

図 1. 疲労度(横軸)とADH(縦軸)の関係. 疲労度は夜勤明けで増加するが, ADHと相関しない.

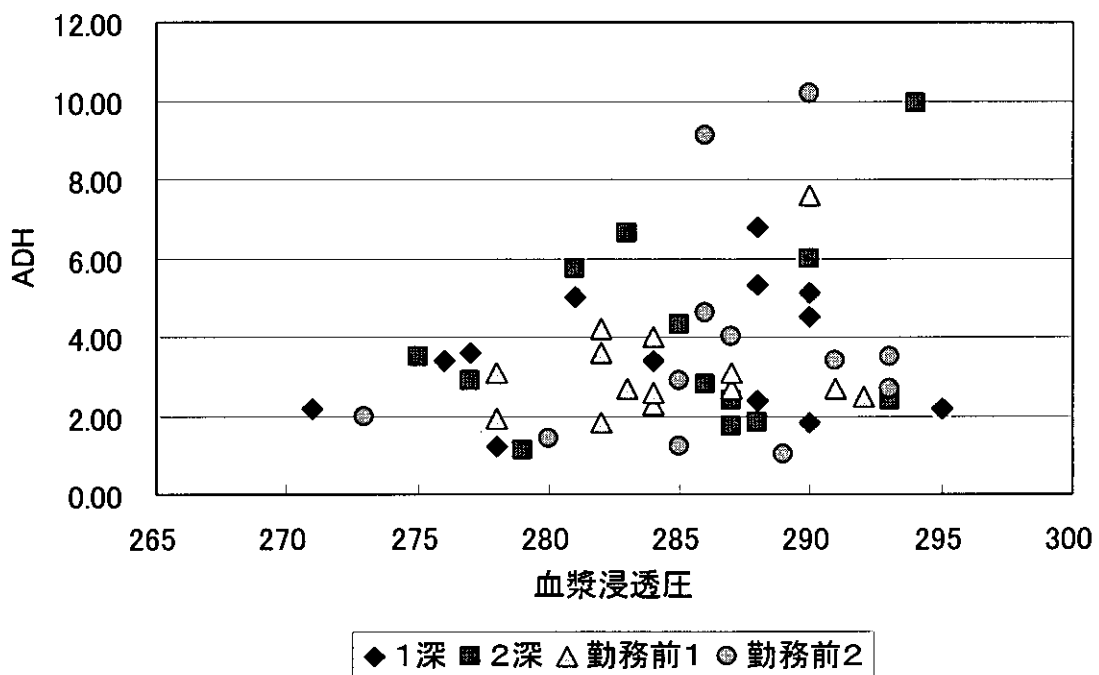


図 2. ADH(縦軸)と血漿浸透圧の関係. 両者の間に相関が見られる.

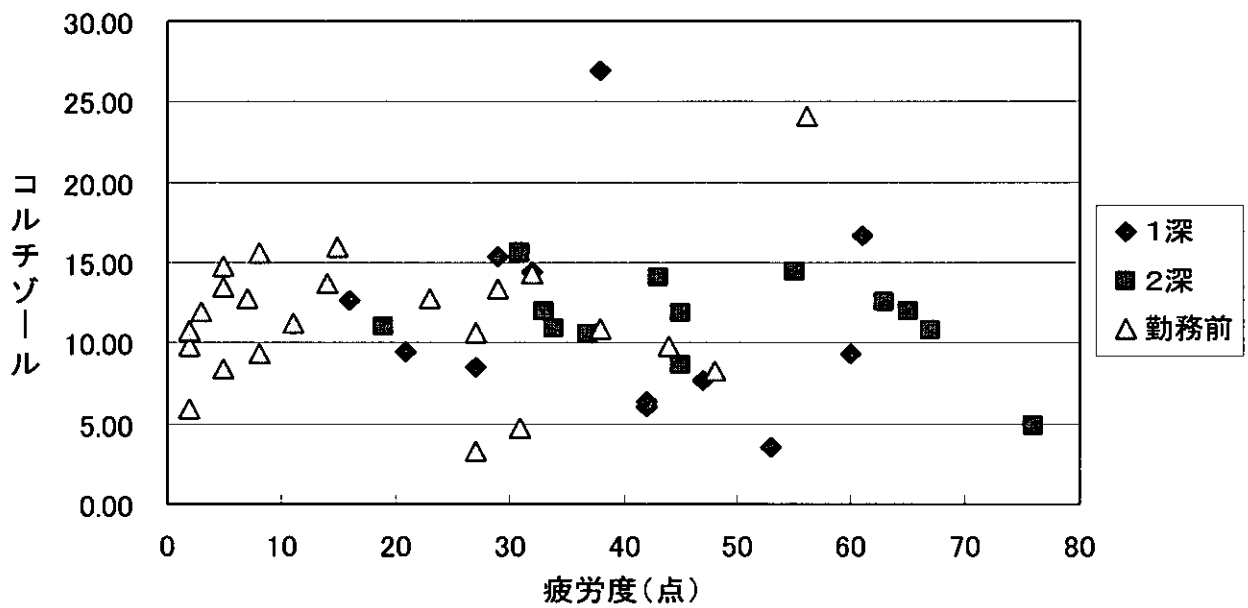


図 3. 疲労度(横軸)とコルチゾール値(縦軸)の関係. 両者の間に相関は見られない.

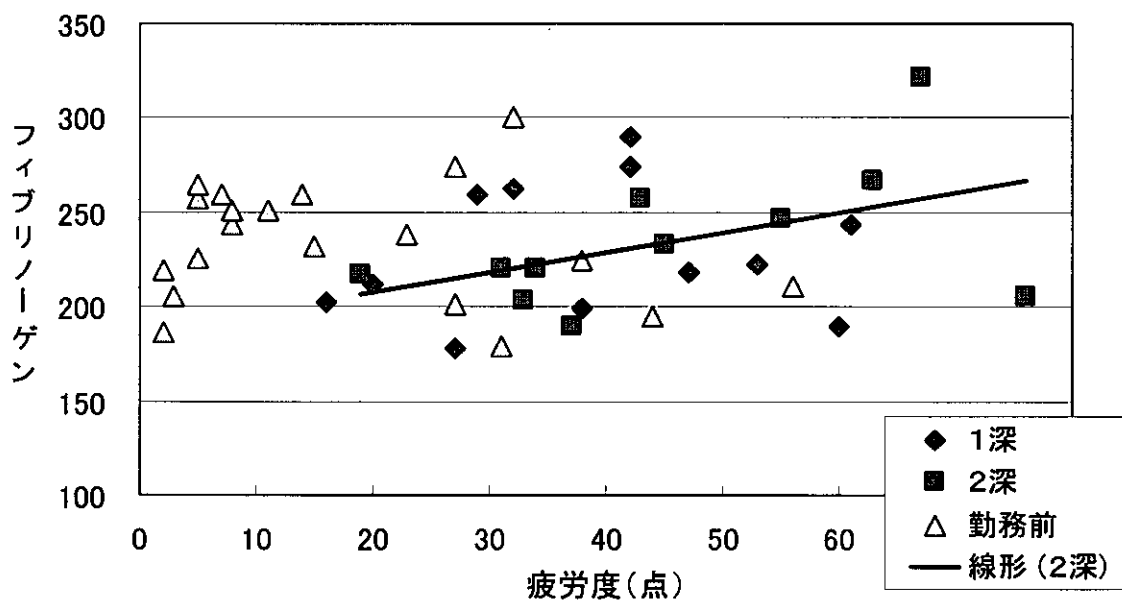


図 4. 疲労度(横軸)とフィブリノーゲン値(縦軸)の関係. 2日連続の夜勤明けでは両者に相関が見られる.

## メニエール病と生物学的ストレスマーカー

宮地勇人(東海大学医学部臨床検査科)

### 【はじめに】

メニエール病をはじめとする内リンパ水腫は、性格、過労、不眠など精神社会的ストレスが発症や増悪の要因と考えられている。その発症メカニズムの解明、発症予防や治療効果の判定には客観的指標として生物学的ストレスマーカーが必要となる。精神的・社会的ストレスが発症に関与する代表的疾患である冠動脈疾患の病態として、血中カテコールアミン上昇による血小板活性化がある。本稿では生物学的ストレスマーカーの検査意義を概説し、メニエール病と血小板活性化の関係について言及する。

### 【生物学的ストレスマーカーの検査意義】

精神社会的ストレスは、大脳皮質で認知、判断されると、大脳辺縁系で強い不安、怒り、悲しみなどの情動や欲求刺激が起きる。その刺激に対して、視床下部を中心として、自律神経系、内分泌系、免疫系など生体防御反応が起こる。ストレスの認知、判断に対する情動や欲求において、不適切な条件付けとパターン化した代償反応が持続する場合、結果として生体防御反応の破綻さらに身体疾患の発症をもたらす。精神社会的ストレスにより発症、悪化、再燃、持続する身体疾患を心身症という。

ストレスは、経過から急性と慢性に分けられる。急性ストレス状態では、視床下部の第3脳室室傍核内の小細胞(CRH 神経細胞)から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン corticotropin releasing hormone: CRH が分泌され、脳下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン adrenocorticotropin hormone: ACTH の分泌を促す。ACTH は副腎皮質からのグルココルチコイド(コルチゾール等)分泌を刺激する。グルココルチコイド分泌過剰では、CRH の分泌を抑制する負のフィードバック機構が働く。一方、慢性ストレス状態では、負のフィードバック機能は低下し、CRH, ACTH 分泌は持続し、結果としてコルチゾールなどグルココルチコイドの過剰分泌は維持される。グルココルチコイド分泌の持続は、免疫機能の低下や代謝系に影響をもたらす。免疫低下のため潜在感染ウイルスの再活性化をもたらす。抗体価が上昇する。ワクチン接種に対するウイルス抗体獲得は低減する。単球/マクロファージやリンパ球機能の抑制は、IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  などサイトカイン分泌を変化させる。CRH は脳幹を介して交感神経系を刺激し、カテコールアミン(エピネフリン、ノルエピネフリン)分泌を促す。これら生体防御反応または続く二次的反応において変動する物質は、生物学的ストレスマーカーとなりうる。ストレスマーカーは、内分泌系、免疫系、代謝系、止血凝固系に大別される(表1)。

急性ストレスの多くは生体防御反応のはたらきで健康障害に至らない。疾患を引き起こすのは慢性ストレスである。ストレスマーカーの条件として、疾患をもたらすストレスを反映することが重要で、ホルモンの多くは、半減期が短くストレスマーカーとしての意義は低い。内分泌系など測定項目によって個体差(年齢、性別など)を考慮する必要がある。測定項目によってストレスとの関連が確定している場合と研究的なものがある。測定の自動化されている項目は、用手法に比べ、測定精度、正確性が高く、多数検体を安定して測定可能である。生細胞を必要とする測定項目は、一般病院では日常的検査として実施されておらず、また外部施設での測定が困難である。Kelly らはストレスと健康障害の関係を調査する上で生物学的なストレスマーカーの理想的条件を示している。それは、1) ストレスと関連、2) 半減期が長い、3) 年齢、性別間に大きな差なし、または集団内分布が明確、である。ストレスと関連する検査項目の条件は、1) 複数の研究グループによる報告、2) 測定項目とストレスに量反応関係、3) オッズ比2以上かつ統計学的有意差、4) 時間的な関係(ストレス物質上昇)、4) 当該物質の変動が疾患と結びつくことを挙げている。この基準から、内分泌系ではコルチゾールが推奨され、免疫系では潜在感染ウイルス抗体価の上昇、代謝系では、糖化ヘモグロビン、waist-hip 比 を推奨している。止血凝固系ではフィブリノーゲン、第 VII 凝固因子、アンチトロンビン III を推奨している。

### 【メニエール病と血小板活性化】

生体内で血小板活性化を惹起する物質(アゴニスト)は8つあり, 其中で, バソプレッシンはメニエール病の原因物質とされ, エピネフリンはストレスに大きく関与する。

バソプレッシンは, メニエール病を主とする内リンパ水腫の原因物質とされ, ストレスで分泌刺激される。第3脳室室傍核内の小細胞は, CRH 産生に加え, バソプレッシンの分泌能を有し, ストレスにおいては分泌細胞の比率が増加する。バソプレッシンは, 水電解質代謝作用に加え, 弱い ACTH 分泌刺激作用もある。ただし, 半減期が短いため, ストレスマーカーとしての測定意義は少ない。バソプレッシンはまた生体内で血小板活性化を惹起する。しかしながら, メニエール病におけるバソプレッシン分泌が血小板活性化にどのような影響をもつか不明である。

メニエール病の発症誘因や増悪の背景に, タイプ A 性格と精神的・社会的ストレスがある。同様な精神的・社会的ストレスの関与は, 冠動脈疾患について多くの研究報告がある。冠動脈疾患のリスクとなる精神社会的ストレスには, タイプ A 性格(競争, 敵対, 仕事熱中), 社会的孤立, 仕事ストレス, うつ状態, 不安状態がある。その病態として, 血中カテコールアミン上昇, 血小板活性化, コルチゾール上昇がある。その結果, 血管収縮, 高血圧, 血栓傾向, 内膜傷害などを来すとされる。

エピネフリン分泌増加は, 血小板の活性化・粘着凝集を惹起する。続いて, 血液凝固系さらに線溶系が亢進し, それぞれの制御因子が増加する。一連の反応に関わる物質の測定は生物学的ストレスマーカーとなりうる(表1)。冠動脈疾患において, 血小板活性化, 凝集亢進, 血小板第4因子や $\beta$ -トロンボグロブリン上昇が見られ, 冠動脈疾患の準備状態としてのリスク評価, 発作後うつ状態の指標として利用されている。

メニエール病など末梢性めまいにおいて, 血小板凝集亢進, 抗血小板薬による発作予防効果の報告があり, 病態に循環障害, 血栓や虚血の関与も示唆されている。また発作の時間帯は, 朝9時から午後4時までと, ストレスを感じやすい時間帯に一致し, 血小板の活性化の強い時間帯(朝一午前)と重なっている。

以上からメニエール病の病態に血小板活性化の関与が示唆される。血小板の活性化測定は, 発症増悪要因としてのストレスマーカーとなるか今後研究が期待される。

### 【参考文献】

- 1) Kelly SJ, Hertzman C. Finding a stress measure in the literature and taking it into the field. *Adv Psychosom Med* 2001;22: 7-16.
- 2) Malarkey WB, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT. Behavior. The endocrine-immune interface and health outcomes. *Adv Psychosom Med* 2001;22: 104-115.
- 3) Steptoe A, Magid K, Edwards S, Brydon L, Hong Y, Erusalimsky J. The influence of psychological stress and socioeconomic status on platelet activation in men. *Atherosclerosis* 2003;168: 57-63.
- 4) Rozanski A, Blumenthal JA, Kaplan J. Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 1999;99: 2192-2217.
- 5) Asakura M, Kato I, Takahashi K, Okada T, Minami S, Takeyama I, Ohnuki T. Increased platelet aggregability in patients with vertigo, sudden deafness and facial palsy. *Acta Oto-Laryngol* 1995; Suppl 520: 399-400.
- 6) Kashiwagi N. Clinical study of platelet aggregation in patients with vertigo and dizziness. *Equilib Res* 1997;56: 284-295.

表 1. 生物学的ストレスマーカー

内分泌系	Growth hormone
	ACTH
	Argipressin
	Cortisol
	Aldosterone
	Epinephrin/norepinephrine
止血凝固系	reproductive hormone
	Platelet activation
	Platelet aggregation
	Platelet Factor 4
	$\beta$ -Thromboglobulin
	Factor VII
	Factor VIII
	von Willebrand factor
	Fibrinogen
	Antithrombin-III
	Tissue plasminogen activator
	Plasminogen activator inhibitor
	免疫系
Interleukins	
Heat shock protein	
Immunoglobulin	
Anti-latent virus	
Immune cells	
Natural killer cell activity	
Lymphocyte stimulation test	
Vaccination response to antigen	
代謝系	
	HbA1c
	Waist-hip ratio
	Benzodiazepin receptor

## 外界知覚が姿勢及び眼球におよぼす影響

関根基樹, 高橋正紘(東海大学耳鼻咽喉科)  
池田卓生, 綿貫浩一(山口大学耳鼻咽喉科)

### 【はじめに】

我々が行ってきたコリオリ刺激実験の結果より, 姿勢や眼球運動, 感覚は, 慣性入力で駆動されるのではなく, 脳で知覚される外界に画一的に従っていることが判明しつつある. この原理を利用して  $\mu G$  空間における外界知覚を調べるために, パラボラフライト飛行でのコリオリ刺激実験を企画した.  $\mu G$  空間の現象はこれまで, 詳細に報告されてきた. しかし,  $1G$  と  $\mu G$  の現象を同じ原理で単純に説明できる理論は報告されていない. 地上と異なり,  $\mu G$  では  $3D$  の座標軸(重力)を欠くため, 慣性入力は脳内の外界に  $1G$  と異なった影響を与える可能性がある.  $1G$  か  $\mu G$  かを問わず, 動作が脳内に再現された外界に従うとすれば,  $\mu G$  でコリオリ刺激を与え, 姿勢変化や眼球運動を分析すれば, 脳内の外界すなわち  $\mu G$  の空間識を知ることができる. この目的のために,  $1G$  と放物線飛行中の  $\mu G$  で同一刺激を与えるための装置を作成し, 両条件の空間識の違いを調べた. 一部を昨年度に報告したが, 本実験結果からの結論を得たので, 再度報告する.

### 【対象と方法】

20 代健康男子 5 名を対象とした. 全員に実験内容および起こりうる不快症状を説明し, インフォームドコンセントが得られた. 回転装置は, あらかじめ航空機に搭載可能なように設計された, 小型軽量の懸垂式回転椅子を使用した(図 1 左). コリオリ刺激による身体移動を記録するために, 前後・左右・上下方向の加速度を同時に記録する,  $3D$  直線加速度計を用いた記録システムを開発した. 頭部の傾斜角度を確認するために, 側頭部と肩に角度センサーを取り付け, 直線加速度と共にコンピューターに記録した. 眼球運動の記録には, 右眼に CCD ビデオカメラの装着された(左眼は遮蔽)ゴーグルを用いた.

被験者の前胸部に加速度センサーを貼付(図 1 右)し, ゴーグルを装着し, シートベルトで腰部を椅子に固定した. 回転椅子を加速した後, 毎秒 100 度の等速で右回転させ, 回転中に検者の合図により頭部を前屈させ, コリオリ刺激を加えた. 地上では毎秒 100 度に加え, 静止, 毎秒 50 度, 毎秒 150 度においても実験した. 航空機実験では, 一部の被験者で左回転の前屈刺激を行った. 航空機実験は, パラボラフライト中, 微小重力に移行する 10 秒前に回転を始め, 微小重力に移行 8 秒後に検者の合図により前屈させた.

身体移動の加速度変化から, 位置の移動を求めた. 眼球運動のテープ記録から画像をパソコンに取り込み, 公開されている NIH image program を用いて  $3D$  解析し, 水平, 垂直, 回旋成分を求めた.

### 【結果】

#### 1) 地上実験

毎秒 100 度, 右回転で頭部を前屈したときの, 左右方向への加速度変化の 1 例を示す(図 2 上). 身体は主に一峰性に左方向に加速されている. 回転速度が毎秒 50, 100, 150 度と増すと共に, 左方向への加速度の最大値平均は比例的に増加した(図 3). コリオリ刺激後約 1 秒間の移動距離を, 加速度変化から算出したところ,  $1G$  空間では身体が主に左方向へ移動していた(図 4 左). 静止状態で前屈しても加速度変化は記録されず, 身体移動は前庭入力によると言える.  $1G$  下において, 眼球も慣性入力に一致した回旋成分の強い眼振を示した(図 5).

#### 2) 航空機実験

毎秒 100 度, 右回転で頭部を前屈すると,  $1G$  とは異なった加速度波形が記録された(図 2 下). コリオリ刺激により身体は初め右方向に加速し, その後左方向に加速し二相性の波形を示した. 加速度変化から算出した位置の移動では, 右方向への小さな揺らぎが再現された(図 4 右上). 一部の被験者で実施した左回転では, 右

回転の波形と鏡像を示した(図4右下).

眼球運動の解析では、1Gに比し持続時間は短いものの、1Gと類似した回旋成分の強い眼振を認めた(図6).

### 【考察】

今回は、次のような仮説に基づき実験計画を立てた。

- 1) 1Gか $\mu$ Gかを問わず、動作は知覚された外界に従う可能性がある。
- 2) 1)が正しければ、 $\mu$ Gでコリオリ刺激中の姿勢や眼球を分析することにより、 $\mu$ Gの外界知覚を知ることができる。
- 3)  $\mu$ Gでは座標軸(重力)を欠くため、慣性入力には外界知覚に影響しない可能性がある。

結果は、明快かつ合理的なものであった。地上すなわち1G下では、身体は明らかに左方向に移動した。右回転中の前屈では、頭部を被験者からみて時計方向に移動させるコリオリの力が働く。しかし、1Gでは三半規管からの慣性入力の影響ははるかに強く、身体はこれに従い、右回転では左方向に移動したと解釈される。これに対して、 $\mu$ Gでは身体はわずかに右方向へ移動した。 $\mu$ Gにおいても1Gと類似した眼振が誘発されるので、 $\mu$ Gで三半規管が刺激されたことは明らかである。 $\mu$ Gにおいては、三半規管からの慣性入力から外界座標に相当するものを回転移動させるが、座標の基準となるZ軸が存在しないため、身体移動が出力されなかったと理解される。この結果、頭部に加わるコリオリの力が優位となり、身体が軽度右方向に移動したのであろう。

一方眼球運動の解析では、持続時間は短いものの $\mu$ Gでも1Gに類似した回旋成分の強い眼振が見られた。固視の制御も身体と同様に外界空間に依存するが、空間内の頭部移動と頭部内の眼球移動から成っている。 $\mu$ Gでは空間内の頭部移動は脳内の外界知覚には影響しないが、慣性入力が頭部内の眼球位置を移動させるため、眼振が起こると推測される。言い換えると、 $\mu$ Gにおいて誘発される眼振は、空間識と無関係な頭部回転に対する代償的反応と言える。

以上より、今回の結果は実験前の作業仮説が正しいことを裏付けた。1G環境では、重力軸をZ軸とする3D座標が脳内に再現され、慣性入力がこの座標に作用することにより、外界空間の座標が刻々と変容する。この座標の内容が皮質レベルで感覚を生み、身体座標に変換されて姿勢変化が画一的に起こる。

一方 $\mu$ G環境では、重力を欠くため空間のZ軸が定まらず、外界座標が制御の基準として機能しない。この結果、慣性入力は外界座標に影響し得ず、感覚や姿勢の変化を生まないと考えられる。 $\mu$ G環境では、脳内の外界座標が曖昧になり、外界の知覚(空間識)とこれに依存する制御が破綻する。この結果、知覚と現実がかい離し、宇宙酔いが起こると考えられる。この状態が持続すると、自己中心的な空間識とこれに基づく身体制御に適応してゆくと予想される。

$\mu$ Gで身体移動が消失し、回転感覚も消失したことは、以前から言われているような前庭脊髄反射では説明が出来ず、脳内の外界座標を想定することにより説明が可能となる。今まで言われてきた空間識というものの実体は、重力軸をZ軸とする外界座標であると考えられる。外界座標の消失が慣性入力に対する移動感覚や姿勢変化の消失をもたらす事実、空間座標が感覚や動作の要として機能することを立証した、といえる。

### 【結論】

1. 航空機搭載可能な回転装置を用いて、1Gと $\mu$ Gにおけるコリオリ刺激反応を正常者と比較した。
2. 右回転中の前屈刺激で、1Gでは慣性入力に対する反応である身体の左方移動が、 $\mu$ Gではコリオリの力によるわずかな右方移動が記録された。
3.  $\mu$ G環境では、重力を欠くため空間のZ軸が定まらず、外界座標は制御の基準として機能しない。この結果、慣性入力は感覚や姿勢制御に影響しない。
4.  $\mu$ Gでは外界座標に依存しない頭部内の前庭反応、すなわち頭部回転に対する代償性眼反応のみが維持された。

### 【参考文献】

- 1) Watanuki K, Takahashi M, Ikeda T. Perception of surrounding space controls posture, gaze, and sensation during Coriolis stimulation. *Aviat Space Environ Med* 2000;71:381-387.
- 2) Hitouji K, Takahashi M, Iida M, et al. Spatial reference and standing posture during high-speed Coriolis stimulation. *Aviat Space Environ Med* 2003;73:865-871.
- 3) Takahashi M. Vestibular function and autonomic nervous system. *Handbook of clinical neurology* (Appenzeller O, ed) Elsevier 1999,pp.351-362.
- 4) Takahashi M, Watanuki K, Ikeda T. Sensation and action during active and passive movement. *Acta Otolaryngol* 1999;119: 121-5.
- 5) 高橋正紘. トレーニングと空間識. *Equilibrium Res* 2003;62: 518-522.
- 6) Reschke MF, Anderson DJ, Homick JL. Vestibulospinal reflexes as a function of microgravity. *Science* 1984;4658: 212-4.
- 7) Wetzig J, Von Baumgarten R. Effects of rectilinear acceleration, caloric and optokinetic stimulation of human subjects in the Spacelab D-1 mission. *Adv Space Res* 1986;6: 161-70.



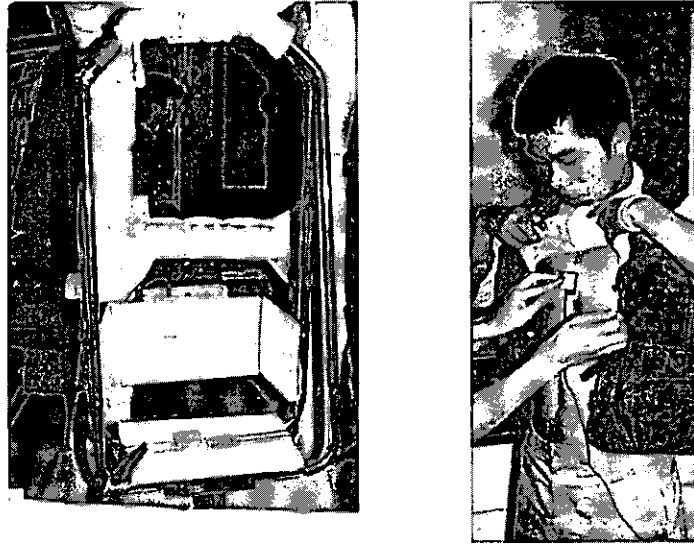


図 1. 実験に使用した懸垂式回転装置(左図)と身体移動記録のための 3D 直線加速度センサー(右図).

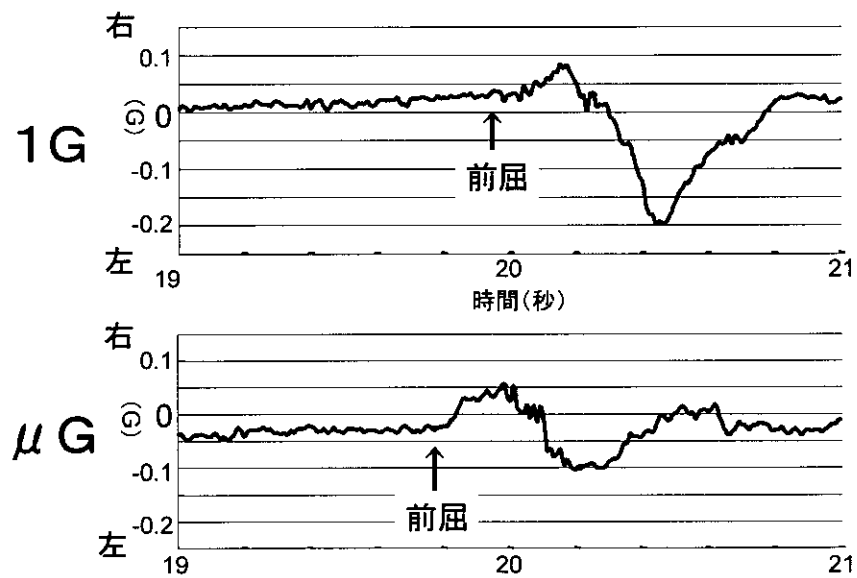


図 2. 毎秒 100 度の右回転, 前屈刺激時の同一被験者の左右直線加速度記録.  
1G(上)と $\mu$ G(下)で波形がまったく異なる.

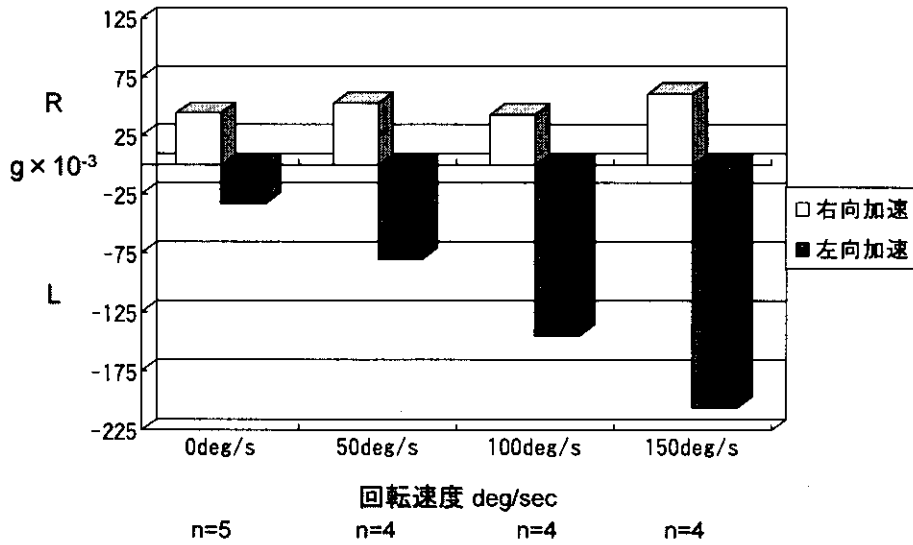


図 3. 1G の右回転コリオリ刺激(前屈)時の, 右方向(上向き)と左方向(下向き)の最大直線加速度の 5 名の平均値. 回転速度に比例して左方への値が増大する.

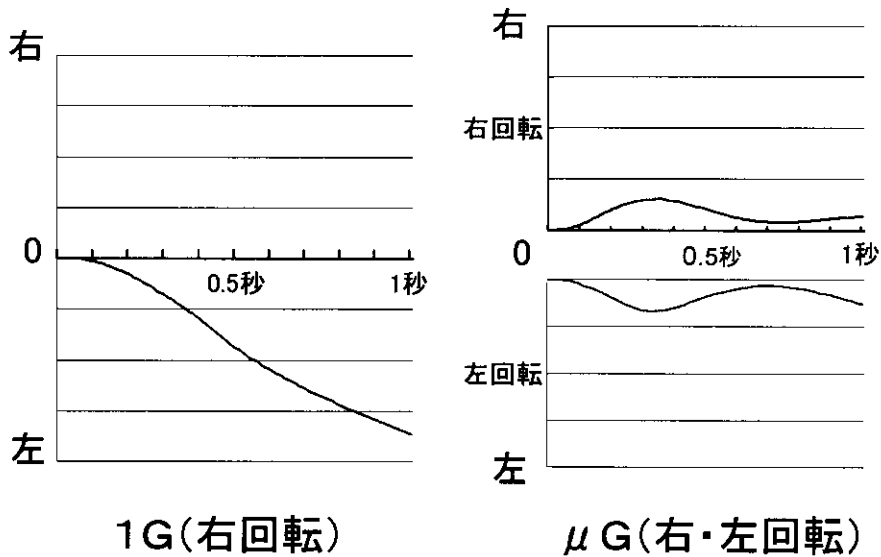


図 4. 毎秒 100 度のコリオリ刺激(前屈)直後の, 1 秒間の左右方向への身体移動. 右回転の 1G では明らかな左方移動, μG ではわずかな右方移動が起こる. μG の左回転で移動方向が逆転する. 1G では慣性入力, μG では慣性力(コリオリの力)の反応が起こる.

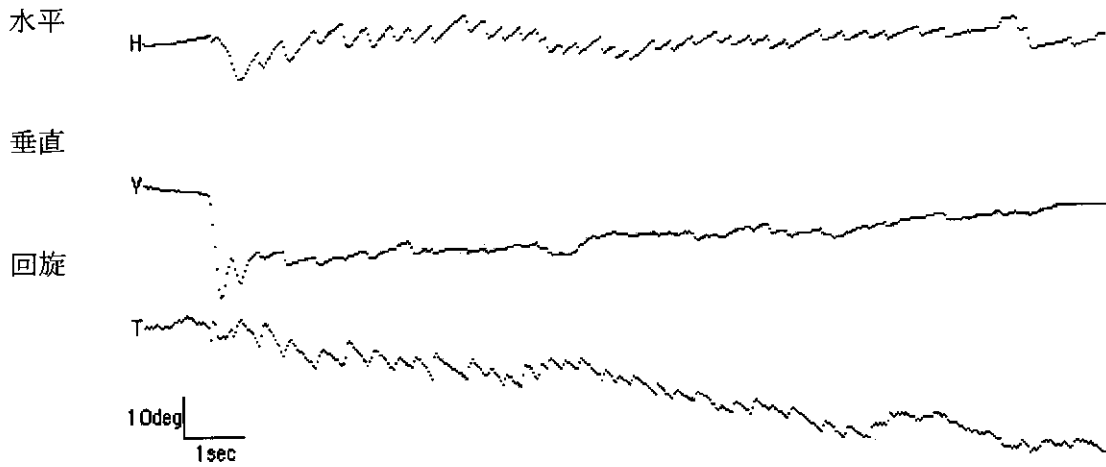


図 5. 1G の眼球運動記録. CCD ビデオ記録から 3D 解析した結果.

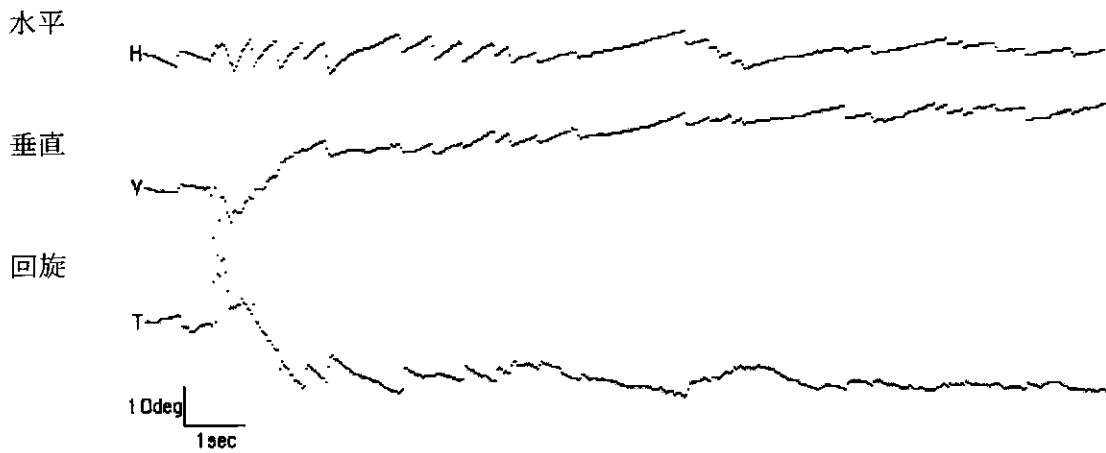


図 6. 図 5 と同一被験者の  $\mu G$  の眼球運動記録. 頭部傾斜直後の最大眼球緩徐相速度は,  $1G$  と  $\mu G$  で変わらないが,  $\mu G$  で減衰が早い傾向がある.

めまいを伴う遺伝性難聴(DFNA9)の病因遺伝子 COCH に関する基礎的・臨床的調査研究

分担研究者 池園 哲郎 日本医科大学講師

研究要旨 本研究の目的はメニエール病の病態解明, メニエール病の重要な鑑別疾患である外リンパ瘻の確定診断法の確立である. COCH 遺伝子はめまいを伴う遺伝性難聴(DFNA9)の病因遺伝子である. DFNA9 の臨床症状, 所見はメニエール病と一致しており, メニエール病研究の観点からも近年非常に注目されている疾患である. 我々は内耳プロテオーム解析を用いて COCH 遺伝子の発現メカニズム, 蛋白レベルでのアイソフォーム解析を報告してきた. さらに2次元電気泳動解析法などを用いて分子生物学的に解析した. その結果, ヒト内耳組織中に p63, p44, p40 を同定, ヒト外リンパ中には新たなアイソフォーム Cochlin-Tomoprotein(CTP)を見いだした. 2次元電気泳動ウェスタンブロットの結果, CTP それ自体にも等電点, 分量のことなるアイソフォームが認められ, 発現の異質性(heterogeneity)があった. また, 今回 CTP 発現が外リンパ特異的であることを明らかにした. さらに実際の外リンパ瘻症例の中耳洗浄液から CTP が検出された. この結果は, 本検査法が外リンパ瘻のあらたな確定診断法となりうることを示している.

A. 研究目的

本研究の目的はメニエール病の病態解明, メニエール病の重要な鑑別疾患である外リンパ瘻の確定診断法の確立である.

COCH 遺伝子はめまいをきたす遺伝性難聴(DFNA9)の病因遺伝子である. DFNA9 の臨床症状, 検査所見は診断基準上メニエール病と診断されることから近年注目されている疾患である. 我々は内耳プロテオーム解析を用いて COCH 遺伝子の発現メカニズム, 蛋白レベルでのアイソフォーム解析を報告してきた. 今回我々は, COCHLIN 関連の新規蛋白, Cochlin-tomoprotein(CTP)を内耳の外リンパ中に見いだした. 2次元電気泳動解析法などを用いて分子生物学的に CTP の生成過程を解明する.

また CTP の発現特異性を利用して, あらたな外リンパ瘻の臨床診断法を確立させる.

B. 研究方法

<抗 Cochlin 抗体の作成>

Cochlin の抗原ポリペプチドを, アジュバントと混合し, ウサギの皮下に 2-3 週間毎に繰り返し免疫した. 血清を分離, Protein A とアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した.

<抗体の特異性の確認>

抗体の特異性は, ウシの内耳組織により確認した. 上記抗体を用いて基礎研究と臨床応用研究(外リンパ瘻診断)を行った.

<1次元ウェスタンブロットリング, 一次, 二次抗体

反応, 検出反応>

上記試料と抗体との反応性をウェスタンブロットリングで検査した. 1次抗体としては, 抗 LCCL 抗体を antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈, 2次抗体としては, ヤギ由来 anti rabbit IgG antibody を 1000 倍に希釈したものをを用いた. その後, 化学発光キット(ECL plus)を用いて化学発光させ, フィルムに感光させた.

<2次元ウェスタンブロットリング>

2次元電気泳動には固定化pH勾配ゲルストリップ (Immobiline pH3-10, Amersham Pharmacia Biotech)を用いた. 1次元目に尿素変性条件下で等電点泳動を MultiphorII (Amersham Pharmacia Biotech)で行い, 2次元目にSDS変性下で平板ゲル(3% stacking and 12% separating polyacrylamide gel)電気泳動を行った. このゲルを PVDF 膜に転写した.

上記の研究手法を用いて以下の2つの研究を行った.

1. CTPの基礎研究

ヒト, ウシの内耳組織ならびに外リンパをサンプルとして, 1次元, 2次元電気泳動による Cochlin アイソフォームの解析を行った.

2. 臨床応用研究(外リンパ瘻診断)

ヒトの中耳に存在し得る外リンパ以外の体液として, CSF, 血清, 唾液を用いた. ヒト外リンパは, アブミ骨手術, 人工内耳症例で採取, 同意を得て用いた. 外リンパ瘻症例のサンプルは, 従来の診断基準に則り, 外リンパ瘻と診断された8症例の術中中耳洗

浄サンプルを検査した。

## C. 研究結果

### 1. CTPの基礎研究

既に報告したウシ内耳 Cochlin アイソフォーム解析結果と全く同様にヒト内耳組織中にも p63s, p44s, p40s が認められた。

ヒト外リンパでは、約 16kDa に明瞭な細目のバンドが検出され、これはその分子量並びに抗 CochlinN末端・C末端抗体両方で全く同じパターンで認識されていることから Cochlin-Tomoprotein (CTP) (Cochlin-N 末端フラグメント蛋白)と考えられた。ウシ外リンパでは 18-20kDa よりやや重い幅の広いバンドが検出された(図4)。種により CTP の発現には微妙な差異が認められている。

ウシ外リンパの2次元電気泳動ウェスタンブロット解析では酸性側に CTP(pH7.7) 分子量 18.8 to 23.1kDa, アルカリ性側に CTP(pH7.9) 分子量 17.7 to 22kDa のCTPが検出された。このパターンは抗 CochlinN末端・C末端抗体両方で全く同じパターンで認識された。

### 2. 臨床応用研究(外リンパ瘻診断)

ヒトCSF, 血清, 唾液には、CTP蛋白は認められなかった。

ヒト外リンパ(人工内耳, アブミ骨手術, 半規管瘻孔の術中に得られたサンプル)を11症例検査したところ、全症例明らかな陽性であった。アブミ骨開窓術直前の中耳洗浄液, 慢性中耳炎, 滲出性中耳炎合計8症例は全例陰性であった。

外リンパ瘻8例中5例に陽性反応が認められた。

## D. 考察

我々は 1998 年より、内耳に発現する遺伝子を蛋白レベルで解析するためウシ内耳を用いたプロテオーム解析を開始した。発現蛋白の種類、量は各臓器に特異的なパターンを呈する事が知られている。我々は内耳蛋白の中でも特に Cochlin に着目しそのアイソフォーム, p63, p44, p40 を同定、遺伝子発現の多様性を明らかにした。さらに研究を進め、外リンパ中に新たなアイソフォーム Cochlin-Tomoprotein (CTP)を見いだした。

ハーバード大学, アラバマ大学からの報告をみると、ほ乳類培養細胞中に COCH gene をトランスフェクションした場合には、そのアイソフォーム発現パターンは我々が解析した in vivo の結果とは一致し

ていない。このことは Cochlin の転写後調節、蛋白レベルでのプロセッシングは内耳細胞特異的であることを示唆している。今後、この内耳細胞に特有な Cochlin 代謝メカニズムを解析していく予定である。また、CTP の機能が判明すれば Cochlin の機能を推察する上でも非常に役立つであろうと考えられる。

また、CTP の発現パターンを解析した結果、CTP は外リンパ特異的に発現していることが明らかになった。このことは、CTP が外リンパ瘻診断に有用である可能性が高い事を意味している。ヒト外リンパにおける CTP 検出率は100%であった。また、実際に臨床サンプルを用いた研究の結果、外リンパ瘻症例に CTP が検出された。

## E. 結論

めまいを伴う遺伝性難聴(非症候性優性遺伝性難聴 DFNA9)の病因遺伝子、COCH 遺伝子の蛋白発現に関して分子生物学的・基礎的研究を行った。その結果、外リンパ中に新規蛋白 CTP を見いだした。この分子は、DFNA9 の突然変異部位全てを含んでおり、DFNA9 発症メカニズムを解明する上で大変重要な蛋白である。

また CTP の発現が外リンパ特異的であることを臨床応用して、メニエール病の重要な鑑別診断の一つである外リンパ瘻の新たな診断法について研究を行った。その結果、この蛋白は外リンパ瘻の生化学的確定診断に有用な蛋白である事を示した。外リンパ瘻の早期確定診断、早期治療は、末梢性難聴・めまい疾患の診断特異性、治療成績の向上をもたらすと考えられた。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ikezono T, Shindo S, Li L, Omori A, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Pawankar R, Yagi T. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:440-6.
- 2) 池園哲郎. メニエール病と遺伝子治療. *Equilibrium Res* 2003;62: 112-116.

- 3) 池園哲郎. 外リンパ瘻. 今日の治療指針 2004年版, 総編集: 山口徹/北原光夫, 医学書院, 東京, 2004, pp.1016-1017.
- 4) 池園哲郎. 頸性めまい. 耳鼻咽喉科 Q&A 37号 六法出版, 東京 2003, pp.408-409.
- 5) 池園哲郎. 自律神経系に基づくめまい. 耳鼻咽喉科 Q&A 37号 六法出版, 東京 2003, pp.410-413.

## 2. 学会発表

- 1) Ikezono T, Shindo S, Lishu Li, Omori A, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Pawankar R, Yagi T. Molecular basis of neuro-otology. A proteomic approach identifies the human COCHLIN Isoforms. The 55th Annual Meeting of the American Academy of Neurology Honolulu, HI, 2003. 3.30-4.5
- 2) 池園哲郎, 大森 彬, 新藤 晋, 李 麗淑, 八木聰明. 遺伝性難聴の研究とプロテオーム解析. 第104回日耳鼻総会 東京, 2003.5.22-24.
- 3) 新藤 晋, 池園哲郎, 李 麗淑, 齋藤明彦, 八木聰明. COCHLIN関連蛋白を用いた外リンパ瘻診断の試み. 第104回日耳鼻総会 東京 2003.5. 22-24.
- 4) 池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 小泉康雄,

馬場俊吉, 齊藤明彦, 小林俊光, 八木聰明. Cochlin-tomoprotein(CTP)を用いた外リンパ瘻診断, 第13回日本耳科学会 東京 2003. 10. 15-18,

- 5) 池園哲郎, 新藤 晋, 李麗 淑, 大森 彬, 小林俊光, 八木聰明. Cochlin-Tomoprotein (CTP)の2次元電気泳動解析 第62回日本めまい平衡医学会横浜 2003.11.27-8.
- 6) 李 麗淑, 池園哲郎, 新藤 晋, 八木聰明, 渡辺 淳. COCH 遺伝子の発現特異性. 第62回日本めまい平衡医学会横浜 2003.11.27-8.
- 7) 池園哲郎. COCH 遺伝子研究とトランスレーション. 第2回信州ミーティング 軽井沢 2004.1.11.

## H. 知的財産権の出願状況

特許出願

国内出願

発明の名称: 外リンパ瘻の検出方法

出願番号 : 特願 2003-182860

出願日 : 平成 15 年 6 月 26 日

出願人 : 日本医科大学, 三菱化学株式会社

外国出願

国際出願番号 : PCT/JP03/08123

出願日 : 2003 年 6 月 26 日

指定国 : 全指定

## Cochlin 発現の分子生物学的解析 ―ヒト内耳組織および外リンパを用いて―

池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 八木聰明(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), 柿木章伸, 澤田正一(高知大学医学部耳鼻咽喉科)

渡辺 淳(日本医科大学第2生化), 小林俊光(東北大学医学部耳鼻咽喉科)

### 【はじめに】

Cochlin の蛋白発現に関して, 我々がウシ内耳蛋白のプロテオーム解析を行い(1), ハンガリー国立研究所がモチーフ解析, NMR 解析により大腸菌由来リコンビナント Cochlin 蛋白の高次構造決定しすでに報告した(2,3). 本年度はハーバード大学(4), アラバマ大学(5)が, ほ乳類細胞由来リコンビナント蛋白を用いた Cochlin アイソフォーム解析の報告を行い興味深い論文を発表した. 彼らは Cochlin-Tomoprotein (CTP) の存在を理論的に予想し, COCH 遺伝子をトランスフェクションした細胞内ならびに培養液を解析したが CTP は検出されなかった. 我々は今年度ヒト内耳組織, ヒト外リンパを解析することによりヒト内耳組織における Cochlin アイソフォーム解析並びに CTP を見いだした(6) (図1). さらにその2次元電気泳動解析を行ったので報告する.

### 【対象と方法】

#### <抗 Cochlin アイソフォーム特異的抗体の作成>

Cochlin に特異的な抗体を4種類作成した. 抗原ポリペプチドの選択には, 抗原性評価ソフトウェア「Epitope Adviser」(富士通九州システムエンジニアリング)を用いた. その解析の結果, 抗 LCCL 抗体作製用の抗原ポリペプチドとして 15 アミノ酸よりなるポリペプチドを選択した. 通常のポリクローナル抗体作成法に準じて, KLH (キーホール・リンペット・ヘモシアニン)を担体蛋白として用いて, マレイミド化により抗原ポリペプチドに結合させた. 縮合剤には Sulfo-SMCC (Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate)を用いた. このように調製した免疫原を含む溶液を, アジュバントと混合し, ウサギの皮下に 2-3 週間毎に繰り返し免疫した. 免疫後, 採血を行って, ELISA 法により抗体価が十分に上昇していることを確認した. 十分な抗体価の上昇が確認された動物から採血を行い, 血清を分離, Protein A とアフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した. 下記に抗原として用いたペプチド配列の詳細を記す(図2).

Peptide #1; "anti-LCCL-N", 18-mer (TRGLDIRKEKADVLCPPGG) corresponding to residues 36-49 in the N-terminal region of the LCCL domain of full-length Cochlin.

Peptide#2; "anti-LCCL-C", 14-mer (LSRWSASFTVTKGK) corresponding to residues 114-127 in the LCCL domain; this region is not present in the p44s isoform.

Peptide #3; "anti-ivd1", 15-mer (AVSTAHPATGKRLKK) corresponding to residues 137-151 in the region between the LCCL domain and the vWF-A1 domain; this region is present in p44s but not in p40s.

Peptide #4; "anti-vWF-A1", 19-mer (KADIAFLIDGSFNIGQRRF) corresponding to residues 163-181 in the vWF-A1 domain; this sequence is present in all three Cochlin isoforms.

#### <抗体の特異性の確認>

抗体の特異性は, ドットプロット並びにウシの内耳組織より調製した内耳蛋白質溶液(陽性コントロール), を抗原としたウェスタンブロッティングにより確認した.

#### <検討対象となる試料>

ヒト, ウシの内耳組織並びに外リンパ

#### <1次元, 2次元ウェスタンブロッティング, 抗体反応, 検出反応>

上記試料と抗体との反応性をウェスタンブロッティングで検査した. 1次元電気泳動では 15%ポリアクリラマイドゲル(レディゲル J;縦 73mm×幅 80mm×厚さ 1mm)に各試料溶液をアプライし, 泳動を行った. 泳動は 60

分, 27mA で行った. このゲルを, 100V で 90 分間, ニトロセルロース膜(0.45  $\mu$ m)に転写した. 転写装置としてはウェット式プロッターを用いた.

2次元電気泳動には固定化pH勾配ゲルストリップ(Immobiline pH3-10, Amersham Pharmacia Biotech)を用いた. 1次元目に尿素変性条件下で等電点泳動を MultiphorII (Amersham Pharmacia Biotech)で行い, 2次元目にSDS変性下で平板ゲル(3% stacking and 12% separating polyacrylamide gel)電気泳動を行った. 電気泳動ゲルをクマシーブルー染色, 銀染色し, 蛋白発現スポットを比較した. このゲルを PVDF 膜に転写した. 転写装置としてはセミドライ式プロッターを用いた.

次に, 化学発光法による検出及び解析を行った. 転写後のニトロセルロース膜を, 非特異的反応をブロックするために blocking buffer 中に 4°C で一晩浸した. これを washing buffer で 5 分間, 3 回洗浄し, 1 次抗体と反応させた. 1 次抗体としては, 抗 LCCL 抗体を antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈して, ニトロセルロース膜に添加した. 反応は, 振動させながら 2 時間行った. 2 次抗体としては, ヤギ由来 anti rabbit IgG antibody (HRP 標識)を, 前記 antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈したものをを用い, 振動させながら 1 時間反応させた. これを前記 wash buffer で 15 分間, 3 回洗浄した. その後, 化学発光キット (ECL plus)を用いて化学発光させ, 発生したシグナルをフィルム (Kodak Scientific Imaging Film)に感光させた. フィルムへの露光時間は1分から1時間とした.

### 【結果と考察】

結果を表1と図3-5にまとめた.

表1

1次元電気泳動による Cochlin アイソフォーム解析

使用した細胞	Cell lysates	Culture media	参考
293T cell	63	69	文献4 図6
HeLa cell	60	60 50	文献5 図6
使用した種	内耳組織	perilymph	
ヒト	63 44 40	63 16	63k 全長 Cochlin は少量
ウシ	63 44 40	63 16	文献6 図3, 4

\*単位は kDa

表2

2次元電気泳動によるCTPの解析

	pH	分子量
・酸性側	CTP(pH7.7)	18.8 to 23.1kDa
・アルカリ性側	CTP(pH7.9)	17.7 to 22kDa

既に報告したウシ内耳 Cochlin アイソフォーム解析結果と全く同様にヒト内耳組織中にも p63s, p44s, p40s が認められた(図3).



ヒト外リンパでは、約 16kDa に明瞭な細目のバンドが検出され、これはその分子量並びに抗 CochlinN末端・C末端抗体両方で全く同じパターンで認識されていることから Cochlin-Tomoprotein (CTP) (Cochlin-N 末端フラグメント蛋白)と考えられた(図3)。ウシ外リンパでは 16kDa よりやや重い幅の広いバンドが検出された(図4)。種により CTP の発現には微妙な差異が認められている。ウシ外リンパの2次元電気泳動ウェスタンブロット解析では酸性側に CTP(pH7.7) 分子量 18.8 to 23.1kDa, アルカリ性側に CTP(pH7.9) 分子量 17.7 to 22kDa のCTPが検出された(図5)。またこのパターンは抗 CochlinN末端・C末端抗体両方で全く同じパターンで認識されている。

外リンパ中には全長 Cochlin p63s が少量検出されたが、p44s, p40s は認められなかった。このことは、外リンパ中で全長 Cochlin p63s から CTP が切断されて生成される、という Cochlin 代謝パターンは否定的であることを示している。

また、ほ乳類培養細胞中に COCH gene をトランスフェクションした場合には、そのアイソフォーム発現パターンは我々が解析した *in vivo* の結果とは一致していない。このことは Cochlin の転写後調節、蛋白レベルでのプロセッシングは内耳細胞特異的であることを示唆している(図6)。

2次元電気泳動ウェスタンブロットの結果、CTP それ自体にも等電点、分量の異なるアイソフォームが認められた(表2, 図5)。この結果は CTP にも Cochlin に認められているような発現の異質性(heterogeneity)があることを示している。

#### 【結論】

我々の結果は Cochlin の転写後調節、蛋白レベルでのプロセッシングは内耳細胞特異的であることを示唆している。おそらく未知の Cochlin 特異的代謝酵素が存在するのであろう。そのような酵素が発見されれば、新たな遺伝性難聴の原因遺伝子候補となり得る。また Cochlin 代謝の複雑性は COCH gene 自体に Mutation が無くとも Cochlin 代謝異常が内耳疾患の原因になり得る事を示唆している。

また、CTP は、おそらく LCCL module そのものであることが推察される。LCCL module そのものが独立した蛋白として存在する例は他には知られておらず、生物学的にも非常に興味深い分子である。今後、CTP の機能が判明すれば Cochlin の機能を推察する上でも非常に役立つであろうと考えられる。また、CTP は非症候性優勢遺伝性難聴 DFNA9 の突然変異部位全てを含んでおり、DFNA9 発症メカニズムを解明する上でも重要な蛋白である。

#### 【参考文献】

- 1) 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 inner ear protein, *Biochim Biophys Acta (Molecular Basis of Disease)* 2001; 1535:258-265.
- 2) Trexler M, Banyai L, Patthy L. The LCCL module, *Eur. J. Biochem.* 2000;267:5751-5757.
- 3) Liepinsh E, Trexler M, Kaikkonen A, Weigelt J, Banyai L, Patthy L, Otting G. NMR structure of the LCCL domain and implications for DFNA9 deafness disorder, *EMBO J* 2001;20:5347-53.
- 4) Robertson N G, Hamaker S A, Patriub V, Aster J C, Morton C C. Subcellular localisation, secretion, and post-translational processing of normal cochlin, and of mutants causing the sensorineural deafness and vestibular disorder, DFNA9. *J Med Genet* 2003;40:479-486.
- 5) Grabski R, Szul T, Sasak T, Timpl R, Mayne R, Hicks B, Sztul E. Mutations in COCH that result in non-syndromic autosomal dominant deafness (DFNA9) affect matrix deposition of cochlin. *Hum Genet* 2003;113:406-16.
- 6) Ikezono T, Shindo S, Li L, Omori A, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Pawankar R, Yagi T. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;6:314:440-6.

图1 Cochlin isoforms in Inner ear and Perilymph

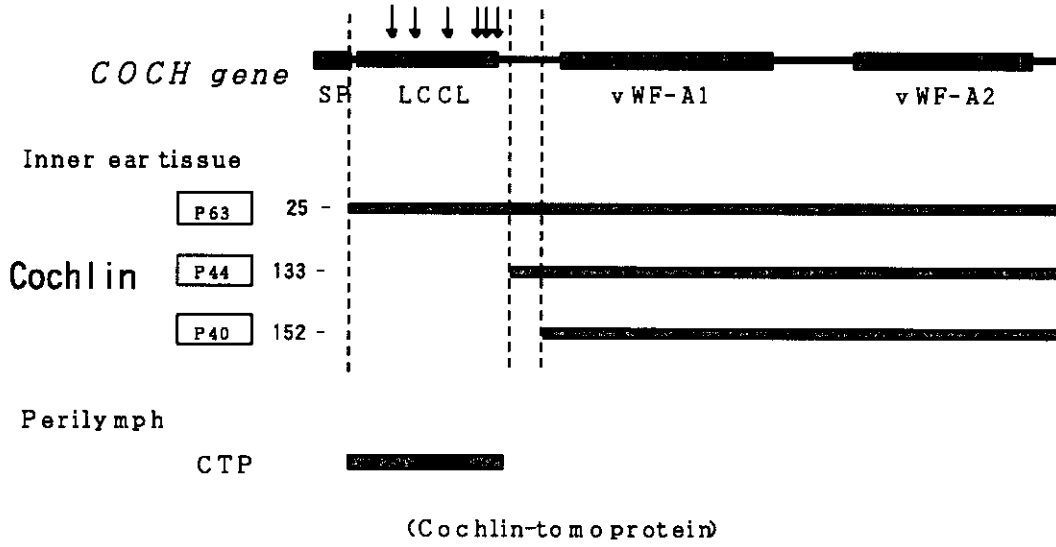


图2 Cochlin Isoform Specific Antibodies Antigenic Peptides

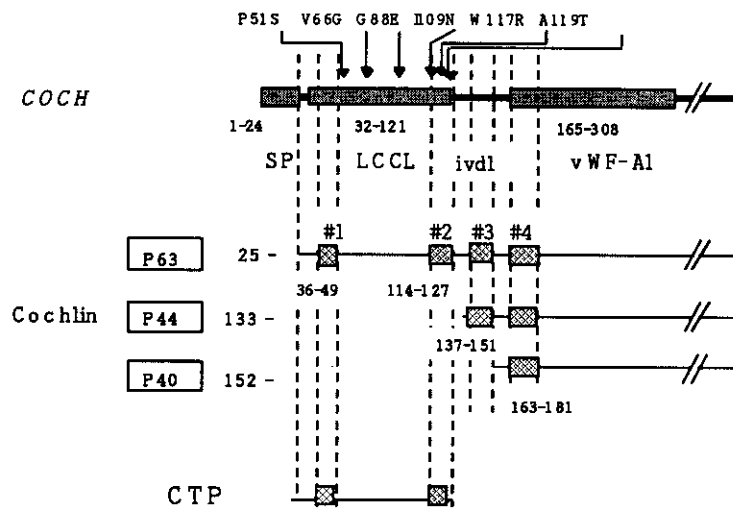
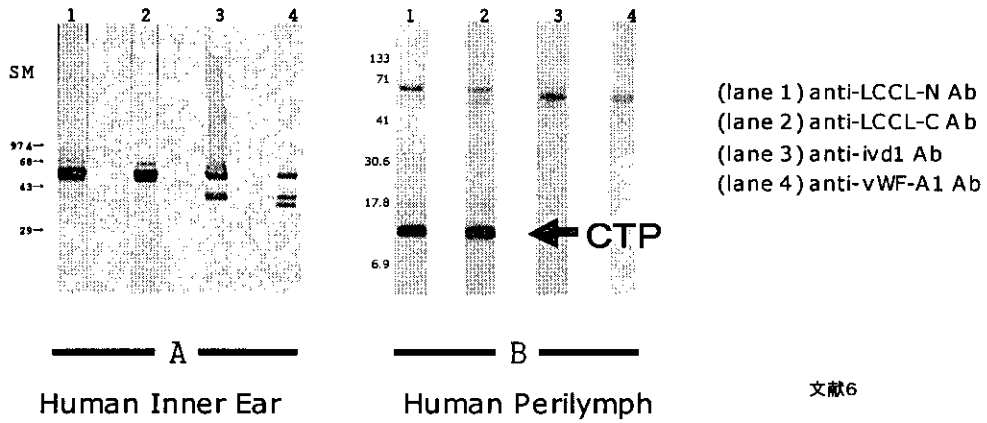


図3 Human Cochlin Isoforms in the Inner Ear tissue & Perilymph



文献6

図4 Bovine Cochlin Isoforms in the Inner Ear tissue & Perilymph

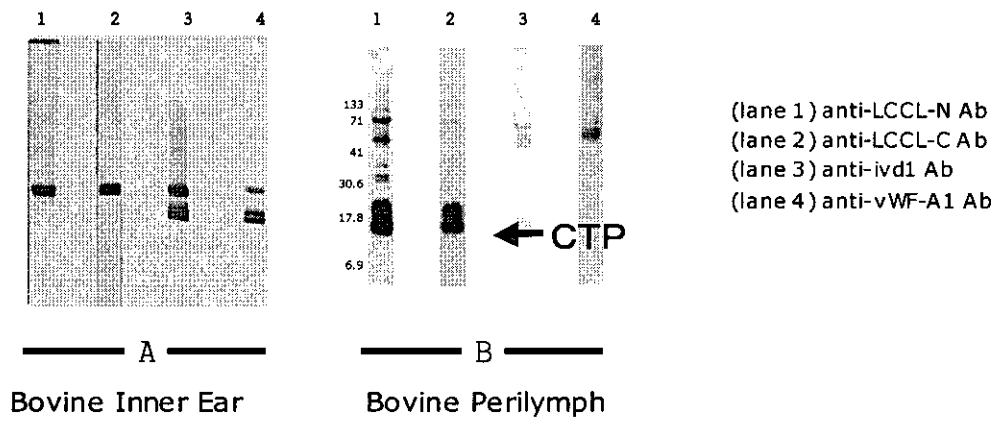


図5 2D western blot of CTP

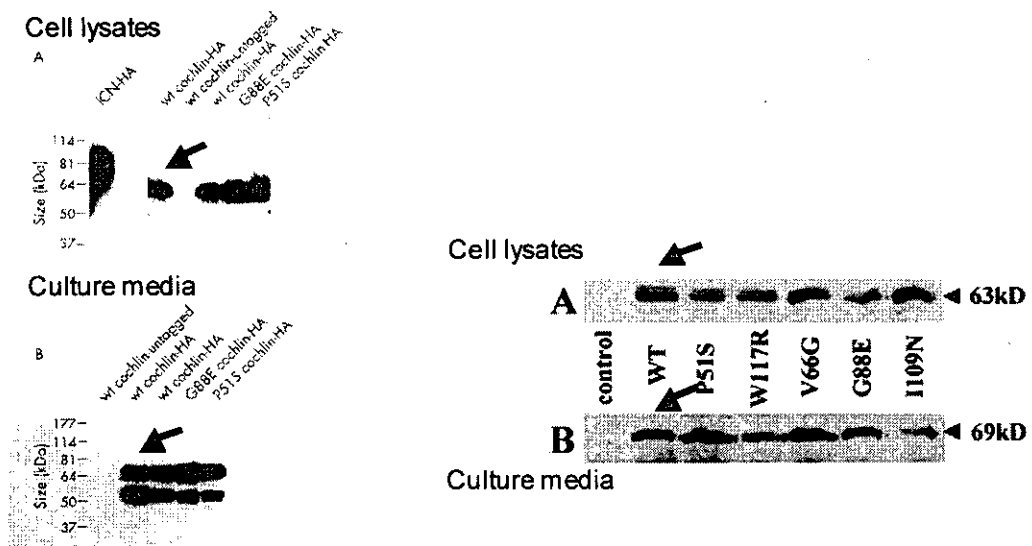
Anti-LCCL-N Ab



Anti-LCCL-C Ab



図6 Cochlin Isoforms in Transfected Cells & Culture Media



文献4 293T(human embryonic kidney Cells)(矢印筆者)

文献5 HeLa Cells (Uterus Ca)(矢印筆者)