

Vasopressin 投与動物モデルの蝸牛形態

分担研究者 岡本牧人 (北里大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 長沼英明 (北里大学耳鼻咽喉科)

河原克雅 (北里大学生理学)

山科正平 (北里大学解剖学)

研究要旨

実験動物の腹腔内への Vasopressin の投与後の聴覚の変化を ABR 閾値を用いて測定し、聴覚が低下することを確認しているが、同様の投与方法での蝸牛の形態学的な変化、特に内リンパ水腫が形成されているかについて検討した。その結果、全回転において明らかな内リンパ水腫は認められなかった。

研究目的

内リンパ水腫の発生に、内リンパ嚢における Vasopressin に対する V-2receptor や水チャンネル AQP-2 が関与している報告¹⁾が散見される。我々のこれまでの報告で、1) 実験動物の腹腔内への Vasopressin の投与後の聴覚の変化を ABR 閾値を用いて測定し、聴覚が低下することを確認した。2) 脱水環境下の実験動物において、腹腔内へ Vasopressin を投与した後の聴覚の変化を経時的に測定した場合、聴覚は投与後早期に低下することを報告した。今回は我々の投与方法で形態学的な変化、特に内リンパ水腫が形成されているかについて検討した。

内リンパ水腫の定量は図2のごとく蝸牛中央階の内リンパ腔の断面積を CAD/CAM software: Ashler-Vellum 3D を用いて行った。まず図2左のごとく実際の内リンパ腔の断面積:Aを求め、次に図2右のごとくライスネル膜が本来存在するであろう部位を想定し直線で仮想的に結び、その内側の面積:Bを求め、AとBの比 $Ir=(A/B)$ を求め、Vasopressin 投与群(6耳)、コントロール群(6耳)で比較した。内リンパ腔の断面積の測定は、蝸牛軸の観察される切片において、各回転で行った。

研究方法

6匹(その内コントロール群は3匹)の200gの Wistar 系ラットを用いた。0.02units/gの AVP(Pitressin; Arg-vasopressin, Sankyo, Japan)を腹腔内に投与し(コントロール群:同量の生理食塩水)、2hr後にエーテルによる深麻酔下に断頭し光頭用組織(連続切片、厚さ10 μ m)を作製し観察した(図1)。

内リンパ水腫定量法



内リンパ腔拡大比: $Ir = A/B$

Vasopressin投与群代表例



コントロール群代表例

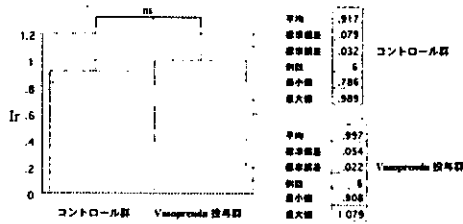


研究結果

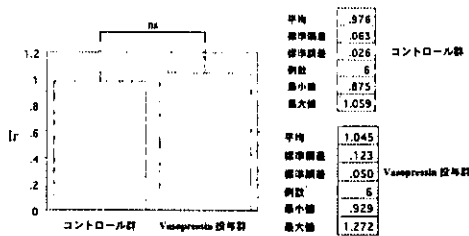
基底回転、第2回転、頂回転、全回転合計の Vasopressin 投与群とコントロール群の Ir を図3~6にそれぞれ示す。その結果、各 Ir は2

群間に有意な差はなかった。

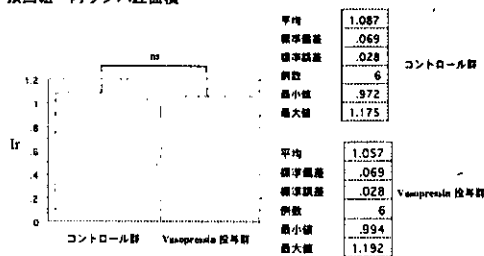
基底回転 内リンパ腔面積



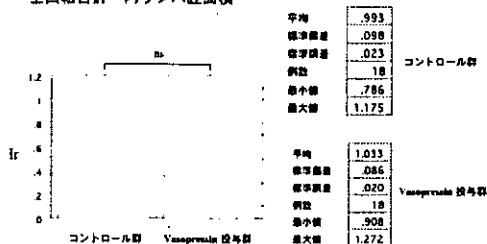
第2回転 内リンパ腔面積



頂回転 内リンパ腔面積



全回転合計 内リンパ腔面積



考察

Vasopressin 投与群の内リンパ腔断面面積（容積）は、コントロール群のそれに比して有意な増大はなかった。すなわち Vasopressin 投与で明らかな内リンパ水腫が形成されていないにもかかわらず、ABR 閾値は上昇（聴覚の低下）したことになる。Vasopressin 投与群の内リンパ腔の内圧は軽度上昇している可能性は否定できないがライスネル膜が十分に伸展するほどの内圧の上昇は認められないと考えられる。今後 Vasopressin の血管条に対する直接的な影響について検討する。

結論

長期間の Vasopressin の投与（慢性実験）¹⁾により、内リンパ水腫は形成されることは報告されているが、今回の投与方法（急性実験）では明らかな内リンパ水腫は形成されていなかった。

参考文献

1) Takeda, T., Takeda, S., Kitano, H., et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear. Res.* 140: 1-6, 2000

研究発表

- 論文発表
なし
- 学会発表
なし

知的財産権の出願・登録状況

- 特許取得
なし
- 実用新案登録
なし
- その他
なし

ミュータジェネシスによる聴覚変異体マウスの探索と解析

研究協力者 美野輪 治 (理化学研究所ゲノム科学総合研究センター動物ゲノム機能情報研究グループ)

研究要旨

症候群性、非症候群性いずれの場合のヒト難聴疾患の原因と治療法を研究する上でも、動物モデルは有用であり、特に遺伝的操作法を適用するのに有利なマウス聴覚変異体の樹立とその詳細な解析は、極めて重要と考えられる。本研究において、我々はマウスENUミュータジェネシスプロジェクトの一環として、多岐にわたる優性表現型検索法の中で、効率的に聴覚異常マウスの検索・解析を実施することが可能な方法を確立し、現在までのところ、26の優性聴覚異常系統を樹立した。これらの系統に関して、マッピング、候補遺伝子の配列決定法等により原因遺伝子の探索を行った。

研究目的

ENU誘発マウス突然変異体の開発を体系的に行い、効率的に聴覚変異体マウスを単離・解析する事によりヒト難聴モデルたりうる新規マウス系統を樹立する。

研究方法

G0 マウスの作製のために、8週齢のC57BL/6J雄マウスに100mg/kgの変異原ENUを週1回計3回投与し4週間単飼後、ICR雌マウスに対する不妊テストを4週間行った。これらG0 マウスの初回ENU投与13週後からG1マウス生産のためのDBA/2J雌マウスとの交配を実施した。本研究全般は、コンピューターネットワークにより管理され、統合データベースソフトをデータ記録管理のために用いた。Modified-SHIRPA法スクリーニングにおける驚愕反応検査(クリックボックス)により見出されたG1聴覚異常マウスの解析(primary characterization)のために、聴性脳幹反応(ABR)測定装置を用いて、これらの変異体候補の聴覚異常の特性を解析した。原因遺伝子の探索は、以下の方法により行った。

1. TaqMan PCR法によるSNP解析/rough mapping
2. Mit markerによるSSLP解析/semi-fine mapping
3. 候補遺伝子の選択・配列決定/candidate gene approach
4. 多数の交配産子生産によるfine mapping

倫理面への配慮

ヒト及びヒト由来材料は扱わない。実験用マウスに関しては、手術、淘汰、その他取り扱いについて、苦痛除去に留意し、実験開始の

前に、その方法、計画について理化学研究所実験動物委員会の承認を受けた。

研究結果

(1) 聴覚変異体の単離
早期表現型のスクリーニング法であるModified-SHIRPA法における驚愕反応検査(クリックボックス)によりG1を11135匹スクリーニングした。驚愕反応に異常が認められた34匹のG1について、聴性脳幹反応(ABR)測定装置を用いて、各変異体候補の聴覚異常の特性を解析した。34匹中ABR測定により、聴覚異常と判定されたのは、26候補であった。これら各候補の表現型は全て遺伝性を示した。これらの系統の内、旋回など行動異常を伴うものは、2系統のみであった。

(2) 原因遺伝子の探索; rough mapping
得られた26系統のうち12系統について、SNP解析によるrough mappingを実施した。この内、3系統で、候補遺伝子がchromosome 6に高い存在可能性を示した。他系統は、chromosome 6に存在可能性を示さなかった。

(3) 原因遺伝子の探索; 候補遺伝子配列決定・Atp2b2遺伝子上の変異の集束

上記3系統について、Mit markerによるSSLP解析を行い、候補遺伝子の選別、配列決定を行ったところ、いずれも、Atp2b2/Pmca2遺伝子上に変異を確認し、この変異が難聴表現型の原因であると結論した。しかしながら、これらのM1 founderの表現型は、閾値の値で見ると同一ではなく、内耳の組織学的障害の程度も、それぞれ異なっていた(表1)。

M Name	strain	M1 表現型	sex	sampling時 週齢	測定結果		histology						causative mutation
					tone1 2kHz 閾値 (dB)	判定	organ of Corti	tectoria membrane	stria vascularis	spiral ligament	spiral Limbus	spiral ganglion	
C2DB001972043	M2B6		♀	0.0	12.8	-	-	-	-	-	-	-	
M100095	G1DB		♂	64.0	91以上	M	++	-	-	-	-	++	Ch.6;Atp2b 2/Ex12
M200095012	M2D2		♂	32.4	101	M	+	+	+	-	-	++	
M200095013	M2D2		♂	32.4	101	M	+	-	+	-	-	++	
M200095015	M2B6	ろう (91dB <)	♀	30.0	101以上	M	+	-	-	-	-	+	
M200095020	M2B6		♀	22.1	17.8	+	-	-	-	-	-	-	
M200095027	M2B6		♂	22.1	72.8	M	+	-	-	-	-	++	
M200095030	M2B6		♀	15.7	92.8以上	M	+	-	-	-	-	-	
M200095034	M2B6		♂	15.7	12.8	+	-	-	-	-	-	-	
M200290001	M2B6		高度 (77.8 dB)	♀	23.1	67.8	M	-	-	-	-	-	-
M200290002	M2B6			♀	23.1	77.8	M	+	-	-	-	-	+
M200290003	M2B6			♀	23.1	67.8	M	-	-	-	-	-	-
M200639026	M2B6	中程度 (62.8 dB)	♀	23.7	12.8	+	-	-	-	-	-	-	
M200639028	M2B6		♀	23.7	87.8	M	in progress						
M200639031	M2B6		♂	23.7	62.8	M	±	-	-	-	-	+	

表1

考察

ヒト遺伝性非症候群性難聴において、現在まで、優性、劣性、X染色体連鎖遺伝様式を合わせて、原因遺伝子の同定されたものは40近いが、これらの遺伝子の産物から推定される内耳における障害は、それぞれ、コルチ器、血管条、ラセン靭帯、ラセン神経節、等の形態、機能異常に及び、これらの非症候群性難聴の一次的な原因が、著しく多様であることを示唆している。従来の難聴の表現型を示す変異体マウス(自然発生、ノックアウトマウス等)は、既にかかなりの数が知られているが、本研究により樹立された聴覚変異体は、表現型解析の結果から、明瞭に非症候群性である点で、ヒトの遺伝性非症候群性遺伝性難聴の良いモデルである可能性が高い。今回明らかになったAtp2b2変異は、ヒトにおいては未だ見出されていないが、各alleleごとの表現型の差異と変異の産物に与える効果を比較する事で、有毛細胞の信号変換機構解明の手がかりになることが期待される。

結論

1. ENU mutagenesis による優勢変異体スクリーニングにおいて、click box の驚愕反応試験による一次スクリーニングとABRの測定による解析の組み合わせにより、優性のマウス聴覚異常系統をこれまでに26系統の樹立できた。

2. これらのうち、Chr6に原因遺伝子の存在が推定されるものが3系統存在し、何れも、Atp2b2遺伝子上に変異が同定されたが、各系統は表現型が同一ではなかった。

研究発表

<論文発表>

なし

<学会発表>

High-throughput mutation discovery by multiplex TGCE (Temperature Gradient Capillary Electrophoresis) in mouse ENU-mutagenesisAA
17th International Mouse Genome Conference
(Nov.9-12, 2003Aj)

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

siRNA を用いた内耳遺伝子治療に関する基礎的研究

分担研究者 福島邦博 (岡山大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科)
共同研究協力者 前田幸英 (岡山大学 耳鼻咽喉科頭頸部外科)

研究要旨

聴覚障害の最も頻度の高い原因である感音難聴については、未だ根本的な治療法が確立されておらず、その対策を立てることは急務である。難聴の原因のうちで、進行性感音難聴を示すものには、優性遺伝性を示すものがあり、この中には病的遺伝子の dominant negative 効果によって、難聴が進行性に生じるものがあることが推定されている。こうした疾患関連遺伝子の、遺伝子特異的発現抑制を行うことによって難聴の進行を阻止するという治療法確立に向けて、基礎的な実験を行ったので報告する。

研究目的

聴覚障害は、人口の5%を占めると言われる非常に頻度の高い障害であり、その多くは内耳性難聴である。内耳機能が損なわれる原因には様々なものがあるが、常染色体優性遺伝の場合には、病的遺伝子の産物が、正常な遺伝子産物の働きを阻害することによって機能低下を生じさせる、いわゆる dominant negative 効果によって難聴が生じる場合があることが推定されている。我々は、昨年度までの研究過程において、いわゆる先天性難聴の原因疾患として最も頻度の高い GJB2 の遺伝子発現を siRNA によって制御する方法について報告してきた。昨年までの研究では、ヒト培養細胞を用いて GJB2 遺伝子に対して特異的に発現抑制をする siRNA を作成し、in vivo での実験に成功した。本年度は、特にヒトで発見されている遺伝子異常のうち、dominant negative 変異であると考えられている R75W 遺伝子変異の発現を特異的に阻害する siRNA を新たに作成した。さらにこれを将来 in vivo での実験系で行うために、マウスの培養細胞に置き換えて同様の実験を試みた。また、RNA の発現レベルだけではなく、タンパクのレベルで発現抑制が行われているかどうかを検討した。

研究方法

細胞の選択

各種のマウス由来培養細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行い、GJB2 の発現が認められている培養細胞を選んだ。陽性コントロールとしては、昨年までの研究で確認されているヒト 293 細胞を用いた。その結果、マウス P26 細胞で、GJB2 の発現が認められた。

siRNA の使用

マウス p26 細胞に対して、マウス gjb2 の遺伝子配列を元に新たに作成したマウス用 siRNA 4 種を用いて作用させた。また、GAPDH 用およびランダムな配列を用いた negative control siRNA を陰性コントロールとして用いた。(Ambion, Inc) 一部の siRNAs は、Cy3-labeling kit (Ambion) を用いて、蛍光ラベルした。50~70% のコンフルエンスに調整されたマウス P19 細胞に siRNA を 200 μ M の濃度で投与した。実際の取り込みには Silencer transfection reagent (Ambion) を用いた。mRNAs の定量には、RT-PCR を用いた。

R75W の co-transfection

GJB2 の常染色体優性遺伝の原因となる遺伝子異常として知られる R75W と eGFP を含んだベクターの Co-transfection には、lipofectamine2000 (Clontech) を用いた。

結果

4 種類の siRNA のうち、2 種の siRNA で陰性コントロールでは生じなかった有意な遺伝子発現の低下が認められた。また、gjb2 以外のギャップ結合タンパクとして、この p26 細胞で発現されている gjb6 と gjal の発現量を定量化したが、これらの遺伝子発現には、有意な発現量の低下は認められなかった。

この GJB2siRNA2 ではトランスフェクトした GJB2-eGFP の R75W 遺伝子発現を、コントロールと比較して 85% 以上の割合で抑制した。内因性の (野生型の) GJB2 遺伝子につ

いても 40%までの遺伝子発現の抑制がみられた。

考察

常染色体優性遺伝性難聴の場合、しばしば、変異の加わった遺伝子の産物が、正常な他の遺伝子産物の機能を抑制し、症状を発症するといういわゆる dominant negative 効果による発症機序を示すものがあることが知られている。GJB2 によってコードされているタンパクのコネクシン 26 は、他のコネクシンと 6 量体を形成してヘミチャネル（コネクソン）を作り、隣接する細胞との間でさらに結合してギャップ結合を形成している。このギャップ結合は、内リンパの高カリウム状態を維持するために必須であるカリウムイオンのリサイクルに関係していると考えられている。R75W 変異は、ヒトの常染色体優性遺伝性感音難聴家系から検出された突然変異で、臨床的には言語習得期前からの高度難聴を示す。すでに報告されている同じ遺伝子異常のトランスジェニックマウスの場合、その側頭骨病理は、生直後は正常なコルチ器の形態を示すものの、その後次第にコルチ器の支持細胞を中心に変性がすすむとされている。このため、こうした遺伝子の異常をコントロールするこ

とが出来れば、進行性感音難聴に対する効果的な遺伝子治療のスキームとすることが出来るはずである。今回の報告は、その方法論を目指す基礎となるデータを確立したものである。

結論

マウス培養細胞を用いた系を用いて、ヒトで遺伝性難聴の原因となっている R75W 遺伝子異常を有する遺伝子を、異常遺伝子特異的に発現抑制を行うことができた。siRNA によって、病的遺伝子特異的に発現を抑制することが可能であった。

健康危険情報

該当無し

研究発表

1. 論文発表
未
2. 学会発表
未

知的財産権の出願・登録状況

該当無し

マウス内耳と腎におけるペンドリンの発現

分担研究者 中島 務 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 吉野貴彦 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

佐藤栄祐 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

寺西正明 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

曾根三千彦 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

杉浦 真 (名古屋大学耳鼻咽喉科)

研究要旨

ペンドレッド症候群は幼少時より遺伝性感音難聴を呈する疾患であり、MRIにて前庭水管拡大症を呈することが知られている。近年、変異遺伝子 (SLC26A4) が同定され、またその遺伝子がコードする蛋白質 (ペンドリン) も知られてきた。今回、当科にてこのペンドリンに対する抗体を作成し、マウスの内耳におけるその発現部位を見た結果、内リンパ液のイオンバランスや吸収、産生に何らかの形で関与している可能性が示唆された。また、ペンドリンは腎臓、甲状腺等においてもその局在が報告されており、腎との比較検討を行ったところ、内リンパ嚢にて、Cl⁻イオンと HCO₃⁻イオンの交換器として働いている可能性が示唆された。

研究目的

当科にて、現在前庭水管拡大症を呈する感音難聴の患者に対して遺伝子異常の検索を行っており、その中でペンドレッド症候群遺伝子 (SLC26A4) の変異を呈している症例を多数みとめている。近年、この遺伝子のコードする蛋白質 (ペンドリン) に対する研究が多くなされ、甲状腺や腎臓などでの局在や働きについて報告がなされている。しかし、内耳については不明な点が多く、今回、当科にてペンドリンに対する抗体を作成し、マウスの内耳におけるその局在を見た。また、腎臓ではペンドリンは Cl⁻イオンと HCO₃⁻イオンの交換器として働いているという報告がいくつかなされており、マウスにアシドーシスやアルカローシスの負荷を行い、その発現が変化するかどうかを検討した。

研究方法

抗体作成 ペンドリン蛋白質を、ウサギを免疫動物としてこれに接種し、その IgG を回収することでポリクローナル抗体を作成した。免疫吸収試験にて、特異性を確認した。

ヒト甲状腺及びマウスの組織 当院第二外科講座よりヒト正常、および甲状腺機能異常症、甲状腺腫瘍の組織を提供していただいた。これらは、ヘルシンキ宣言に沿い、事前にインフォームドコンセントを行い了承を得た組

織である。また、動物組織については、当大学の動物取り扱い規定および法律に基づいて、得たものを使用した。

ウエスタンブロット ヒト甲状腺及びマウスの各組織について、ウエスタンブロット法によるペンドリンの発現を確認した。

免疫染色 マウスの内耳切片に対し、作成したペンドリン抗体を一次抗体とし、DAB染色により局在を見た。

アシドーシス、アルカローシス負荷 7 W 齢のマウス (C57BL/6J) に対し、コントロール (2%スクロース)、アシドーシス負荷 (2%スクロース、0.28 mol/l NH₄Cl)、アルカローシス負荷 (2%スクロース、0.28 mol/l NaHCO₃) 群、に分けて、一週間、飲料水として与えた。その後、ウエスタンブロットにて、ペンドリンの定量を行った。

研究結果

ウエスタンブロット ヒト甲状腺、及び、マウスの内耳、甲状腺、腎臓、脳において、ペンドリンの発現をみとめた。

免疫染色 マウス内耳において、内リンパ嚢、管、蝸牛の外ラセン溝、Hensen 細胞、Claudius 細胞、及び、ラセン神経節に発現を認めた。また、卵形嚢、球形嚢においても一部に発現を認めた (図 1, 2, 3)。

アシドーシス負荷 ウエスタンブロットに

よるバンドの定量にて、アシドーシス群とコントロール群において、負荷群に減少傾向を認めた (図4)。

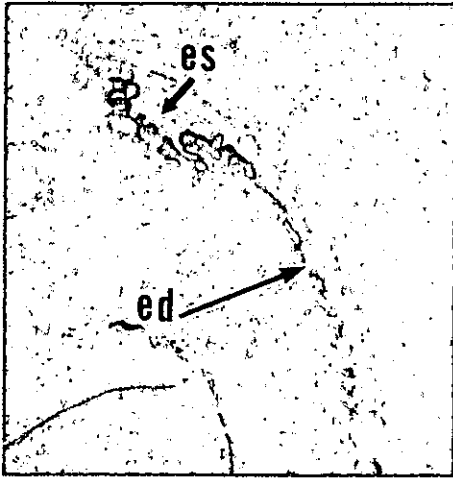


図1 内リンパ嚢、管にて、apical side (矢印部) に発現を認める。 es : 内リンパ嚢、 ed : 内リンパ管

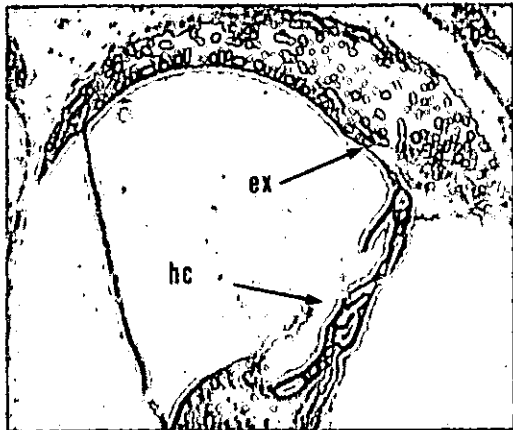


図2 蝸牛において、外ラセン溝、Hensen細胞、Claudius細胞 (矢印部) に発現を認める。 Ex : 外ラセン溝、hc : Hensen細胞、Claudius細胞



図3 ラセン神経節に発現を認める。 Sg : ラセン神経節

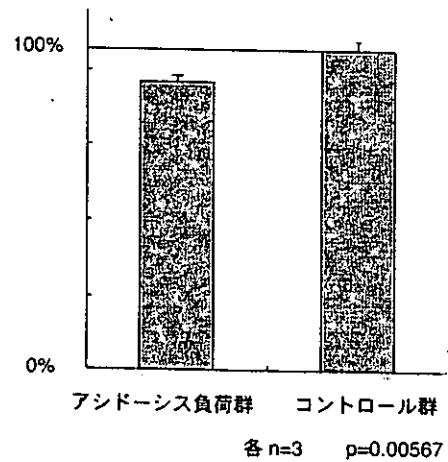


図4 アシドーシス負荷による、ペンドリンの発現量の変化。コントロールを100%ととして表示。 n=3, p=0.0567

考察

内耳におけるペンドリンの発現部位は、今まで in situ において外ラセン溝や、卵形嚢、球形嚢、内リンパ嚢、管で報告があり、今回の抗体を使用した結果でも同様の部位に発現を認めた。とくに内リンパ嚢、管では apical membrane に発現を認め、この部位はもともと内リンパ液の吸収に関与していると考えられており、ペンドリンが最近の研究で Cl⁻ や HCO₃⁻ イオンの交換器と考えられていることから、同部位において、内リンパ液のイオンバランスの恒常性の維持に関与していることが示唆された。また、外ラセン溝や卵形嚢、球形嚢、また、今回新たに発現を認めた、Hensen細胞や、Claudius細胞などは、内リ

ンパ液の産生に関与していると考えられており同部位でも、内リンパ液のイオンバランスの恒常性維持に関与している可能性が示唆された。ラセン神経節においては、どのような働きをしているかは不明であり、今後更なる検討が必要である。また、マウスにおいて飲料水に、アシドーシスやアルカローシスの負荷を行い、内耳を取り出して、ウエスタンプロットによるペンドリンの定量を行い比較検討したところ、アシドーシス負荷群がコントロール群よりも減少傾向を示したことは、アシドーシス負荷により、細胞内に HCO_3^- を取り込もうとするペンドリンの作用が抑制またはダウンレギュレートされペンドリンが減少した可能性を示唆しており、腎においてはすでに報告もされている。まだ症例数が少なく傾向しかいえないが、内耳でのペンドリンの働きを検討するうえで、今後さらに追加実験等を加える必要があると考えられた。

結論

今回、ペンドレッド症候群の変異遺伝子がコードするペンドリン蛋白を精製し、その抗体を作成した。内耳にてその発現を、外ラセン溝、Hensen 細胞、Claudius 細胞、内リンパ嚢、管、卵形嚢、球形嚢、ラセン神経節に認めた。これらは、多くは内リンパ液の分泌、吸収に関与する部位であり、そこで、イオン交換器としてイオンバランスの維持に関与している可能性を示唆した。また、負荷実験により、アシドーシス下で、ペンドリンの発現が減少したことより、内耳においても、腎と同様に $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ イオンの交換を行っている可能性が示唆された。

研究発表

2003年10月7日、耳科学会にて発表。
“マウス内耳におけるペンドリンの発現”

聴覚路のシナプス前部にも AMPA 受容体は存在する (聴覚路におけるグルタミン酸興奮毒性についての検討)

分担研究者 喜多村健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)
共同研究者 鷹合秀輝 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)
中村行宏、高橋智幸 (東京大学大学院神経生理)

研究要旨

突発性難聴の原因として虚血などにより誘発される過剰な神経伝達物質 (グルタミン酸) による興奮毒性が提唱されている。また、突発性難聴の病変部位として内耳のみでなく、後迷路にも病変を伴う例があることが報告されている (1)。

カイニン酸とその類似物質であるドウモイ酸 (Domoate) により、グルタミン酸受容体 (AMPA 型, NMDA 型, Kainate 型) のうち、AMPA 型と Kainate 型が活性化される。これらを内耳に投与すると、内毛細胞は intact であるが、蝸牛神経の樹状突起が膨大し変性する (2)。また、カイニン酸を脳幹の上オリブ複合体近傍に注入すると、同様に neuron の変性が起こり、ABR の III 波以降が減弱する (3)。

以上の evidence に基づき、聴覚路における興奮毒性モデルとしてドウモイ酸を用い、シナプス伝達への影響について検討した。その結果、ドウモイ酸により Evoked-EPSC が減少し、シナプス前部からのグルタミン酸の放出が抑制されることが明らかになった。

研究目的

AMPA 受容体が聴覚伝導路のシナプス前部にも存在し、神経伝達に関与している可能性について検討する。

研究方法

Wistar-rat (生後 7-8 日齢) を対象とした。実験系としてパッチクランプ法を用い、上オリブ複合体の台形体核 (MNTB) を標的とした。脳幹スライス (厚さ: 175-250 μ m) を 36°C の artificial CSF にて 0.5-1 時間 incubation してから室温に戻し、正立顕微鏡 (Axoskop: Carl-Zeiss) のステージ上に固定した。Bipolar 刺激電極により (AVCN) の軸索から活動電位を誘発し (0.05 Hz)、電極抵抗 1.5-4 M Ω の patch pipette を用い、台形体核から Evoked EPSC を記録した。 (AxoPatch 200B or AxoPatch 1D) 細胞外還流液 (ACSF+Bicuculline+Strychnine) にドウモイ酸を投与し、その前後での EPSC の変化を解析した。

※ Artificial CSF の組成 (mM): NaCl 120, KCl 2.5, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.25, CaCl₂, MgCl₂ 1, D-glucose 10, myo-inositol 3, sodium pyruvate 2, ascorbate 0.5

※ ピペット内液の組成 (mM): CsF 110, CsCl 30, HEPES 10, EGTA 5, MgCl₂, QX-314 5

倫理面への配慮

本研究は東京大学大学院医学系研究科機能生物学専攻神経生理学教室にて実施された。実験動物の取り扱いについては、東京大学大学院の倫理委員会により承認を受けている。

研究結果

(1) ドウモイ酸の Evoked EPSC への影響

ドウモイ酸 (Domoate: 2 μ M) により、Evoked EPSC は $43.7 \pm 4.0\%$ (N=6) 抑制された (図 1)。

(2) 濃度依存性反応

ドウモイ酸 (2 nM-10 μ M) により、Evoked EPSC は濃度依存性に抑制された (図 2)。

(3) ドウモイ酸による AMPA 受容体電流と NMDA 受容体電流の抑制

ドウモイ酸 (10 μ M) により、AMPA 受容体電流と NMDA 受容体電流の両者とも抑制された (図 3)。 (AMPA-EPSC $94.6 \pm 0.3\%$, NMDA-EPSC $73.2 \pm 0.9\%$, N=3)

(4) カイニン酸受容体アンタゴニスト (SYM 2081) 存在下における AMPA 受容体アンタゴニスト (GYKI 52466) によるドウモイ酸の効果の抑制

カイニン酸受容体アンタゴニスト (SYM 2081) 存在下においてもドウモイ酸の効果は認められ。更に AMPA 受容体アンタゴニスト (GYKI 52466) も加えた後、ドウモイ酸を再投与するとドウモイ酸の効果は認められなかった。以上より、ドウモイ酸により活性化されたのは AMPA 受容体であることが明らかになった。

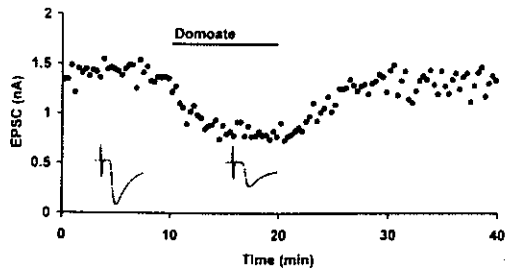


図 1. ドウモイ酸の Evoked EPSC への影響
ドウモイ酸(Domoate: $2 \mu\text{M}$)により、Evoked EPSC は抑制された。Evoked EPSC のキネティクスは変化しなかった。(細胞内電位: -70mV に固定)

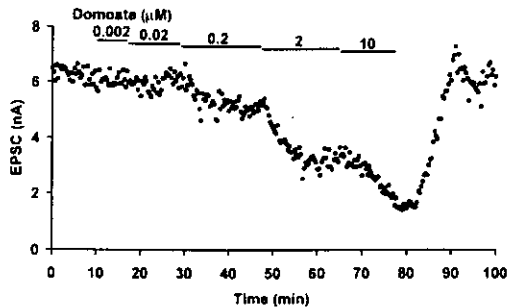


図 2. 濃度依存性反応
ドウモイ酸(2nM - $10 \mu\text{M}$)により、Evoked EPSC は濃度依存性に抑制された。(細胞内電位: -70mV に固定)

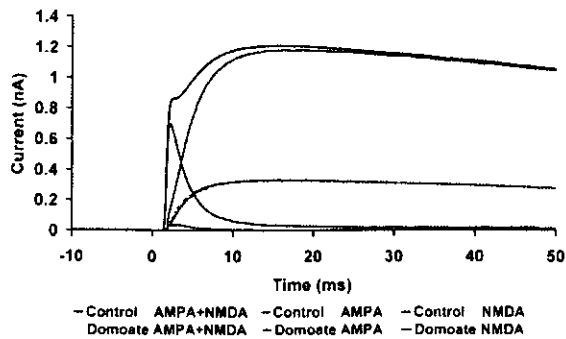


図 3. ドウモイ酸による AMPA 受容体電流と NMDA 受容体電流の抑制
ドウモイ酸($10 \mu\text{M}$)により、AMPA 受容体電流(赤→ピンク)と NMDA 受容体電流(青→水色)の両者とも抑制された。(細胞内電位: $+40\text{mV}$ に固定)

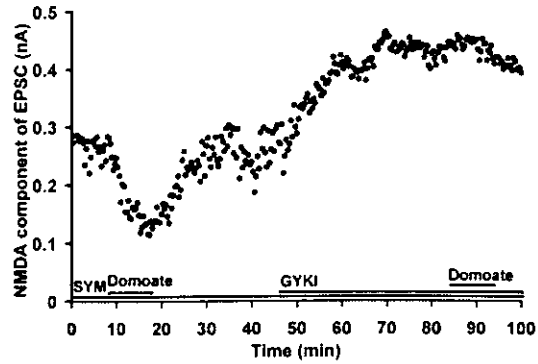


図 4. カイニン酸受容体アンタゴニスト(SYM 2081) 存在下における AMPA 受容体アンタゴニスト(GYKI 52466)によるドウモイ酸の効果の抑制

カイニン酸受容体アンタゴニスト(SYM 2081: $3 \mu\text{M}$) 存在下においてもドウモイ酸($10 \mu\text{M}$)の効果は認められ。更に AMPA 受容体アンタゴニスト(GYKI 52466: $100 \mu\text{M}$)も加えた後、ドウモイ酸を再投与するとドウモイ酸の効果は認められなかった

考察

突発性難聴の原因の1つと考えられているグルタミン酸興奮毒性の成因として、過剰なグルタミン酸によりシナプス後部のグルタミン酸受容体が活性化し、細胞内に多量の Ca^{2+} が流入するプロセスが重要視されている。ドウモイ酸は脱感作を引き起こしづらく、AMPA 受容体を十分活性化することが可能であるため、興奮毒性モデルとしてよく用いられている。本研究で用いた聴覚路の *in vitro* の系においても適応可能であった。

本研究の結果より、ドウモイ酸により AMPA 受容体電流のみならず、NMDA 受容体電流も抑制されることが明らかとなった。すなわち、ドウモイ酸がシナプス後部のみならず、シナプス前部にも作用することが確認された。シナプス前部の AMPA 受容体が活性化され、何らかのカスケードを経て神経伝達物質の放出が抑制されるというメカニズムが存在する可能性が高い。

本研究の結果は、シナプス前部の AMPA 受容体による autoinhibition が興奮毒性を回避する上で重要な役割を担っている可能性があることを示唆する。

参考文献

- 1) Ota Y and Oda M, Acta Otolaryngol. **119**, 33 (1999)
- 2) Sun H et al., J Comp Neurol. **430**, 172 (2001)
- 3) Zaaroor M and Starr A, Electroencephalogr

Clin Neurophysiol. **80**, 422 (1991)

研究発表

<論文発表>

なし

<学会発表>

なし

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

ゲンタマイシンによる蝸牛有毛細胞障害に対するテプレノンの効果

分担研究者 岡本牧人 (北里大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 佐野 肇、米田 敏、伊藤昭彦 (北里大学耳鼻咽喉科)

研究要旨

ゲンタマイシン (GM) による外有毛細胞障害に対して、テプレノンが保護効果を有するかどうか、ラット蝸牛の組織培養法を用いて検討した。今回の実験の結果からは、テプレノンを溶解したエタノールによる保護効果が示されたが、テプレノンによる効果は見出されなかった。

研究目的

テプレノン (商品名セルベックス) は、胃炎、胃潰瘍の治療薬として広く臨床で用いられており、胃粘膜上皮に Heat Shock Protein (HSP) の発現を誘導することにより胃粘膜を保護するとされている。テプレノンは血中に吸収され全身の組織にも分布することが知られており、消化管以外にもその薬効がおよぼ可能性が指摘されている。今回我々は、新生ラットの蝸牛組織培養を用いて、ゲンタマイシンの有毛細胞障害に対するテプレノンの保護効果を検討した。

対象と方法

生後 4 ないし 5 日の新生ラットを用いた。CO₂ による深麻酔後に断頭し、蝸牛の膜迷路を取り出し、ラセン靭帯と血管条を含む外側壁を摘除した後、基底、中、頂回転の 3 つに切断した。中回転をコラーゲンゲル内に埋没させてから DMEM/F12 培養液中で 5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

まず、培養液中にテプレノンを 10⁻⁵ および 10⁻⁶ M の濃度で添加し、5 時間培養した後に 3 μg/ml のゲンタマイシンを添加し 24 時間培養し、次に GM (-)、テプレノン (-) の培養液に交換しさらに 24 時間培養した。テプレノンはエタノールに溶解し 10⁻² M 溶液を作成しそれを培養液中に希釈して添加した。

その後、組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、TRITC または FITC conjugated phalloidin にて染色し残存している外有毛細胞の数をカウントした。

結果

GM なし (コントロール)、GM のみ、GM と GGA10 μM、GM と GGA1 μM、GM とエタノール 0.1% (GGA10 μM と同濃度)、GM とエタノール 0.01% (GGA1 μM と同濃度) の各条件で培養したサンプルの外有毛細胞の残存数 (150 μm あたり) を図 1 に平均と 1 SD で示した。一元配置の分散分析にてこれらの

条件は 1% の危険率で有意であったが、多重比較を行うと、GM なしのコントロールとその他の 5 条件の間にはのみ有意差が認められ、GM のみと GGA 添加群、エタノール添加群との間には有意な差は認められなかった。

GGA、エタノール添加群ではばらつきが大きく、個体による差も大きい印象があったので、一個体の左右耳を 2 つの条件に振り分けて、paired-t-test で比較する方法でさらに検討を行った (図 2)。GM のみ加えたものと、GM と GGA10 μM を加えた条件に振り分けて比較して結果では、両群に有意差が認められ、GGA 添加群で外有毛細胞残存数が多い結果であった。しかしながら、GGA10 μM を添加した群とそれと同濃度のエタノールを添加した群 (GGA 抜き群) に振り分けて比較した結果では、むしろエタノールのみの方が細胞残存数は多く、これも有意な差であった。

図 1 各条件下における外有毛細胞の残存数 (150 μm あたり)

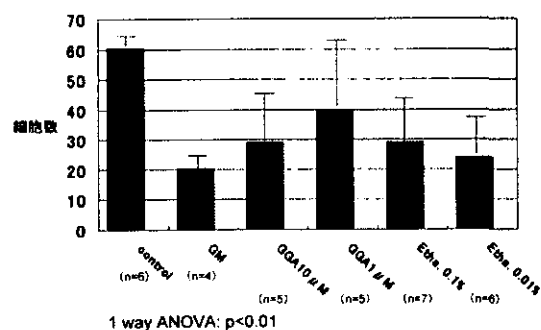
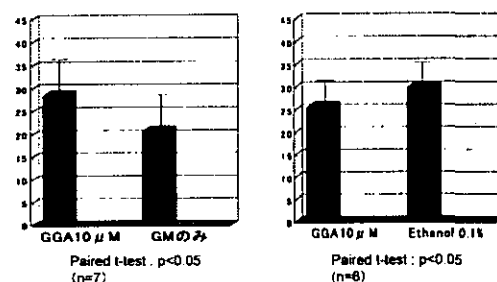


図 2 各条件下における外有毛細胞残存数 (150 μm あたり) 同一個体の左右耳で比較した結果



考察

GM による外有毛細胞死に対する GGA 添加による保護効果が認められたが、同濃度のエタノール添加の方がむしろ残存細胞数は多い結果であった。よって GGA 添加によると思われた保護効果は主にエタノールの効果であると考えられた。

エタノールは HSP 誘導物質として知られており、今回用いた程度の低濃度でも保護作用をもたらす可能性が示された。今後実際に HSP の量に変化を生じさせているのか検討する必要がある。

結論

GM による外有毛細胞障害に対しエタノールが保護効果をもたらす可能性が示された。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 第 13 回日本耳科学会 (2003 年 10 月 東京)

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

蝸牛正円窓經由マイクロカテーテル薬剤注入法による カナマイシン蝸牛障害の検討

分担研究者 岩崎 聡 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 橋本泰幸、水田邦博、大島吾郎、荒井真木 (浜松医科大学耳鼻咽喉科)

研究要旨

これまで蝸牛への薬剤局所投与は、様々な方法が試みられてきた。今回我々は、IntraEAR Animal Round Window micro Catheter (Durect 社) を用い蝸牛への薬剤投与を行いその有用性を検討した。

研究目的

モルモット蝸牛に、マイクロカテーテルを留置し、カナマイシンによる薬剤障害モデルを作成した。濃度、投与時間の違いにより、薬剤の有毛細胞への影響をコントロールする drug delivery system としての有効性について検討した。

められ、2時間投与では、基底回転の内、外有毛細胞そのものが変性消失していた。第2、3回転においても外有毛細胞の聴毛消失が認められた。

研究方法

体重 300 g ~ 400 g の白色モルモット(♂)にペントバルビタール腹腔内投与で全身麻酔をかけ、頭部を固定器に固定する。腹側より中耳骨胞を露出し、骨壁を削り蝸牛を露出する。

IntraEAR Animal Round Window micro Catheter (Durect 社) を正円窓窩に留置し、異なる濃度のカナマイシン (250 mg/ml、125 mg/ml、生理食塩水) を注入速度 0.1 ml/hr にて1時間、2時間の投与を行った。

障害作成4日後にペントバルビタールの腹腔内投与による麻酔後に断頭し、中耳骨胞を摘出、2%グルタルアルデヒドを蝸牛内に注入して灌流固定した。迷路骨胞を除去後、膜迷路を摘出し、リン酸バッファーにて保存、水洗後にエタノール脱水、t-ブチルアルコールに置換し、冷蔵凍結を行い、凍結乾燥機で乾燥し、金をスパッターコーティングして、走査型電子顕微鏡 (Hitachi S-800) にて外有毛細胞、内有毛細胞の障害の程度を観察した。



図1

研究結果

コントロールとして用いた、生理食塩水において、1時間、2時間モデルともに障害は認められなかった。

低濃度(125 mg/ml) 1時間投与では基底回転の外有毛細胞の聴毛消失、2時間モデルでは第2回転まで外有毛細胞の聴毛消失が認められた。

高濃度(250 mg/ml) 1時間投与では、基底回転の内、外有毛細胞ともに聴毛の消失が認

考察

従来、蝸牛への薬剤投与は、蝸牛骨壁を開いたり、正円窓窩に薬剤を浸したゼルフォームを置いてくるなどの方法が行われていた。それらは、外科的侵襲の影響や、希釈による、薬剤濃度への影響が否定できなかった。

マイクロカテーテル法は、蝸牛への侵襲は少なく、正円窓窩に接する薬剤の濃度は一定に保たれることから蝸牛への drug delivery

systemとして有効と考えられた。

今回の研究からは、障害程度は、濃度依存となり、障害範囲は、投与時間に影響するものと考えられた。

これらを踏まえ、今後各種治療法に応用し利用できるものと考えられた。

結論

今回の研究により、drug delivery systemとしてのマイクロカテーテル法の効果を形態的に検討した。カナマイシンによる、薬物障害モデルにおいて、その濃度、投与時間により有毛細胞の障害程度がコントロールできる可能性が示唆された。

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

中耳炎による蝸牛外側壁障害に対する薬剤局所投与治療

分担研究者：中島 務（名古屋大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：曾根 三千彦、山本 浩志、林 秀雄、富永 光雄

（名古屋大学耳鼻咽喉科）

研究要旨

中耳炎による内耳障害の病態を解明するため、蝸牛外側壁に焦点をあてその治療について予防的対処法も含めて検討した。中耳炎発症後24時間後には、外側壁の血流は有意に低下を認めたが14日目には改善していた。この所見は組織学的にも裏付けられた。NOS阻害剤、ステロイド剤の局所投与治療とHSPを介した予防法を検討しその有効性を確認した。

研究目的

急性中耳炎を含む炎症による内耳障害は、可逆的な部分も多いが永久的に障害をもたらす場合もある。そのターゲットとして蝸牛外側壁が指摘されている。その病態を把握するとともに、臨床に即した局所的な予防法、治療法について検討した。

研究方法

SDラットに対し、endotoxinとしてLPSを鼓膜経由に右中耳腔に注入し中耳炎モデルを作成、左耳は無処置とした。中耳炎ラットはLPS注入後1日目、7日目、14日目の3群に分けた。LPSにかわってPBSを右中耳腔に注入したラットも作成した。蝸牛血流を蝸牛基底回転外側壁の粘膜および骨膜を除去し、レーザードップラープローブにて蝸牛血流（CBF）を測定した。左側の値に対する右側の値の比を評価した。その後、PGE₁を正円窓窩に投与し血流の変化を30分にわたり測定、投与前の値に対する比として評価した。組織学的評価のため、血流測定後側頭骨を採取し、光顕及び透過電顕用に切片を作成した。薬剤投与の影響を検討するために、1% Dexamethasone投与群、NOS-inhibitor投与群、コントロールとしてPBS投与群の3群に分け、LPS注入30分後にそれぞれ中耳腔に追加投与し24時間後に評価した。またHeat shock proteinのinducerであるGeranylgeranylacetone（GGA）投与による点からの検討として、GGAの局所または全身投与を行い、蝸牛におけるHSPの発現を確認するとともに、LPS鼓室内注入24時間後の外側壁の障害を評価した。

研究結果

中耳炎発症後1日目のCBFの平均値は0.74であり、患側の蝸牛血流は健側に比し26%と有意な減少を認めた。7日目および14日目の値は0.87と0.97であった。正常群でのPGE₁投与による平均は1.23に対し、中耳炎耳1日目では、平均1.04であり、7日目および14日目にはともに1.16であり反応の増加が見られたが、正常群に比し低値であった。光顕での観察で、1日目の蝸牛外側壁に血管条中間細胞領域の空胞変性を主体とした変化がみられたが、14日目にはほぼ改善しており、血流障害の経過と一致する組織所見であった。血管条の電顕所見では、1日目には中間細胞領域の著明な細胞間隙の増大と辺縁細胞の内リンパ腔への膨隆を認めた。

薬剤投与の影響として、Dexamethasone投与群では平均値は0.95であり、健側に比し5%のみの血流減少であった。NOS-inhibitor投与群では、平均値は、1.09であり、健側より血流が増加していた（図1）。PGE₁投与後の血流増加の反応はDexamethasoneおよびNOS-inhibitor投与群では、平均値がそれぞれ1.11と1.18であり、PBS投与群に比しPGE₁に対する反応の増加が見られた。電顕では、Dexamethasone投与群で辺縁細胞の内リンパ腔面の変性がみられたが、中間細胞領域の細胞間隙の増大は抑制されていた。NOS-inhibitor投与群では、ほぼ正常の所見であった。GGA全身及び鼓室内投与により、immunoblotting、免疫染色とも蝸牛内HSPタンパクの強い発現を認めた。GGA投与群では、中耳炎発症1日後の血管条はほぼ正常所見であった。またPGE₁投与後の血流増加の反応

は、1.25 と良好であった。

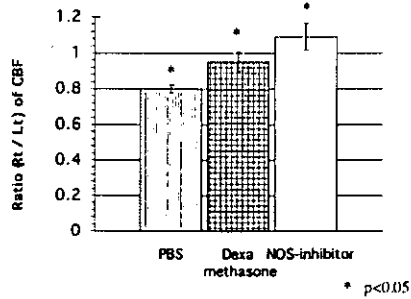


図 1

考察

炎症、特に急性中耳炎による内耳障害は予後良好とされている、今回の実験でL P S 注入後 1 日目に認められた血流障害は 1 4 日目にはほぼ改善していたが、P G E₁ の反応はまだ低値を示した。このことは、血流の改善は見られたものの、血管およびその周囲組織の障害がなおも残存していることを示している。

薬剤の鼓室内投与ではDexamethasone、NOS-inhibitorとも中耳炎発症 1 日目の蝸牛外側壁の障害を、血流と組織変化ともに有意に抑制できたことが示された。また、H S P 発現による内耳障害の予防効果も有効であることがわかった。急性中耳炎等の炎症に伴う内耳障害としての蝸牛外側壁の組織学的変化および血流障害に対し、薬剤鼓室内投与による治療の有効性が示唆された。この結果は、臨床上的治療法としてその可能性を示している。

研究発表

1. 論文発表

1) A comparative study of intratympanic steroid and NO synthase inhibitor for treatment of cochlear lateral wall damage due to acute otitis media:

Michihiko Sone, Hideo Hayashi, Hiroshi Yamamoto, Mitsuo Tominaga, Tsutomu Nakashima Eur J Pharmacol 2003; 482: 313-318.

2) Changes of cochlear blood flow due to endotoxin-induced otitis media:

Michihiko Sone, Hideo Hayashi, Mitsuo Tominaga, Tsutomu Nakashima Ann Otol Rhinol Laryngol in press

2. 学会発表

第 1 3 回日本耳科学会総会で口演

知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, Namba A, Abe S, Usami SI. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:916-22.

Usami S, Takahashi K, Yuge I, Ohtsuka A, Namba A, Abe S, Fransen E, Patthy L, Otting G, Van Camp G. Mutations in the COCH gene are a frequent cause of autosomal dominant progressive cochleo-vestibular dysfunction, but not of Meniere's disease. *Eur J Hum Genet* 2003;11(10):744-8.

Ohtsuka A, Yuge I, Kimura S, Namba A, Abe S, Van Laer L, Van Camp G, Usami S. GJB2 deafness gene shows a specific spectrum of mutations in Japan, including a frequent founder mutation. *Hum Genet* 2003;112(4):329-33.

福島邦博 内耳イオン輸送機構に起因する遺伝性難聴の病態 *Otology Japan* 13 100-103 2003

赤木博文 福島邦博 小坂道也 服部謙志 土井彰 西_和則 松田充浩 四方賢一 横野博史 IgA腎症扁摘例の10年予後 *口咽科* 15 335-344 2003

福島邦博 聴力検査 小児科臨床 増刊号 56 1177-1181 2003

福島邦博 胎性期に発生した疾患の遺伝カウンセリングと予後 聴覚 周産期医学 33 1108-1110 2003

K Nishizaki, H Tsujigiwa, Y Takeda, T Yoshino, M Maeta, K Fukushima, H Nagatsuka N Nagai Mastoid obliteration by BMP-2/collagen composites: An experimental study using tissue engineering, *Am J Otolaryngol* 24, 2003, 14-18

S Fukuda, K Fukushima, Y Maeda, K Tsukamura, R Nagayasu, N Toida, N Kibayashi, N Kasai, A Sugata K Nishizaki Language development of a multiply handicapped child after cochlear implantation *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 67 627-633 2003,

J Kanzaki, Y Inoue, K Ogawa, S Fukuda, K Fukushima, K Gyo, N Yanagihara, T Hoshino, J Ishitoya, M Toriyama *et al.* Effect of single-drug treatment on idiopathic sudden sensorineural hearing loss, *Auris Nasus Larynx*, 30 123-127 2003,

K Fukushima, K Nagai, H Tsukada, A Sugata, K Sugata, N Kasai, N Kibayashi, Y Maeda, M Gunduz, K Nishizaki Deletion mapping of split hand/split foot malformation with hearing impairment: a case report *Int J Pediatric Otorhinolaryngol* 67 1127-1132, 2003

S Fukuda, K Fukushima, N Toida, K Tsukamura, Y Maeda, N Kibayashi, R Nagayasu, Y Orita, N Kasai, Y Kataoka, N Kazunori: Monosyllable speech perception of Japanese Hearing aid users with prelingual hearing loss: implications for surgical indication of cochlear implant. *Int J Pediatric Otorhinolaryngol* 67 1061-1067, 2003

水川敦裕、佐藤宏昭、村井和夫：突発性難聴と耳閉塞感。 *ENTONI* 35:27-32、2004.

Takeshita T, Iwasaki S, Nagura M, Watanabe T, Umemura K, Hoshino T.: Photochemically induced double lateral wall lesions in the guinea pig cochlea. *Acta Oto-Laryngol.* 123:355-361,2003.

Iwasaki S, Hayashi Y., Seki A., Nagura M., Hashimoto Y., Oshima G., Hoshino T. : A model of two-stage newborn hearing screening with automated auditory brainstem response. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 67 (10):1099-1104,2003