで、内耳におけるミトコンドリア障害の分子レベルでの病態解明と、実験的治療の検討が可能となった。

A. 研究目的

ヒトではミトコンドリア病、例えばミトコンドリア脳筋症や糖尿病において難聴を呈することが知られている。しかし、このような疾患で、内耳においてミトコンドリアの障害がどのようなメカニズムで難聴を発症するのかについては解明されていない。そこで本研究では、ミトコンドリア障害難聴モデルを作成し、内耳にミトコンドリアトキシンを局所投与され、聴性脳幹反応で不可逆性閾値上昇を認めた難聴ラットを用いて、透過型電子顕微鏡により、内耳ミトコンドリア障害動物モデルでの聴覚障害の病態解明を形態学的に検討した。

B. 研究方法

先の分担研究者において作成された、ミトコンドリアトキシン：3-nitropropionic acid (3-NPA)を左耳へ局所投与され、聴性脳幹反応で不可逆性閾値上昇 (PTS) を認めた、体重 180-210g (8 週令-10 週令) の Sprague-Dawley Rat (S-D 系)を用いた。

解剖の対象は、正常コントロール、局所投与後 3 時間・1 日・2 週間のそれぞれ 2 耳 (計 8 耳) とした。

内耳は、駆血液 (0.01M P.B.S.) さらに、固定液 (0.1MP.B.S.、2.5%グルタルアルデヒド、2%パラフォルム) にて灌流固定を行なった後、断頭し摘出した。摘出し

た内耳に蝸牛頂と卵円窓、正円窓にマイクロ針でピンホールをあけ、一昼夜更に4℃の固定液に浸し再固定した。翌日より脱灰液(EDTA・2Na、5% Sucrose)に浸し6日後、洗浄液(0.1M cacodylate buffer)にて1日洗浄し、後固定(1%オスミウム)を2時間30分行った。その後脱水(50%エタノールから100%エタノール)を行い、エポキシ樹脂(EPON812、DDSA、MNA、DMP30)による包埋をおこなった。

試料は、蝸牛軸に平行に、ガラスナイフで厚切り切片を作り、トロイジンプルーで染色して光学顕微鏡用とした。更に蝸牛の第二回転部位のみを観察対象として、ダイヤモンドナイフで電子顕微鏡用薄切切片をつくった。透過型電子顕微鏡はHITACHI H600 ELECTRON MICROSCOPEを用いた。観察部位は、蝸牛外側壁、コルチ器、ラセン神経節を中心に、正常組織像と局所投与の組織像とで観察し、比較検討を行なった。

本研究はヘルシンキ宣言に法り、ラットに対して、動物舎を使用し衛生的な環境、飼育、栄養に注意し、また、解剖前には十分な腹腔内麻酔を行い動物愛護上の配慮をした。

### C. 研究結果

観察部位それぞれの経時的変化(3時間後、1日後、2週間後)を提示する。

#### 1. コルチ器

a. 有毛細胞：経時的に内有毛細胞の変性、ミトコンドリアの形態的变化を認めなかった。内有毛細胞神経終末も変化に乏しかった。(図1-a:3時間後 内有毛細胞、図2-a:3時間後内有毛細胞

神経終末、図1-b:1日後 内有毛細胞、図2-b:1日後 内有毛細胞神経終末、図1-c:2週間後 内有毛細胞、図2-c:2週間後 内有毛細胞神経終末)

b. 外有毛細胞：投与3時間後まではミトコンドリアは細胞周囲に存在する正常所見であった。1日後ではミトコンドリアの増殖像を認め、さらに2週間後にはミトコンドリアの増殖と不正配列(細胞周囲に配置されるミトコンドリアが、細胞の中心に集族される所見)を認めた。(図3-a:3時間後、図3-b:1日後、図3-c:2週間後)

#### 2. 外側壁

a. 血管条：投与3時間後には辺縁細胞、中間細胞の細胞間隙が広がり、細胞の萎縮像を認めた。1日後、2週間後でも改善は認められず、細胞の萎縮像のままであった。また、3時間後の辺縁細胞の核は正常所見に近いが、1日後、2週間後では核の変性が進行する経過が見られた。(図4-a:3時間後、図4-b:1日後、図4-c:2週間後)

b. ラセン靭帯：3時間後で線維細胞に萎縮像を認めた。更に1日後、2週間後には細胞破壊が進み、線維細胞の回復は認められなかった。(図5-a:3時間後、図5-b:1日後、図5-c:2週間後)

#### 3. ラセン神経節

3時間後には神経節内のミトコンドリアの著明な膨化像を呈した。1日後では神経節細胞の細胞変性と、ミトコンドリアの膨化所見が改善している細胞が混在する。2週間では残存神経節細