

20030604

厚生労働省科学研究費補助金

感覚器障害研究事業

遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成

平成15年度 総括研究報告書

主任研究者 泰地 秀信

平成16(2004)年4月

目次

I. 総括研究報告	
1. A1555G ミトコンドリア DNA 変異家系の全ミトコンドリア DNA 解析 松永達雄、泰地秀信	1
2. 内耳ミトコンドリア機能障害難聴モデルラットを用いた難聴の病態解析および新規治療方法の検討 神谷和作、新田清一、滝口洋一、松永達雄、泰地秀信	6
3. コネキシン 26 遺伝子変異家系での検討 松永達雄、泰地秀信	13
4. A1555G ミトコンドリア DNA 変異およびコネキシン 26 遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針 松永達雄、泰地秀信	23
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	31

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成

1. A1555G ミトコンドリア DNA 変異家系の全ミトコンドリア DNA 解析

分担研究者 松永達雄

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
聴覚障害研究室長

主任研究者 泰地秀信

国立成育医療センター 耳鼻咽喉科医長

研究要旨：A1555G ミトコンドリア DNA 変異による難聴の発症に、それ以外のミトコンドリア DNA 変異の関与を解明するため、正常聴覚から高度難聴までの様々な程度の難聴を呈する、同一家系内の 8 人において全ミトコンドリア DNA の塩基配列をシーケンス解析した。この結果、全ミトコンドリア DNA 塩基配列は 8 人とも同一であり、また正常のミトコンドリア DNA 塩基配列と比較では A1555G 変異以外に病的変異を認めなかった。以上より、以上の結果および本家系での難聴の程度や発症の時期が同一の同胞内で類似して異なる同胞間では関連しないことから、本遺伝子変異による難聴の発症には、核遺伝子が修飾因子である可能性が考えられた。

A 研究目的

A1555G ミトコンドリア DNA 変異では、アミノグリコシド系抗生物質の投与がなくても難聴を発症しうる事が知られている。またそのような場合で発症する難聴において、様々な程度の障害が報告されている。今回我々は、同一家系内で A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有し、正常聴力から高度難聴まで様々な程度の難聴を呈するメンバーにおいて、A1555G 以外のミトコンドリア DNA 変異が難聴発症の修飾因子として関与しているかを検討した。

B.研究方法

A1555G ミトコンドリア DNA 変異を有して、正常聴覚から高度難聴までの様々な程度の難聴を呈する、同一家系内の 8 人において、全ミトコンドリア DNA の塩基配列をシーケンシング解析した。採血後、白血球を分離、genomic DNA を抽出、96 種類の primer set を用いた long PCR で増幅、ABI3700 シーケンサーで解析した。この結果をミトコンドリア DNA 塩基配列データベース (MITOMAP) および正常聴力を有する日本人 200 人のミトコンドリア DNA 塩基配列と比較した。

(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

行なうため、「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」を遵守して進める。すなわち人間の尊厳に対する十分な配慮、事前の十分な説明と自由意志による同意、個人に関する情報の徹底、人類の知的基盤、健康、福祉へ貢献する社会的に有益な研究の実施、個人の人権の保障の科学的、社会的利益に対する優先、本指針に基づく研究計画の作成、遵守及び事前の倫理審査委員会の審査・承認による研究の適正性の確保、研究の実施状況の第三者による調査と研究結果の公表を通じた研究の透明性の確保に関して、十分に注意を払いながら実施する。遺伝子以外のヒトおよび動物を対象とする研究を行なう際にも、動物愛護上の配慮をし、上述した項目を遵守する。以上の徹底により倫理面での問題がないと判断する。

C.研究結果

8 人全員でミトコンドリア DNA 塩基配列は完全に同一であった。この塩基配列内には 40 の 1 塩基置換が認められた。このうち A1555G 変異のみが病的変異であり、他の 39 変異は病的意義を持たない多型として報告されているものであった。

D.考察

これまでに A1555G ミトコンドリア DNA 変異による難聴家系間の聴覚障害の程度の差が、別の塩基変異の重複に関係している例も報告されており、今回我々は同一家系内の聴覚障害の差にも、新たな塩基変異が生じている可能性があるのではないかと考え、全ミトコンドリア DNA 塩基配列をシーケンス解析した。しかし、ことなる程度の難聴者間に塩基配列の差は全く認められなかった。さらにその塩基配列には、A1555G 変異以外には病的意義のある変異も認めなかった。以上の結果および本家系での難聴の程度や発症の時期が同一の同胞内で類似していて異なる同胞間では関連しないことから、A1555G ミトコンドリア DNA 変異による難聴の発症には、核遺伝子が修飾因子として関与している可能性が高いと考えられた。

E. 結論

本研究結果は、ミトコンドリア DNA に A1555G のみの病的変異が存在し、それ以外のミトコンドリア DNA の塩基配列が同一である人でも、正常聴力から高度難聴までの種々の程度の難聴を呈しうることを示している。

F. 研究発表

1. 論文発表

松永達雄、難聴遺伝子研究の現況と展望、医療、2004、印刷中

Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Goto Y, Usami S.

Audiological features and mitochondrial DNA sequence in a large family carrying mitochondrial A1555G mutation without use of aminoglycoside.

Ann Otol Rhinol Laryngol 2004 in press.

Matsunaga T, Kumanomido H, Shiroma M, Ohtsuka A, Asamura K, Usami S.

Deafness due to A1555G mitochondrial mutation without use of aminoglycoside. Laryngoscope 2004 in press.

Hoya N, Okamoto Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T.

A novel animal model of acute cochlear mitochondrial dysfunction.

Neuroreport 2004 in press.

Okamoto Y, Hoya N, Kamiya K, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T.

Permanent threshold shift caused by acute cochlear mitochondrial dysfunction is primarily mediated by degeneration of lateral wall.

Audiol & Neurootol in review.

2. 学会発表

松永達雄、熊野御堂浩、鈴木隆史、
城間将江、廣田栄子、佐藤美奈子、
泰地秀信、新美成二、宇佐美真一
A1555G ミトコンドリア DNA 変異を
伴う聴覚障害の発症・修飾因子
第104回 日本耳鼻咽喉科学会総会・
学術講演会、東京、15年5月22日-24
日

Hoya N, Okamoto Y, Nakagawa S,
Suzuki T, Taiji H, Matsunaga T.
Local application of a mitochondrial
toxin, 3-Nitropropionic Acid causes dose
dependent ABR threshold shift on rat
cochlea: a model for sudden deafness.
40 th Inner Ear Biology Workshop,
Granada, Spain, 2003年9月7-10日

松永達雄、熊野御堂浩、城間将江、
佐藤美奈子、廣田栄子、泰地秀信、
新美成二、宇佐美真一
A1555G ミトコンドリア DNA 変異に
伴う聴覚障害の特徴と病態生理
第48回 日本聴覚医学会総会、東京、
15年9月25日、26日

鈴木隆史、保谷則之、岡本康秀、増
田圭奈子、泰地秀信、松永達雄
遺伝子変異の疑われる原因不明後天
性感音性難聴における難聴遺伝子ス
クリーニング
第13回 日本耳科学会総会、幕張、

15年10月16-18日

岡本康秀、保谷則之、増田圭奈子、
鈴木隆史、泰地秀信、松永達雄
ミトコンドリアトキシン投与による
内耳障害：突発性難聴モデルの組織
学的検討
第13回 日本耳科学会総会、幕張、
15年10月16-18日

保谷則之、岡本康秀、鈴木隆史、増
田圭奈子、泰地秀信、松永達雄、ミ
トコンドリアトキシン投与によるラ
ット内耳障害：突発性難聴モデルの
作成、第13回 日本耳科学会総会、
幕張、15年10月16-18日

神谷和作、保谷則之、岡本康秀、新
田清一、中川進、藤井正人、松永達
雄
内耳ミトコンドリア機能障害による
難聴モデルラットの作成とその難聴
の病態解析
第3回 日本ミトコンドリア研究会、
福岡、15年12月18-20日

松永達雄
遺伝子変異による進行性聴覚障害に
対する医療指針の作成
平成15年度 厚生労働科学研究感覚
器障害研究成果発表会、東京
平成16年1月16日

Okamoto Y, Hoya N, Kamiya K, Ozawa H, Nakagawa S, Taiji H, Fujii M, Matsunaga T.

Degeneration of the fibrocytes in the spiral ligament primarily mediates hearing loss caused by acute cochlear mitochondrial dysfunction.

27 th Annual Midwinter Research Meeting of the Association for Research

in Otolaryngology, Daytona Beach, Florida, USA, 27 th Annual Midwinter Research Meeting of the Association for Research in Otolaryngology, Daytona Beach, Florida, USA, 2004 年 2 月 21-26 日

G.知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生省労働科学研究費（感覚器障害研究事業）
総括研究報告書

遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成

2. 内耳ミトコンドリア機能障害難聴モデルラットを用いた難聴の病態解析および新規治療方法の検討

協同研究者 神谷和作

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
流動研究員

協同研究者 新田清一

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
臨床研究部員

協同研究者 滝口洋一

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
臨床研究部員

分担研究者 松永達雄

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター
聴覚障害研究室長

主任研究者 泰地秀信

国立成育医療センター 耳鼻咽喉科医長

研究要旨：内耳蝸牛における聴覚刺激の受容には、内リンパ液へのカリウム輸送を中心とした能動輸送が必須であり、このために多くの ATP を必要とする。そのため多くの難聴にエネルギー産生障害が関わっていると考えられるがその病態メカニズムは明らかとなっていない。本研究ではミトコンドリア機能障害

薬、3-nitropropionic acid(3-NP)の内耳への局所投与により作成したモデルラットにより内耳エネルギー産生障害における病態および聴力回復メカニズムを解析した。その結果ミトコンドリア機能障害では、最初期に蝸牛外側壁およびラセン板縁の線維細胞が限局的かつ劇的なアポトーシスにより消失し、カリウム輸送経路を遮断された結果、内リンパ液のカリウム濃度が低下し、これにより聴力が低下することが示唆された。その後の線維細胞の再生に伴い聴力が回復する事も明らかとなった。また、幾つかの組織保護、修復因子がエネルギー産生障害後に蝸牛において発現が高まっていること、骨髄間葉系幹細胞移植により障害を受けた部位に、細胞が生着することが確認できた。これらの結果は、今後の新しい治療法開発につながる可能性がある。

A. 研究目的

ミトコンドリア DNA 変異により高頻度に内耳性難聴が生じることは広く知られており、正常の内耳蝸牛の機能を維持するためにミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが考えられる。しかし、これまでミトコンドリア障害による内耳性難聴（特に高度難聴）の病態解析は、モデル動物の作成が困難なためほとんどされていない。本研究ではミトコンドリアトキシンである 3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) の内耳蝸牛への局所投与により、ミトコンドリア機能障害による内耳性難聴のモデル動物を作成し、内耳障害の病態やその修復のメカニズムを解明することを目的とした。また新規治療方法の検討として幹細胞移植による治療方法の効果についても検討を加えた。

B. 研究方法

a. SD ラット 8-10 週齢の蝸牛正円窓下に 0.3M または 0.5M の 3-NP を 3 μ l 滴下し、投与後の聴力を ABR(聴性脳幹反応)によりモニタリングした。投与後の蝸牛の病態変化とその後の修復過程を BrdU の連続投与、TUNEL 法、免疫組織化学等により解析した。

b. 同条件下の細胞内分子動態を *in vitro* でモニタリングするため、コルチ器および蝸牛外側壁の器官培養、蝸牛線維芽細胞の拡散培養系を確立した。また、内耳におけるカリウム輸送において重要な働きをするコネキシン 26 にレポーター遺伝子として GFP を付加した発現用プラスミドを作成し、これを分子ターゲットとしたイメージングの検討を行った。

c. *in vivo* で内耳局所に 0.3M 濃度の

3-NP 投与後の蝸牛における組織保護的に働く分子の mRNA の発現を Real time PCR法により経時的に解析した。投与前、投与後 3 時間、投与後 1 日、投与後 3 日の蝸牛をそれぞれ 4 耳づづ用いた。検討した分子は、ストレス応答蛋白 (HO-1, Hsp27, Hsp70, Hsp90)、Neurotrophin (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) とその受容体、GDNF とその受容体、FGF とその受容体である。

d. 聴力低下を示したラットにラット骨髄由来間葉系幹細胞移植による聴力回復を目的とした検討を行った。

e. 0.5M3-NP 蝸牛局所投与により聴力低下を示したラットにフリーラジカルスカベンジャー edaravon (3mg/ml)をマイクロチューブつきのシリンジポンプで 3ul 投与してその効果を検討した。3-NP を正円窓窩に投与し、直後に edaravon を投与して、その後 1 時間、1 日、7 日、14 日後の聴覚閾値を ABR で測定した。コントロールとしては edaravon の代わりに生理食塩水を投与した。

(倫理面への配慮) 本研究では動物実験、遺伝子解析を行なうため、「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」

を遵守して進める。すなわち人類の知的基盤、健康、福祉へ貢献する社会的に有益な研究の実施、本指針に基づく研究計画の作成、遵守及び事前の倫理審査委員会の審査・承認による研究の適正性の確保、研究の実施状況の第三者による調査と研究結果の公表を通じた研究の透明性の確保に関して、十分に注意を払いながら実施する。動物を対象とする研究を行なう際にも、動物愛護上の配慮をし、上述した項目を遵守する。以上の徹底により倫理面での問題がないと判断する。

C. 研究結果

a. 線維細胞の再生による聴力の回復
3NP 0.3M 投与群において蝸牛外側壁およびラセン板縁の線維細胞に限局的で劇的なアポトーシスが観察された。また BrdU の取り込みにより示される蝸牛線維細胞の再生が同時に確認され聴力もそれに伴い回復していった。有毛細胞やらせん神経節細胞にアポトーシスや再生は見られなかった。また、3NP 投与後 6 日間 BrdU を連続投与されたラットでは、42 日後の聴力回復後の修復された組織にも BrdU 陽性細胞が確認され、3NP 投与後に分裂した線維細胞が障害部位を補充することにより聴力が回復したことが示唆された。

本実験により、急性の内耳ミトコンドリア障害では、聴覚受容に直接働く有毛細胞や神経細胞ではなく、内リンパ液のイオン組成の維持に重要な働きをする蝸牛線維細胞を中心としたアポトーシスとその後の再生によって高度難聴とその後の聴力回復が起こり得ることが示唆された。本実験モデルによりミトコンドリア機能障害による難聴発症の病態のみでなく聴力回復の新たなメカニズムを解析することが可能となり、内耳の虚血による突発性難聴等の病態や治療の研究に役立つと考えられる。

b. 蝸牛の *in vitro* イメージングシステムの開発

ヒトおよびラットのコネキシン 26 遺伝子に GFP 遺伝子を付加した発現用プラスミド (hCx26-GFP, rCx26-GFP) をそれぞれ作成した。これらはリポフェクション法により Hela 細胞への導入が可能であった。また、コネキシン 26 の分子イメージングに用いるため蝸牛外側壁、コルチ器の器官培養系や蝸牛線維細胞の拡散培養系が確立された。

c. 3-NP 投与前、投与後 3 時間、24 時間、72 時間での、各分子 mRNA の発現を測定したところ、Heat Shock Protein の HSP70、HO-1、

HSF-1、Neurotrophin の BDNF、GDNF、GDNF 受容体の GFR alpha-3 の発現が、それぞれ投与 3 時間あるいは 24 時間をピークとして上昇が認められた。特に Hsp70 デは、3 時間後にはコントロールの 10 倍以上、1 日後には 50 倍以上、3 日後には 10 倍のレベルの上昇が認められた。

d. 骨髄間葉系幹細胞移植による聴力回復の検討

3NP による聴覚障害モデルラットの外側壁および半規管経由で外リンパ液にラット骨髄由来間葉系幹細胞の移植を行った。正常ラットでの検討では、外側壁への移植により高度難聴に陥る場合が多いが、半規管からの注入の場合は聴力の低下は全く見られなかったため、半規管からの注入が最適と考えられる。3NP 0.5M の持続性難聴ラットへの移植では、現段階では聴力回復は確認されていない。本実験では雌ラットに雄由来の間葉系幹細胞を移植したため、Y 染色体特異的遺伝子 Sry をプローブとしたパラフィン切片上での FISH 法を用いて検出を行った。その結果、外側壁および半規管経由の両マウスの蝸牛内において間葉系幹細胞の生着がライスネル膜およびラセン靭帯において認められた。

e. フリーラジカルスカベンジャー edaravon の効果

3-NP による聴覚障害に対して、フリーラジカルスカベンジャー edaravon の内耳局所投与では、ABR による聴覚閾値を改善する効果は認められなかった。

D. 考察

本研究ではミトコンドリア機能阻害薬での聴力低下とその後の聴力回復メカニズムの一端が明らかとなった。3NP 0.3M 投与 3 日後の蝸牛では外側壁の一部とラセン板縁の線維細胞にて、限局的かつ劇的なアポトーシスが TUNEL 法および形態的所見においてもアポトーシス小体やクロマチン凝集として検出された(図 1、2)。線維細胞の一部に限局してアポトーシスが起これるとこの結果は、正円窓下に投与され外リンパ液に浸透した 3NP が直接的な毒性により蝸牛内の細胞変性を引き起こしているのではなく、蝸牛内のミトコンドリア機能阻害による二次的な結果として引き起こされたことを示している。この限局した二つの部位はともに蝸牛でのカリウム輸送経路の重要なポイントであり、ミトコンドリア機能阻害の結果 ATP が欠乏し、 $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ 機能の低下とともに能動輸送が停止したため、両部位で

のカリウムイオンの過剰流入あるいは能動輸送不全によるカリウム欠乏に至った結果としてアポトーシスが引き起こされたと考えられる。また BrdU の連続投与により、傷害部位周辺の線維細胞の再生が検出された。3NP 投与後 6 日間 BrdU ラベルされたこれらの再生細胞は、外側壁が修復され聴力がほぼ回復する 42 日後においても外側壁中に検出されたため、線維細胞の再生によるイオン輸送の正常化が聴力回復へ導いたと考えられる。

また各種の組織保護因子の mRNA の発現の検討結果から、ミトコンドリア機能阻害に反応して幾つかの分子の発現が増加していることが確認できており、今後これらの分子を投与することにより、障害の修復、軽減が可能かどうかを検討する予定である。

フリーラジカルスカベンジャーを直接投与した実験では、効果が得られなかったが、極めて高い濃度のみでの検討であり、今後濃度を変えての検討を行なう必要がある。

今後、これらのデータをもとに聴力回復のメカニズムを更に詳細に解析し、間葉系幹細胞等を用いた再生治療の検討も進めていく予定である。



図1. 3-NP0.3M 投与3日後の Spiral limbus に見られる線維細胞のアポトーシス。顕著なクロマチン凝集およびアポトーシス小体が見られる (矢印)。

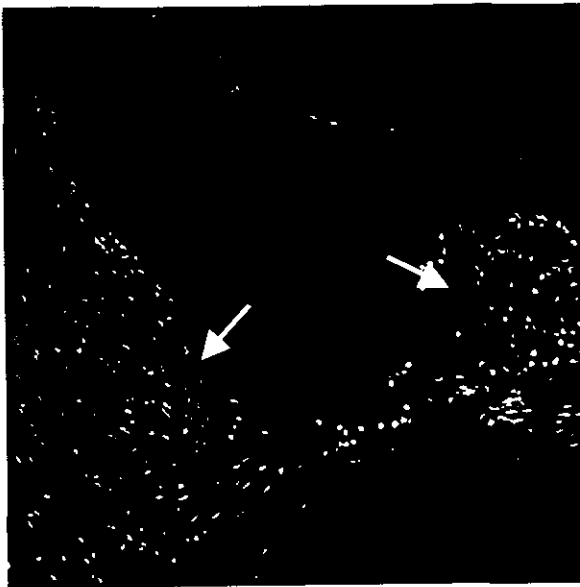


図2. 3-NP 0.3M 投与3日後に見られる線維細胞のアポトーシス (TUNEL法)。外側壁の一部とラセン板縁に限局的かつ劇的なアポトーシスが見られる (矢印)。

E. 結論

本研究では内耳ミトコンドリア機能障害による聴力低下とその後の聴力回復のメカニズムを解析した。その結果、初期の聴力低下は、有毛細胞の変性ではなく蝸牛外側壁およびラセン板縁の線維細胞における限局的かつ劇的なアポトーシスによって引き起こされることが明らかとなった。このことは虚血などによる内耳エネルギー産生障害においては蝸牛線維細胞のアポトーシスが最も初期に起こる病態変化であることを示している。線維細胞のアポトーシスにより、カリウムイオン輸送経路が遮

断され、聴力が低下したと考えられる。また、線維細胞の再生に伴い聴力が回復したことから、内耳エネルギー産生障害による聴力低下においては線維細胞の再生法の検討が今後の治療検討の課題となると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

神谷和作、保谷則之、岡本康秀、新田清一、中川進、藤井正人、松永達雄

ミトコンドリア機能障害による難聴モデルラットの作成とその難聴の病態解析 第3回日本ミトコンドリア研究会年会 福岡 2003年12月18日

H. 知的財産権の出願・登録

なし

厚生省労働科学研究費（感覚器障害研究事業）

総括研究報告書

遺伝子変異による進行性聴覚障害に対する医療指針の作成

3. コネキシン 26 遺伝子変異家系での検討

分担研究者 松永達雄

独立行政法人国立病院機構東京医療センター臨床研究センター

聴覚障害研究室長

主任研究者 泰地秀信

国立成育医療センター 耳鼻咽喉科医長

研究要旨：コネキシン 26 遺伝子変異は、日本人で保因者頻度が最も高いと考えられている難聴遺伝子であり、一部の症例で進行性難聴との関連性が報告されている。本研究ではコネキシン 26 遺伝子変異による先天性聴覚障害の臨床像全般の解明を目的とした。対象は、非症候群性先天性難聴で本研究への説明を行ない同意を得られた 43 人であり、問診、難聴遺伝子検査および各種聴力検査、画像検査、聴覚リハビリテーション効果、言語発達記録を解析した。この結果、1) コネキシン 26 遺伝子変異による先天性聴覚障害では、進行性の経過を示す場合もありうること、2) コネキシン 26 遺伝子変異による先天性聴覚障害では、遺伝子型から予測される蛋白質の一次構造の組み合わせに基づいた機能と聴覚レベルとの間にある程度の相関が認められるが、異なる場合もあり遺伝カウンセリングには慎重な活用が求められること、3) コネキシン 26 難聴と非コネキシン 26 難聴では、聴力レベルの分布、オーディオグラムの形態、難聴進行、発症に関連の疑われるエピソード、家族歴、CT 検査結果、診断及び補聴開始年令、語彙発達、コミュニケーション手段、ABR 波形の特徴に差が認められること、4) 一方でオーディオグラム左右対称性、最高語音明瞭度、最高母音明瞭度、読書力には差を認めないこと、が明かとなった。

A. 研究目的

コネキシン26遺伝子変異は、日本人で保因者頻度が最も高いと考えられている難聴遺伝子であり、先天性難聴の主たる原因であることが知られている。これまでにコネキシン26遺伝子変異では一部の症例で進行性難聴との関連性が報告されている。本研究では、コネキシン26遺伝子変異による先天性聴覚障害に対して1) 聴覚障害の臨床像の詳細を明らかにして、早期鑑別診断を効率化する、2) 発症要因（遺伝因子と環境因子）を解明し、聴覚障害の予後の推定と予防に活用する、3) 治療法と聴覚リハビリテーション効果を評価して、現時点で最適な治療法と聴覚リハビリテーション方法の選択を可能とするの3点を目的とした。コントロールとして非コネキシン26遺伝子変異による先天性聴覚障害と比較検討した。

B. 研究方法

対象：

国際医療福祉大学クリニック言語聴覚センターで聴覚管理・リハビリテーションをしている非症候群性先

天性難聴で、本人または両親に対して本研究への説明を行ない同意を得られた43人を対象とした。

方法：

1) コネキシン26遺伝子検査

難聴者本人と、可能であればその両親より採血を行ない、コネキシン26遺伝子のエキソンをシークエンスして、変異解析を施行した。その結果を基に、対象者をコネキシン26遺伝子変異を有する難聴（コネキシン26難聴）と、コネキシン26遺伝子正常の難聴（非コネキシン26難聴）の2群に分類した。

2) コネキシン26遺伝子変異の有無と聴力レベル

コネキシン26難聴群と非コネキシン26難聴群で、聴力レベル（良聴耳500-4000Hz 純音聴力閾値平均）の特徴を比較検討した。

3) コネキシン26蛋白質発現パターンと聴力レベル

コネキシン26難聴群を一对のコネキシン26遺伝子の蛋白質発現パターンで分類し、各パターンの対象にお

ける聴力レベル（良聴耳 500-4000Hz 純音聴力閾値平均）の特徴を検討し、比較した。

4) オーディオグラムの形態的特徴

a. 周波数

難聴者の純音聴力検査結果（オーディオグラム）を、その形態的特徴から水平型、高音漸傾型、高音急墜型、低音障害型、低音残存型、U字型、完全無反応に分類し、コネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群における各分類の分布を比較した。

b. 左右対称性

左右の耳の 5000-4000Hz 純音聴力検査閾値平均の差が 15dB 未満であれば対称、15dB 以上であれば非対称とし、コネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群で比較した。

5) 難聴進行

a. 問診により難聴進行の有無を検討した。

b. 1年以上の期間をおいて左右別の純音聴力検査が施行しえたコネキシン 26 難聴 10 人と非コネキシン 26 難聴 16 人で、進行の有無を比較検討した。

6) 発症のエピソード、家族歴、CT 検査結果

対象における難聴の発症に少しでも関連のありそうなエピソードの有無、家族歴、CT による内耳、側頭骨の異常の有無について検討し、コネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群で比較した。

7) 診断年令、補聴開始年令

診断年令と補聴開始年令をコネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群で比較した。

8) 最高語音明瞭度、最高母音明瞭度

語音明瞭度に最も関連が強い 500-2000Hz の純音聴力閾値平均と補聴機装用時の最高語音明瞭度、最高母音明瞭度の関係をコネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群で比較した。

9) 聴性脳幹反応

両耳の I 波、V 波の閾値と潜時と 2000-4000Hz 純音聴力閾値平均の関係を、コネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群で比較した。

10) 言語発達

a. 生活年齢 10 才以下で施行された語彙年齢、b. 最新の読書力、c. コミュニケーション方法（聴覚口話、手話・指文字、併用）を、コネキシシ 26 難聴群と非コネキシシ 26 難聴群で比較した。

（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なうため、「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」を遵守して進める。すなわち人間の尊厳に対する十分な配慮、事前の十分な説明と自由意志による同意、個人に関する情報の徹底、人類の知的基盤、健康、福祉へ貢献する社会的に有益な研究の実施、個人の人権の保障の科学的、社会的利益に対する優先、本指針に基づく研究計画の作成、遵守及び事前の倫理審査委員会の審査・承認による研究の適正性の確保、研究の実施状況の第三者による調査と研究結果の公表を通じた研究の透明性の確保に関して、十分に注意を払いながら実施する。遺伝子以外のヒトおよび動物を対象とする研究を行なう際にも、動物愛護上の配慮をし、上述した項

目を遵守する。以上の徹底により倫理面での問題がないと判断する。

C. 研究結果

1) コネキシシ 26 遺伝子検査結果

対象 43 人中、コネキシシ 26 難聴は 25 人に、非コネキシシ 26 難聴は 18 人であった。コネキシシ 26 難聴 25 人の遺伝子型別の分布は、235delG の homozygote 8 人、各種複合 heterozygote 13 人、heterozygote 4 人であった。遺伝子変異は 9 種類であり、遺伝子型としては 10 種類が認められた（図 1）。

2) コネキシシ 26 遺伝子変異の有無と聴カレベル

コネキシシ 26 難聴群と非コネキシシ 26 難聴群の聴カレベル（良聴耳 500-4000Hz 純音聴力閾値平均）を図 1 に示した。コネキシシ 26 難聴群では、中等度難聴と最高度難聴を呈する二峰性の分布であった。非コネキシシ 26 難聴群は高度から最高度難聴のなだらかな一峰性の分布を呈した。

3) コネキシシ 26 蛋白質発現パターンと聴カレベル

10 種類の遺伝子型から考えられるコネキシン 26 蛋白質発現パターン 10 種類と良聴耳の 500-4000Hz 純音聴力閾値平均との関係を図 1 に示した。数が少ないために統計的有意差はでないが、各発現パターンごとに聴力レベルに一定の特徴を有する可能性が示されている。

4) オーディオグラムの形態的特徴

a. コネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群におけるオーディオグラムの形態的特徴の分布を図 2 に示した。コネキシン 26 難聴群では、水平型、高音漸傾型がほぼ同頻度で多い点と、U 字型、無反応がない点が特徴であった。非コネキシン 26 難聴群では、高音漸傾型が最多で、高音急墜型が続き、それ以外はいずれも低頻度である点が特徴であった。

b. 左右対称性

コネキシン 26 難聴群と非コネキシン 26 難聴群のいずれも、左右対称が約 75% で、非対称が約 25% であった。

5) 難聴進行

a. 問診による調査結果

コネキシン 26 難聴群 25 人中 2 人

で難聴進行の病歴が認められた。非コネキシン 26 難聴群では、18 人中 2 人で進行が、1 人で進行と変動が病歴で認められた。

b. オーディオグラムによる検討結果

1 年以上の期間において施行された純音聴力検査（良聴耳 5000-4000Hz 純音聴力検査閾値平均）において、コネキシン 26 難聴群 10 人では 10dB 以上の聴力低下を呈する例を認めなかった。一方、非コネキシン 26 難聴 16 人では 4 人で 10dB 以上の聴力低下を呈した。

6) 発症のエピソード、家族歴、CT 検査結果

難聴発症との関連が疑われたエピソードは、コネキシン 26 難聴群で 2 人、非コネキシン 26 難聴群で 6 人認められた。コネキシン 26 難聴群のエピソードは、2 人が出生時に黄疸があり光線療法を 1 日受けたというものであった。非コネキシン 26 難聴群では、3 才 0 ヶ月で肺炎になりその頃から難聴発症疑いが 1 人、8 ヶ月で高熱になりその頃から難聴発症疑いが 1 人、妊娠中に母が原因不明の血小板減少となり血小板輸血を要した 1 人、

6ヶ月で高熱になりその頃から難聴発症疑いが1人、生後3日で無菌性髄膜炎（無症状）が1人、妊娠中に母がインフルエンザ感染した1人であった。

難聴の家族歴は、コネキシン26難聴群で14人、非コネキシン26難聴群で5人であった。

CT検査結果はコネキシン26難聴群では施行した18人全員正常であった。非コネキシン26難聴群では施行した14人の3人で内耳奇形が認められた。両耳蝸牛頂回転の異常と前庭腔拡大が1人、両耳前庭水管拡大が1人、両耳半規管奇形と蝸牛頂回転の異常が1人であった。

7) 診断年令、補聴開始年令

難聴の診断年令は、コネキシン26難聴群で判明した18人で平均1才8ヶ月であり、非コネキシン26難聴群で判明した17人で平均2才7ヶ月であった。補聴開始年令は、コネキシン26難聴群で判明した19人で平均2才1ヶ月であり、非コネキシン26難聴群で判明した17人で平均2才11ヶ月であった。

8) 最高語音明瞭度、最高母音明瞭度
補聴機装用時の最高語音明瞭度と最高母音明瞭度のいずれも、コネキシン26難聴群と非コネキシン26難聴群で、500-2000Hzの純音聴力閾値平均との関連性について差を認めなかった。純音聴力閾値平均の低下とともに最高語音明瞭度と最高母音明瞭度が低下した、その低下の程度に2群間で差を認めなかった。

9) 聴性脳幹反応

ABRはコネキシン26難聴群15人と非コネキシン26難聴群13人で施行されており反応の閾値についての情報が得られた。ABRの閾値と純音聴力検査の閾値は、全例で整合性がとれるものであった。

実際に当施設あるいは他施設で施行された記録を検討することが可能であったのは、コネキシン26難聴群9人と非コネキシン26難聴群5人であった。コネキシン26難聴群では、I波閾値はV波閾値と同じか高く、各波の潜時延長を認めなかった。非コネキシン26難聴群では2人の片耳で、I波のみ100dBで認められV波は認められないという波形が検出された。