

分 担 研 究 報 告

メニエール病の病因と再発予防に関する研究

主任研究者 高橋 正紘 東海大学教授

研究要旨 1) 内リンパ水腫患者の聴力予後、苦痛度、発症誘因を、詳細な問診、診療録、郵送アンケートで調査した。発症早期の低音障害は改善と再発を反復し、1年を超えると改善しにくくなった。経年的に不可逆病変に進行し両側障害の割合も増加した。自覚的な苦痛度も聴力の進行に平行していた。発症誘因として多忙、睡眠不足、職場対人関係、家庭内トラブルが多くを占めた。2) メニエール病と低音障害型感音難聴の患者で、性と年齢の対応した対照群と行動特性を比較した。メ病群では自己抑制行動と熱中行動、一部の攻撃行動(勝気、イライラしやすい)が有意($P < 0.01$)に強かった。低音障害群も強い熱中行動と時間切迫行動を示したが、自己抑制行動と攻撃行動は弱く、メ病群よりも環境要因の強いことが示唆された。両疾患ともに、周囲からの報酬不足が情動(不満)を介して発症に関わると推測された。3) 再発予防を目的として、調査結果と臨床体験を元に生活指導方法を提唱した。原理は、他人の評価よりも自分の満足を優先する、仕事量を減らし自由時間を確保する、義務的、形式的な付き合いを減らす、汗を流す運動や趣味で発散する、など。早期例では生活指導は再発予防に効果的であったが、罹病長期例や進行例では効果が薄かった。4) メ病の病因解明と治療の今後を展望するために、厚労省研究班の報告書ならびに PubMed による文献検索で、研究の変遷を調べた。病因研究は内耳に集中し、患者のストレスや情動など内的環境の研究に乏しい。治療は内リンパ開放や神経切断からゲンタマイシンの少量局所投与に収束しつつある。今後、患者の立場に立った、具体的な再発予防策や進行予防の実践的な研究が求められている。

A. 研究目的

1) 内リンパ水腫の長期予後を知るため、メ病の重症度分類(1999年)の一部を変更した病態進行度を指標として、経年的経過と、各進行度における軽快と進行の確率を調べた。

2) 内リンパ水腫の発症増悪要因を明らかにするため、問診とアンケート調査を実施し、男女別、世代別に分析した。

3) 内リンパ水腫患者で自覚的苦痛度を指標の一つに取り入れ、治癒を定義した。苦痛度が病態進行度や罹病期間とどう関わるかを調べ、治癒と進行を分ける要因を分析した。

4) メ病患者群の行動特性を、性、年齢が厳密に対応した対照群の調査結果と比較した。さらに、低音障害型感音難聴群でも同様に調査し、両疾患の違いを行動特性の結果から分析した。

5) メ病で再発予防のための生活指導の有効性を調べるために、生活指導群と薬物治療単独群で、1年後の聴力を比較した。さらに、生活指導の有効と無効の条件を、聴力、めまい、満足度から分析した。

6) メ病の病因や治療方法は解明されない。この理由を探り今後を展望するために、過去30年間の厚

労省研究班の調査報告書を総括し、PubMed により過去 54 年間の研究論文の時代推移を明らかにした。

7) 抗利尿ホルモン(ADH)に与える睡眠制限の影響を調べるために、夜勤明け看護師と、極端な睡眠制限を課した若年者で、ADH その他のストレスマーカーの血漿濃度を調べた。

B. 研究方法

1) メ病 92 名、急性低音障害型感音難聴 66 名の計 158 名を対象とした。患者の原則 2ヶ月ごとのオーディオグラムの病態進行度の変化を集計し、各病態進行度における変化の確率を求めた。この確率から経年的進行をシミュレーションした。さらに、罹病期間と病態進行度の関係、病態進行度を指標とした、メ病と急性低音障害型感音難聴の違いを調べた。

2) 内リンパ水腫患者 120-170 名(項目により対象数が異なる)に対し、詳細な診療録と発症とストレスについての郵送アンケートから、ストレスの関わり、発症増悪要因の内容を記載してもらった。これらの結果を男女別、世代別に分析した。

3) 内リンパ水腫の治癒を、(1)聴力正常、(2)苦痛

度がゼロか軽微, (3)再発がないと定義した. 苦痛度は耳圧迫感, めまい, 耳鳴, 難聴, 日常生活制限について, 5段階評価した. 内リンパ水腫患者 90名(メ病 90名, 急性低音障害型感音難聴 30名)の郵送アンケート調査から, 苦痛度と最新の病態進行度, 罹病期間との関係を調べた. これらより, 治癒と進行を分ける要因を分析した.

4) メ病男性 62名(平均 49.8歳), 女性 123名(平均 51.4歳)を対象とした. 対照群は, 有効なアンケート結果の得られた地域住民 799名から性, 年齢の対応した対照者 185名である. アンケート調査項目のうち行動特性 24項目について, そうではない, まあまあそうである, 大いにそうであるの回答割合を, 両群間で χ^2 検定し, 有意差を危険率 5%, 1%で判定した. 同様の調査を低音障害型感音難聴 144名, 男性 57名(平均 46.9歳), 女性 87名(平均 49.2歳)に実施し, 対照群との検定結果から, メ病と低音障害型感音難聴の違いを調べた.

5) 対象はメ病初発例(発病 1年以内)に限った. 再発予防の生活指導に重点を置いた 37例(男性 11名, 女性 26名, 平均 45.8歳)と, 薬物治療のみの 29例(男性 9名, 女性 20名, 平均 45.6歳)である. 初診から 1年後の聴力の変化(病態進行度 0点, 1点, 2点, 3点の割合)を χ^2 検定で比較した. さらに, 生活指導を実施したメ病患者 100名で, 治療効果のアンケート調査結果, 問診, 聴力所見から, 各例の生活指導の有効度を評価した. これより, 有効例に共通の特徴と, 効果の少ない例の特徴を求めた.

6) 第一に, 1974年の厚生省特定疾患メ病調査研究班から, 2004年の厚労省難治性疾患前庭機能異常調査研究班まで, 30年間の年度ごとの総括報告書を調べた. 第二に, メ病のキーワードでコンピュータ検索し(PubMed), 1950-2004年の 5,551件のうち, 関係のある 4,531件の論文タイトルを内容別に分類し, 年代毎の論文数の推移を調べた. これより, メ病の病因と治療の研究の変遷をたどった. これら 2つの調査から, メ病研究の課題を探った.

7) 夜間勤務の看護師 15名(男性 1名, 女性 14名, 年齢 21-39歳, 勤務 1-14年), と健康成人 10名(男性 6名, 女性 4名, 20-25歳)を対象とした. 同一看護師で, 1日夜勤明けを 4回, 2日連続夜勤明けを 4回, 休日明けの日勤勤務を 8回, 午前中に採血した. 健康者では, 徹夜を課した翌日と 7時間以上睡眠の翌日午前に採血した. 同時に日本産業衛生学会の表で疲労度を調べた. ストレスマーカーとし

て ADH, コルチゾール, フィブリンノーゲン, その他の生化学検査として Na, K, 血糖値, 尿素窒素, 血漿浸透圧を計測した.

C. 研究結果

1) 低音障害が改善する確率は 43%, 正常聴力から再発する確率は 40%で, 高音障害へ移行する確率は低いが(7%弱), 移行後は改善の確率が大きく低下した. これらの確率を元にシミュレーションすると, 低音障害 100名のうち発症 10年後には不可逆病変が 47名に達した. 症例の集計では, 発症1年以内の不可逆病変は稀であるが, 1-3年では 39.4%に急増した. 経年的に両側障害例の割合も増大した. 急性低音障害型感音難聴の不可逆病変は稀で, 罹病期間と共に, 内リンパ水腫に占めるメ病の割合が増大した.

2) 内リンパ水腫患者の 6-8割が, 発症や増悪にストレスの関わりを自覚していた. 発症増悪要因は多忙, 睡眠不足が突出し, 職場対人関係, 家庭トラブルの順であった. 男性は仕事関連, 女性は家庭関連の要因が多かった. 20代は睡眠不足, 30代は多忙, 40代は職場対人関係, 50代は全世代的傾向, 60代は家庭トラブルが突出していた.

3) 苦痛度の合計点は病態進行度と密接に関連していた. 聴力正常群でも苦痛ゼロは 30%に過ぎず, 苦痛軽微例(合計 2点以下)に限っても 64%に過ぎなかった. 苦痛度ゼロの割合は発症 3ヶ月以内で 40%, 1-3年で 20%に減少した. 苦痛軽微例の割合は発症1年を過ぎると, 70%から 33%に急減した. 進行例や罹病長期例は苦痛度が大きい, 初診時にはいずれも低音障害であり, 発症早期の再発予防の成功か否かが治癒と進行を分けると言える.

4) 危険率 5%で有意差のある行動特性項目は, メ病の男性 62.5%, 女性 70.8%, 危険率 1%では 37.5%, 58.3%であった. 危険率 1%の有意差項目は男女でそれぞれ, 攻撃行動の 33.3%, 50%, 熱中行動の 50%, 75%, 時間切迫行動の 25%, 75%, 自己抑制行動の 66.7%, 83.3%, 逃避行動の 0%を占めた. 女性で有意差の割合がより高く, 男女ともに自己抑制行動, 熱中行動が著しかった. 日常の過ごし方で有意差項目($P < 0.05$)は男女共通はなく, ともに全項目の 25%に過ぎなかった. 低音障害型感音難聴の危険率 5%の行動特性有意差項目は, 男女で 50%, 45.8%, 危険率 1%では 29.2%, 25%であった. 危険率 1%の有意差項目の割合は男女で, 攻撃行

動の 0%, 16.7%, 熱中行動のともに 50%, 時間切迫行動のともに 50%, 自己抑制行動の 33.3%, 16.7%, 逃避行動の 25%, 0%であった。低音障害型感音難聴はメ病に比べ、自己抑制行動、攻撃行動がはるかに弱かった。

5) 生活指導群の初診時聴力は、病態進行度 1 点が 86.5%, 2 点が 10.8%, 3 点が 2.7%で、1 年後は 0 点が 73.0%, 1 点が 10.8%, 2 点 13.5%, 3 点が 2.7%であった。薬物治療群では初診時進行度 1 点が 82.8%, 2 点が 13.8%, 3 点が 3.4%で、1 年後は 0 点 51.7%, 1 点が 27.6%, 2 点が 13.8%, 3 点が 6.9%であった。初診時に両群間で有意差はなかったが、1 年後の進行度と、進行度 1 点(低音障害)に限った 1 年後の進行度はともに、危険率 0.1%未満で生活指導群が薬物治療群より良好であった。生活指導 100 名中に、聴力とアンケートから治療無効と判定された 12 例があった。これらは少数を除き、罹病 5 年以上か病態進行度 2 点か 3 点であった。長い罹病期間や不可逆病変例は、生活指導の効果や満足度の低いことが判明した。

6) 過去 30 年間の厚生省研究班では、大規模な疫学調査から、環境要因よりも個人的な要因が発症に関わると結論された。病因として局所の形態、自己免疫、水代謝、ストレスが研究されてきたが、いまだ解明されていない。現在は局所の水代謝機構、行動特性、遺伝子が研究されている。治療では、抗酸化剤などの局所投与が動物実験で良い成績をあげつつあり、進行予防に期待されている。文献的には、全年度で治療文献が一番多く、次いで検査・診断、病態・病因であった。病因では、病理・形態・計測が頭抜けて多く、研究ピークは心理・心身医学が 70 年代、病理・形態が 80 年代、実験的内リンパ水腫が 90 年代、免疫・免疫異常が 90 年代以降で、近年は遺伝子関連が増加している。治療は迷路破壊術が 60 年代にピークがあり、薬物治療は 70 年代、内リンパ嚢開放術は 80 年代、前庭神経切断術は 70-90 年代にそれぞれピークがあった。90 年代以降は圧倒的多数が、内耳局所の薬物(ゲンタマイシン)投与である。

7) 疲労度の点数は、看護師群、徹夜群いずれも、夜勤明け、徹夜明けで値が増加していたが、両群ともに ADH の値の有意な変動は見られなかった。他のストレスマーカー、フィブリノーゲンも疲労度と明らかな相関を示さなかった。

D. 考察

1) 内リンパ水腫の予後：難聴の進行度を指標とした分類(病態進行度)を多様な罹病期間の多数の症例に当てはめると、進行に一定の規則性のあることが判明した。発症早期の低音障害は回復しやすいが再発もしやすく、軽快再発の反復途上で高音障害に移行する。この状態が続くとさらに全音域の難聴へと進行する。シミュレーションでは、低音障害の約半数が 10 年後には不可逆病変に移行した。試算結果と罹病期間別の進行度はおおむね対応しており、罹病 1 年を過ぎると進行する傾向があり、苦痛度も増加していた。難聴やめまいの消失は治癒ではなく、耳閉感や耳鳴の苦痛の割合も高く、再発予防の重要なことを示している。発症誘因としては、多忙、睡眠不足、職場対人関係、家庭内トラブルが上位をしめたが、年代別に特徴が見られた。これらの調査からは、発症 1 年以内の環境要因を考慮した再発予防策が最重要と結論される。

2) メ病患者の特異な行動特性：当初の調査で、内リンパ水腫患者の特異な行動特性が判明していた。その後、メ病群と低音障害型感音難聴群それぞれで、性、年齢の対応した地域住民の対照群と比較した。この結果、メ病患者群で自己抑制行動と熱中行動が著しく、攻撃行動(勝気、イライラしやすい)も強いことが判明した。日常の過ごし方やストレス源では大差なく、メ病は社会的な人間関係、すなわち、奉仕や気配りに対する周囲からの報酬不足で、発症する可能性が示唆された。一方、低音障害型感音難聴群は、熱中や時間切迫の行動は強いが、自己抑制や攻撃の行動は弱かった。これより、環境要因が熱中や時間切迫の行動を強いていると推測され、メ病群よりも予後良好な事実に対応している。自己抑制や熱中、時間切迫の行動を促進させる環境は、内リンパ水腫の発症や増悪のリスクファクターといえる。

3) 生活指導：調査結果を元にわれわれは、a)少し早目の帰宅、b)仕事を持ち帰らない、c)週末は運動や趣味実践に当てる、d)他人の評価よりも自分の満足を優先する、e)汗を流す運動を実践する、などの生活指導を患者群に実施している。発症早期例では、薬物治療単独よりも生活指導の方が治療成績の良いことが確認された。しかし治療成績の分析から、罹病長期例や進行例では効果の低いことも判明した。これより、発症後の極力早期に患者の環境や行動特性を考慮して生活指導し、励まし、再発予防を図ることが重要と思われる。行動特性は多分に資質に由来するために、再発や進行の予防には、患者の納得と

協力が不可欠である。

4) 厚労省調査報告書と文献検索から学ぶ: これまでメ病については、膨大な研究が国の内外で実施されてきた。検査や診断、手術治療が多くを占めるが、病因・病態も 919 件に上る。病因研究の多くは局所内耳に向けられおり、Robert Kimura の実験的内リンパ水腫の足枷を思わせる。ストレス病といわれる割には、病因としての個人、環境のストレス研究はきわめて少数に過ぎない。社会医学的な研究、ストレスや情動が心身に与える影響など、本来の意味での心身医学の研究が望まれる。局所治療は過去の迷路破壊術、内リンパ嚢開放術、神経切断術の流行を経て、現在はゲンタマイシンの少量局所投与に収束している。内耳局所への薬物投与による進行予防の可能性はあるが、早期の再発予防策の具体化がより重要であろう。

E. 結論

1) 内リンパ水腫患者の聴力推移、発症誘因、自覚的苦痛度を、詳細な問診、診療録、郵送アンケートで調査した。低音障害は発症 1 年以内では改善しやすいが、1 年を超えると改善しにくくなった。経年的に不可逆病変に進行し、両側障害の割合も増加した。自覚的な苦痛度も聴力の進行に平行していた。発症誘因として、多忙、睡眠不足、職場対人関係、家庭内トラブルが自覚されていた。

2) メ病と低音障害型感音難聴の患者で、性と年齢の対応する地域住民を対照群として、行動特性を比較した。メ病群では自己抑制行動、熱中行動、一部の攻撃行動(勝気、イライラしやすい)の著しいことが確認された。低音障害群は強い熱中行動と時間切迫行動を示すが、自己抑制行動と攻撃行動は弱く、メ病群よりも環境要因の強いことが示唆された。メ病は周囲の評価を期待して自発的に、低音障害は環境で強いられて熱中行動を示す、と解釈された。両疾患ともに、周囲からの報酬不足が情動(不満)を介して発症に関わると推測される。

3) 現時点でメ病の長期的に有効な治療方法はない。そこで、調査結果と臨床体験を元に、生活指導による再発予防策を提唱した。a)他人の評価よりも自分の満足を優先する、b)週に 2 日ほどは早く帰宅する、週 1 日は介護を他人に託す c)週末は運動や趣味など発散に当てる、d)義務的な付き合い、形式的な社交を極力減らす、e)汗を流す運動を実践する、など。限られた症例であるが、早期例では生活指導は

再発予防に効果的であった。罹病長期例や進行例では効果が薄かった。

4) 厚労省研究班の報告書ならびに PubMed による文献検索により、メ病研究の変遷を調べた。内耳局所は詳細に研究されているが、ストレスや情動に関係した研究や社会医学的研究に乏しい。今後、患者の立場に立った、再発予防や進行予防の実践的な研究が求められている。

F. 健康危険情報

今回の調査から、周囲の評価を期待して自分を抑え頑張る行動は、メ病のリスクファクターと言える。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Sekine M, Ikeda T, Watanuki K, Hakuta S, Takeoka H. Effect of microgravity on spatial orientation and posture regulation during Coriolis stimulation. *Acta Otolaryngol* 2004;124:495-501.
- 2) Onuki J, Takahashi M, Odagiri K, Wada R, Sato R. A comparative study of the dairy lifestyle of Meniere's disease patients and controls. *Ann Otol Rhinol laryngol*, 2005, 投稿中
- 3) 高橋正紘. 身体平衡における視覚と前庭覚の統合. *Vision* (日本視覚学会機関誌) 2005;17:11-22.
- 4) 高橋正紘, 大貫純一, 飯田政弘. 内リンパ水腫患者の行動特性. *耳鼻臨床* 2004;97:85-92.
- 5) 高橋正紘. シンポジウム 1「メニエール病研究に関する最近の話題—治療を中心に—」治療を見据えた診断基準と重症度分類. *Equilibrium Res* 2003;62:125-131.
- 6) 高橋正紘. めまいの病態—耳鼻科の立場から. *神経内科* 2003;59:453-459.
- 7) 高橋正紘. めまい. *ガイドライン外来診療* 2003. 日経メディカル開発, 東京, 2003, pp.404-405.
- 8) 高橋正紘, 大貫純一, 小田桐恭子, 飯田政弘. 内リンパ水腫の聴力変動にみられる規則性. *Otol Jpn* 2003;13:135-140.
- 9) 高橋正紘:メニエール病—発症増悪要因を探る—. *耳喉頭頸* 74:837-841,2002.
- 10) 高橋正紘:Meniere 病(内リンパ水腫). *日本医*

師会雑誌 127:10,2002.

- 11) Hitouji K, Takahashi M, Iida M, Ohnuki J, Furuya H. Spatial reference and standing posture during high-speed Coriolis stimulation. *Aviat Space Environ Med* 73:865-871,2003.
2. 学会発表
 - 1) 小田桐恭子, 高橋正紘, 和田涼子, 大貫純一, 飯田政弘. 行動特性調査から見たメニエール病の治療. *日耳鼻* 2004;107:405.
 - 2) 大貫純一, 高橋正紘, 小田桐恭子, 和田涼子, 飯田政弘. メニエール病に対する生活指導の効果. *日耳鼻* 2004;107:405.
 - 3) 関根基樹, 高橋正紘. 脳疲労が起立に及ぼす影響. *日耳鼻* 2004;107:469.
 - 4) Sekine M, Takahashi M. Perceived surrounding space determines posture, eye movement, and sensation under 1G and microgravity. XXIII International congress of Barany Society. Paris, 2004.7.
 - 5) Ohnuki J, Takahashi M, Odagiri K, Wada R. Patients of Meniere's disease possesses singular behavioral characteristics. XXIII International congress of Barany Society. Paris, 2004.7.
 - 6) 小田桐恭子, 高橋正紘, 和田涼子, 佐藤梨里子. メニエール病, 治療の問題点. *日本耳科学会, Otology Japan* 2004;14:352.
 - 7) 和田涼子, 高橋正紘, 小田桐恭子, 佐藤梨里子. メニエール病と急性低音障害型感音難聴の行動特性比較. *日本耳科学会, Otology Japan* 2004;14:353.
 - 8) 関根基樹, 高橋正紘, 佐藤梨里子. 睡眠制限や疲労が揺らぎに与える影響. *日本めまい平衡医学会 Equilibrium Res* 2004;63:455.
 - 9) 佐藤梨里子, 高橋正紘, 小田桐恭子. メニエール病患者ならびに夜勤看護師のADH測定結果. *日本めまい平衡医学会, Equilibrium Res* 2004;63:441.
 - 10) 小田桐恭子, 高橋正紘, 和田涼子. 生活指導によるメニエール病のめまい治療成績. *日本めまい平衡医学会, Equilibrium Res* 2004;63:442.
 - 11) 高橋正紘, 小田桐恭子, 和田涼子, 佐藤梨里子. メニエール病はなぜ解決されないか. *日本めまい平衡医学会, Equilibrium Res* 2004;63:444.
 - 12) 和田涼子, 高橋正紘, 小田桐恭子. 低音障害型感音難聴とメニエール病の聴力予後の比較. *日本めまい平衡医学会, Equilibrium Res* 2004;63:445.
 - 13) 高橋正紘, 関根基樹. 外界知覚を元にした画一的動作制御. 第4回姿勢と歩行研究会, 2005,3.
 - 14) 高橋正紘, 関根基樹. 環境医学的にみたメニエール病の成因. 第50回宇宙航空環境医学会, 2004,11.
 - 15) 高橋正紘. 身体平衡における視覚と前庭覚の統合. *日本視覚学会冬期大会*, 2005,1.
 - 16) 関根基樹, 高橋正紘, 小田桐恭子, 飯田政弘, 武岡元, 栗山可奈, 後藤壮輔, 宮内孝典. パラボラフライトにおけるコリオリ刺激実験. 第61回日本めまい平衡医学会, *Equilibrium Res* 2002;61:290.
 - 17) 関根基樹, 高橋正紘, 飯田政弘, 池田卓生, 綿貫浩一, 福田裕次郎, 武岡元, 栗山可奈, 後藤壮輔, 宮内孝典. 0G空間におけるコリオリ刺激実験. *日耳鼻* 2003;106:438.
 - 18) 小田桐恭子, 高橋正紘, 大貫純一, 一氏佳代子, 飯田政弘. 内リンパ水腫の病態進行と増悪要因. *日耳鼻* 2003;106:440.
 - 19) 和田涼子, 高橋正紘, 大貫純一, 小田桐恭子, 飯田政弘, 原田竜彦. 生活指導によるメニエール病難治例の治療. *日耳鼻* 2003;106:462.
 - 20) 大貫純一, 高橋正紘, 和田涼子, 小田桐恭子, 飯田政弘, 原田竜彦. 内リンパ水腫患者の特異な行動特性—地域住民との比較調査. *日耳鼻* 2003;106:463.
 - 21) 関根基樹, 高橋正紘, 池田卓生, 綿貫浩一, 武岡元. 1Gと μ Gにおけるsensory-motor coordination. *Equilibrium Res* 2003;62:446.
 - 22) 高橋正紘, 関根基樹, 池田卓生, 綿貫浩一, 武岡元. 外界座標を鋳型とする運動制御仮説. *Equilibrium Res* 2003;62:446.
 - 23) 佐藤梨里子, 高橋正紘, 大貫純一, 飯田政弘. 両側内リンパ水腫の分析. *Equilibrium Res* 2003;62:474.
 - 24) 小田桐恭子, 高橋正紘, 大貫純一, 関根基樹, 飯田政弘. 異なる対象群における行動特性調査. *Equilibrium Res* 2003;62:461.
 - 25) 和田涼子, 高橋正紘, 大貫純一, 関根基樹, 飯田政弘. 生活指導による内リンパ水腫患者の治

療. *Equilibrium Res* 2003;62:477.

- 26) 大貫純一, 高橋正紘. メニエール病の聴力予後とライフスタイル. パネルディスカッションーメニエール病の長期治療成績. *Equilibrium Res* 2003;62: 499.
- 27) 高橋正紘, 関根基樹. 外界知覚が姿勢を制御する. 第3回姿勢と歩行研究会, 東京, 2004.3.6.
- 28) 関根基樹, 高橋正紘. μ G 空間における姿勢変化と眼球運動の乖離. 第3回姿勢と歩行研究会, 東京, 2004.3.6.
- 29) 白田周三, 小林修, 高橋正紘, 関根基樹, 小田桐恭子, 飯田政弘, 武岡元, 栗山可奈, 後藤壮輔, 宮内孝典: コリオリ刺激下の身体移動と眼球運動. 第61回日本めまい平衡医学会, *Equilibrium Res* 2002;61:319.
- 30) 飯田政弘, 高橋正紘, 灰田宗孝: 光トポグラフィーを用いた末梢前庭と大脳皮質の関係についての検討. 第61回日本めまい平衡医学会, *Equilibrium Res* 2002;61:321.
- 31) 小田桐恭子, 高橋正紘, 大貫純一, 飯田政弘: 徹底した生活指導が奏功したメニエール病の一症例. 第61回日本めまい平衡医学会, *Equilibrium Res* 2002;61:362.
- 32) 高橋正紘: 治療を見据えた診断基準・重症度分類. 第61回日本めまい平衡医学会, *Equilibrium Res* 2002;61:286.
- 33) 高橋正紘, 大貫純一, 小田桐恭子, 原田竜彦: 内リンパ水腫の病態進行に見られる規則性. 第12回日本耳科学会, *Otology Japan* 2002;12:489.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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, 所見はメ病診断基準と一致しており, メ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 COCH 遺伝子の発現特異性を遺伝子レベル, 蛋白レベルから明らかにした。

一方, CTP 発現が外リンパ特異的であることを利用し外リンパ瘻診断法を開発中である。CTP の発現は今まで検査した外リンパ検体には100%含まれている。特発性外リンパ瘻症例の中耳洗浄液からも CTP が検出されたことから本検査法が外リンパ瘻のあらたな確定診断法となると思われる。臨床例の検討から外リンパ瘻, とりわけ慢性外リンパ瘻がメ病の重要な鑑別診断となることを示した。

メ病を特異的に診断する診断法はいまだ開発されていない。メ病診断基準が除外診断であることに留意して除外すべき疾患を十分に検査しなければ「真のメニエール病」は診断できない。メ病の治療法を明らかにするには「真のメニエール病」のみを対象としたコントロールスタディーが必要である。

A. 研究目的

本研究の目的はメ病の病態解明, メ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。

1. 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。さらに, 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 COCH 遺伝子の発現特異性を遺伝子, 蛋白レベルから検討する。

2. CTP 検出法によるあらたな外リンパ瘻の臨床診断法を確立させ, メ病の鑑別診断のエビデンス構築に寄与する。外リンパ瘻臨床症例の検討を行う。

3. めまい治療薬の臨床評価を行なう。

B. 研究方法

1. COCH 遺伝子発現について

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。

ウィスターラットを用いて, 内耳並びに内耳以外の臓器(大脳, 小脳/脳幹, 眼, 脾臓, 肝臓, 腎臓, 肺, 胸腺, 腸)における COCH 遺伝子の発現を調べた。検討は COCH 遺伝子の発現を mRNA レベル, Cochlin の発現を蛋白アイソフォームレベルで検討した。mRNA レベルの検討には RT-PCR 法とその PCR産物を Southern blot で検出した。Cochlin アイソフォームは Cochlin アイソフォーム特異抗体を用いた Western blot 法より解析した。

2. 外リンパ瘻診断について

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, 唾液等を用いた。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症例の術中中耳

洗浄サンプル, 並びに外傷性外リンパ瘻患者を検査した. 慢性外リンパ瘻の診断治療について, 過去に報告されている症例の特徴を検討し臨床症例の治療に応用した.

3. カリジノゲナーゼのめまい及び随伴症状に対する治療効果を検討するため, 過去に多施設二重盲検試験が報告されているアデノシン三リン酸二ナトリウムを対照(実薬(陽性)同時対照 Active (positive) concurrent control)とした臨床試験を行った.

C. 研究結果

1. COCH 遺伝子発現について

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.

COCH mRNA は, 脾臓には低レベルに, 大脳, 小脳/脳幹, 眼, 肝臓, および腎臓では極微量の mRNA が検出された. 蛋白アイソフォームレベルの検討では, Cochlin の3つの isoform, p63s, p44s, p40s のセットは内耳のみに発現していた. 全長 Cochlin p63s は内耳以外の組織では発現していなかった.

2. 外リンパ瘻診断について

ヒトCSF, 血清, 唾液には, CTP蛋白は認められなかった. ヒト外リンパは全症例明らかな陽性だった. アブミ骨開窓術直前の中耳洗浄液, 慢性中耳炎, 滲出性中耳炎は全例陰性だった. 外リンパ瘻では約半数の症例に陽性反応が認められた. 慢性外リンパ瘻はメ病の重要な鑑別診断の一つであることを示した. 今回検討した症例では内耳窓閉鎖術後めまいは完全に消失し, さらに聴力も回復した.

3. カリジノゲナーゼはめまいに対してアデノシン三

リン酸二ナトリウムとほぼ同等の治療効果, 随伴症状に関してはアデノシン三リン酸二ナトリウム以上の治療効果があることが示された.

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.

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. 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.

COCH 遺伝子の発現パターンを解析した結果, p63 は内耳特異的に発現していた. このことは, 今後 DFNA9 の発症メカニズムの解明及び内耳における COCH 遺伝子の機能解析に非常に重要な所見になると考えられる. 同時に, Cochlin が「内耳特異的自己免疫疾患」である自己免疫性感音難聴の発症にかかわる自己抗原, つまり内耳特異抗原となりうることを示す知見である.

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(非症候性優勢遺伝性難聴 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. CTP 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。

メ病を特異的に診断する方法は未だ見いだされていない。特異的診断法が確立していない現状でメ病の治療法を見いだすためには、メ病と確実例と診断する際に器質的疾患が含まれていないか十分注意を払う必要がある。なかでも慢性外リンパ瘻はメ病に臨床経過、検査所見が類似しており、なおかつ的確な診断と内耳窓閉鎖術で著明な治療効果が望める疾患であることが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Pawankar R, Tomiyama S, Ikezono T, Nonaka M, Jinnouchi K, Yagi T. Interferon-gamma expression in the inner ear of rats following secondary immune reaction in the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol Suppl.* 2004;(553):6-12.
- 2) Baba S, Ikezono T, Pawankar R, Yagi T. Congenital malformations of the middle ear with an intact external ear: a review of 38 cases. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2004;66(2):74-9.
- 3) Baba S, Fukumoto A, Aoyagi M, Koizumi Y, Ikezono T, Yagi T. A comparative study on the observation of spontaneous nystagmus with Frenzel glasses and an infrared CCD camera. *J Nippon Med Sch.* 2004;71(1):25-9.
- 4) 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.
- 5) 池園哲郎：めまい・難聴遺伝子 COCH のプロ

テオーム解析 *Equilibrium Res* 2002; 61:47-53

- 6) 池園哲郎：慢性めまいの間診. *ENTONI* 2002;3:8-15.
 - 7) 池園哲郎：立ち直り反射と偏倚現象. *耳鼻咽喉科 Q&A* 六法出版, 東京 2002;10:316-317.
 - 8) 池園哲郎 メニエール病と遺伝子治療 *Equilibrium Res* 2003;62: 112-116.
 - 9) 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;p1016-1017.
 - 10) 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;408-409.
 - 11) 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;p 410-413.
 - 12) 池園哲郎 内耳プロテオーム解析と COCH 遺伝子アイソフォーム—基礎研究の臨床応用をめざして— *耳喉頭頸* 2004;76(12)838-849.
 - 13) 池園哲郎 外リンパ瘻の診断 *耳鼻咽喉科診療プラクティス* 13 耳鼻咽喉科・頭頸部外科領域の外傷と異物 岸本誠司編 文光堂, 東京 2004;p85-87
 - 14) 高橋優二, 寺門万里子, 山野辺滋晴, 池園哲郎, 山本典生, 高橋晴雄. プタ内耳抗原を用いた内耳特異的自己抗体の検索—内耳自己免疫疾患が疑われた 3 症例— *免疫アレルギー* 2004;22:P25-29
 - 15) 池園哲郎 Bell 麻痺と Ramsay Hunt 症候群 *耳喉頭頸* 2005;7729-33.
- ##### 2. 学会発表
- 1) Omori A, Ikezono T, Ichinose S et al. Identification of COCH gene product as the major component of bovine inner ear with proteomic analysis. 14th Meeting of Methods of Protein Structure Analysis Valencia, Spain, 2002, 9. 8-12
 - 2) Ikezono T, Shindo S, Lishu L et al. Proteomic analysis of the inner ear: Identification of the COCHLIN isoforms and their importance in the pathophysiology of DFNA9-induced Meniere's disease. Seattle WA, 2002.9. 26-29

- 3) Ikezono T, Shindo S, Lishu L, 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. 55th Annual Meeting of the American Academy of Neurology Honolulu, HI, 2003.3.30-4.5
- 4) Ikezono T, Shindo S, Lishu 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 (hereditary hearing loss and vestibular disorder). 23rd Barany Society Meeting Paris, 2004.7.7-9
- 5) Ikezono T, Shindo S, Li L, Hanprasertpong C, Pawankar R, Omori A, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Yagi T. Proteomic analysis identified Cochlin isoforms in the inner ear and perilymph. The Molecular Biology of Hearing and Deafness Bethesda MD, USA, 2004.9.30-10.3
- 6) 李麗淑, 池園哲郎, 新藤晋ら 遺伝性難聴DFNA9病因遺伝子 COCH のアイソフォーム 第103回 日本耳鼻咽喉科学会総会 2002.5.16-18,東京
- 7) 新藤晋, 池園哲郎, 李麗淑ら 発生過程における Cochlin の発現 ラットを用いた研究 第二報 第61回日本平衡神経科学会総会 2002.10.31-11.1, 富山
- 8) 池園哲郎 「シンポジウム」メニエール病の治療ーメニエール病と遺伝子治療 第61回日本平衡神経科学会総会 2002.10.31-11.1, 富山
- 10) 池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑ら 外リンパ特異的蛋白による外リンパ瘻診断試み 第1報 第12回日本耳科学会総会 2002.10.10-12, 東京
- 11) 池園哲郎, 大森彬, 新藤晋, 李麗淑, 八木聡明, 遺伝性難聴の研究とプロテオーム解析, 第104回日本耳鼻咽喉科学会総会 2003.5.22-24, 東京
- 12) 藤田まり, 小泉康雄, 池園哲郎, 八木聡明 めまいを主訴とした耳帯状疱疹 第158回 東京都地方部会 2003.9.20,東京
- 13) 池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑, 大森彬, 小林俊光, 八木聡明 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 2003.11.27-8. 横浜
- 14) 李麗淑, 池園哲郎, 新藤晋, 八木聡明, 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 2003.11.27-8. 横浜
- 15) 池園哲郎, 李麗淑, 新藤晋, 小泉康雄, 馬場俊吉, 斎藤明彦, 小林俊光, 八木聡明 外リンパ特異的蛋白 Cochlin-tomoprotein(CTP) の外リンパろう診断における有用性 第105回日本耳鼻咽喉科学会総会 2004.5.13-15. 広島
- 16) 池園哲郎 「教育講演」めまいと分子生物学ー基礎研究のトランスレーションー 第62回日本平衡神経科学会総会 2004.11.18-11.19, 群馬

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

幹細胞移植による内耳障害治療

分担研究者 伊藤 壽一 京都大学教授

【はじめに】

再生医学は障害を受けた器官・組織を修復し、機能も回復しようとするものであり、医学の分野では21世紀前半の最大のプロジェクトと考えられている。再生医学が既に臨床応用されている分野もある。造血幹細胞を利用した骨髄移植や角膜移植など多岐に亘る。その他、再生医学により動物実験の段階では既に作成が可能なものに、血管、心筋細胞、骨組織、軟骨組織、ドーパミン産生神経細胞など多分野に亘るものを列挙することができる。

耳鼻咽喉科・頭頸部外科学の分野での再生医学は比較的最近研究が始まったといえる。人を含め哺乳類の感覚器細胞はこれまで、一度障害を受けると再生は困難であり、機能回復はしないと考えられてきた。そのため、耳科学の分野では、中耳までの伝音難聴は治療の対象になるが、内耳の障害、特に高度感音難聴や高度内耳障害による平衡機能障害などの、感覚細胞(有毛細胞)の障害に起因する疾患は有効な治療手段が無かった。内耳の有毛細胞も一度障害を受けると再生しないと考えられ、このことが特に内耳の有毛細胞の障害に起因する事の多い感音難聴の治療の困難さの原因とされている。しかし、哺乳類の中枢神経系でも再生能力が有することが分かってきた。再生能力はあり、障害を受けても再生しようとする兆候はみられるが、再生を妨げる因子が働き、結局は再生しないと説明されている。内耳の有毛細胞も障害を受けると全く再生しないと考えられてきたが、鳥類ではある程度の再生が認められ、哺乳類でも前庭器の感覚細胞は多少再生するとの報告がみられるようになってきた。

再生医学を内耳に応用する場合、現段階ではいくつかの方法があると考えられる。1つは「自発的再生の誘導」である。この自発的再生は発生、細胞死とも関連するが、内耳再生の分子機構を解明し、それを内耳障害の治療に応用しようとする試みである。

一方著者らはこのような自発的再生を促進する研究と並行して、「細胞移植」による内耳再生を試みた。具体的には種々の幹細胞を障害を受けた内耳に移植し、有毛細胞その他の細胞の再生に応用しようと

する試みである。内耳障害を組織学的に観察すると、最も障害を受けやすいのは内耳有毛細胞である。まず、有毛細胞が障害を受けるが、初期の段階では有毛細胞以外の周囲環境(支持細胞なども含め)は比較的正常に保たれている場合が多いと考えられる。単純に考えれば、有毛細胞を再生する事ができれば、内耳機能も回復するのではないかという発想である。

細胞移植による内耳再生医療に関し、当初は有毛細胞の再生を念頭において研究を始めたが、このような方法が他の付随的な結果を生み出すことが判明した。動物の内耳に移植した、特に神経幹細胞の多くのがグリア系の細胞に分化し、神経栄養因子を産生する可能性が認められた。神経栄養因子の中には、有毛細胞の障害に対し、保護作用を有するものがあり、内耳に移植した神経幹細胞が結果的に障害を受けた有毛細胞の機能を回復させる可能性を示唆する所見が得られた。

他の成果は、蝸牛軸の方向に移植した幹細胞が神経細胞に分化したことである。現在高度難聴に対する唯一の治療法は人工内耳であるが、人工内耳手術を行ってもラセン神経節細胞が障害を受けていれば、信号を中枢に送ることはできず、また送る信号が限られ、結果的には良好な聞き取りが得られない。特に内耳奇形例でらせん神経節細胞の障害が推定される場合は人工内耳手術後の言葉の聞き取りも不良な例が多い。幹細胞移植により、らせん神経節細胞が再生し、内耳感覚細胞や脳幹の蝸牛神経核細胞に神経連絡を作る事が出来れば、人工内耳での聞き取りも飛躍的に増大すると期待される。

【内耳障害の現状】

現在我が国には補聴器も使用できない高度難聴者および聾者が数十万人存在し、また補聴器によりかろうじて聴覚がえられる難聴者を加えると、高度聴覚障害者の数は数百万人に達すると推測される。また内耳障害に起因する平衡機能障害者はその総数が把握できないほどである。高度難聴者のコミュニケーション手段は聴覚以外の方法一筆談、手話などに頼っている。このような高度難聴の原因は、内耳およ

び中枢聴覚路の老化, 騒音による障害, 抗生物質や抗癌剤などの種々の薬物による障害など多岐にわたる。何れの原因にせよ, これらの高度感音難聴に対する有効な治療手段はほとんどない。感音難聴の原因は様々であるが, 病態としては, 大部分が内耳の有毛細胞の障害である。有毛細胞の再生が可能となれば, 一度喪失した聴覚の再獲得も可能と思われる。

従来, 内耳有毛細胞を含め, 哺乳類の中樞神経系は一度障害を受けると再生は困難とされてきた。しかし, 最近では障害を受けた哺乳類の中樞神経系でも条件さえよければ再生する系もあるという報告がある。さらに胚性幹細胞や神経幹細胞の分離が可能となり, 神経移植のドナーとして利用し, 障害を受けた中樞神経系の再生を試みる報告もある。また, 各種神経成長因子を中樞神経系に投与し, 障害を受けた中樞神経系が修復されたとする報告もある。

内耳再生医療の目的は, 各種神経成長因子や幹細胞を利用して, 障害を受けた内耳有毛細胞や中樞聴覚路の再生を試みることである。

【内耳障害の病態】

内耳障害の病態を考えるに, 最も障害を受け易いのが内耳の有毛細胞であり, さらに有毛細胞からの信号を中枢に伝えるらせん神経節細胞, また内耳のイオン組成を調節するといわれる血管条細胞の障害も内耳機能低下を来す。この中でももっとも重要なものは有毛細胞であり, 障害を受けた有毛細胞が再生すれば失われた内耳機能も回復するのではないかと考えられる。

従来, 鳥類, 哺乳類では, 内耳有毛細胞が形成されるのは発生の過程に限られ, 出生後は内耳有毛細胞が一度傷害されると再生することはないとされてきた。しかし, 1980年代後半に, 鳥類では前庭の有毛細胞は常に再生をしており, 聴覚系の有毛細胞も再生されることもあることが明らかにされた。哺乳類においても, 蝸牛における有毛細胞の再生は未だに証明されていないものの, 前庭の有毛細胞は再生することが明らかにされている。

【内耳有毛細胞の自発的再生】

内耳の特に有毛細胞の自発再生を考える際, 以下機構が挙げられる。①有毛細胞の周囲にある支持細胞が細胞分裂に続く細胞増殖を起し, 有毛細胞が形成される。②支持細胞が性質を変えて感覚細胞

に分化転換する。③完全に死に至っていない有毛細胞が自己修復する。以上の3機構である。各国の内耳再生を研究する施設の多くはこの自発的再生を促進しようとする研究を行っている。

鳥類を用いた実験では, 有毛細胞の再生の過程でDNAの複製が支持細胞に認められることから, 支持細胞あるいはその中の一部の細胞の非対称的な有糸分裂により有毛細胞が再生するとされていた。しかし, 哺乳類においては, 障害後の有毛細胞の再生の過程でDNAの複製を確認できる細胞が認められるものの, その数は非常に少なく有毛細胞の再生を担うほどではないと考えられている。

有糸分裂を介さない内耳有毛細胞の再生の機構のひとつとして, 支持細胞が直接有毛細胞に変わる分化転換が, 両生類, 鳥類, 哺乳類においていわれている。その根拠は形態学的なもので, 上皮の基底面から頂上面にいたるまで細胞体が存在する支持細胞の特徴と, 微絨毛を有するという未熟な有毛細胞の特徴を兼ね備えた細胞が観察されるというものである。分化転換は, 内耳再生における利点として有糸分裂によるものと比較して短期間での再生が可能である点が考えられている。

これに対し, 内耳障害後の哺乳類における有毛細胞の再生を担っているのは完全死に至っていない有毛細胞による自己修復であるという考えがある。自発的な内耳有毛細胞の再生を誘導する因子についての研究は, 成長因子やホルモンなどの細胞外から作用を及ぼす外因性の物質が中心であったが, 分子生物学の発展や様々な遺伝子の発見により, 内耳有毛細胞再生を促す細胞内のメカニズムや内耳感覚上皮細胞の動態が解明されようとしている。さらなる解析が進めば, 従来不可能とされていた内耳有毛細胞再生の誘導を促す手法の発見・開発につながると思われる。

【細胞移植による内耳再生】

内耳有毛細胞の再生を考えた場合, 自発再生を促すことも1つの方法であるが, 実際にはまだ困難な面が多い。そこで著者らは細胞移植の方法を用い, 内耳再生を試みた。内耳障害に対し, 細胞移植による治療を目指す際, 克服しなくてはいけないいくつかの課題がある。最大の課題は移植材料の開発である。移植材料には幹細胞を利用することを考えているが, 幹細胞にもいくつかの種類・段階がある。どの幹細胞を用いるべきなのかが問題となる。移植細胞の候補

にあがるのは、胚性幹細胞(ES 細胞)、神経幹細胞、内耳幹細胞、間葉系幹細胞である。ES 細胞は全ての組織・器官の元になる細胞であり、全能細胞ともいわれる。ES 細胞から神経細胞に誘導するおおよその方法が確立されているが、内耳有毛細胞への誘導に関しては全くまだ研究がなされていない。ES 細胞を内耳への移植材料として用いて、果たして内耳の環境の中で分化の方向に向かうかは疑問視される。内耳が外胚葉由来であることを考えると、ES 細胞を外胚葉方向に誘導した細胞を使用するのも1つの方法である。

神経幹細胞は既に実験的に内耳で生着し、一部内耳有毛細胞に分化する事が確かめられており¹⁰⁾、今後も移植材料としての可能性は高い。

これらの幹細胞に比べ、内耳幹細胞が実際に存在し、分離できれば内耳感覚細胞への分化という意味では最も期待が持たれるものである。著者らはラット胎児の耳の原器である耳胞から内耳前駆細胞と考えるものを分離培養する事に成功した¹¹⁾。この内耳前駆細胞の内耳有毛細胞への分化についても検討する価値がある。以上の幹細胞は何れも内耳への細胞移植の有力なドナー候補となりうるが、ES 細胞を使用するにせよ、胎児由来の細胞を使用するにせよ倫理的問題を解決しなくてはならない。このような幹細胞に比べ、自己由来の間葉系幹細胞は倫理的な少ない。間葉系幹細胞は骨髄から採取し、自己のものを利用する事が可能であるからである。間葉系幹細胞が内耳有毛細胞に誘導できれば、比較的近い将来の臨床応用の可能性も考えられる。これらの内耳への細胞移植概念図を図3に示す。以下に各幹細胞を用いた内耳細胞移植研究の概要または結果を示す。

1) 胚性幹細胞

胚性幹細胞(ES 細胞) ES 細胞は初期胚中の全能性幹細胞と同様に個体を構成するすべての細胞に分化する能力を保持し、無制限に増やすことが出来る。

ヒト ES 細胞に対する期待は大きいですが、臨床応用を考えた時には、第一に第 3 者の細胞であるから免疫抑制剤が必要、第 2 に奇形腫の可能性、第 3 に発生早期の細胞は得やすいが発生後期の細胞を得るのが難しいなどの問題がある。技術的な問題以外に倫理面の問題が大きく、特に人の場合、どの段階から生命を持った人間として扱うべきか、ES 細胞

樹立に必要な胚をどのようにして入手するか、遺伝子操作を行ってよいのか、など、議論の対象となる点が多い。

2) ES 誘導細胞

ES 細胞は生体のすべての細胞に分化する能力を持つ細胞であるが、ある細胞への分化を選択的に誘導したり、選別したりする方法はわずかな細胞種でしか知られていない。内耳有毛細胞もちろんその誘導方法は全く明らかになっていないが、蝸牛管が皮膚外胚葉の中に形成される耳プラコードに由来することを考えると、外胚葉への誘導を ES 細胞から内耳有毛細胞への誘導の第 1 段階と考えるのが妥当である。

ES 細胞の分化誘導は胚葉体を経由した誘導する方法と、経由しないで間質細胞と共培養して誘導する方法に分けられる。ES 細胞を間質系細胞株上(PA6)で培養することで ES 細胞から胚葉体を経ず、直接皮膚外胚葉の細胞を誘導することが可能である¹²⁾。この SDIA 法と呼ばれる方法は、ラット胎児の頭蓋骨から得られた細胞(PA6)と ES 細胞の共培養によって効率よく神経分化を誘導できる方法で、マウスだけでなく、サル ES 細胞でも同じ方法が適応できる。また、この培養液中に BMP-4 を添加するだけで、皮膚外胚葉へも誘導できる。このことから、SDIA 法で誘導された ES 細胞は、ある時期には皮膚・神経の共通の祖先である未分化外胚葉に相当する分化状態を経ていることが予想される。著者らは SDIA 法によって外胚葉方向に誘導された ES 細胞をマウスの内耳に移植したところ、らせん神経節細胞を再生することが可能となった。

3) 神経幹細胞

著者らは神経幹細胞の内耳への移植実験を行った¹⁰⁾。新生ラット(生後 2-3 日)の内耳に海馬由来の神経幹細胞を移植し、投与 2-4 週間後の移植した細胞の様子を観察した。その結果、蝸牛の鼓室階、前庭階、蝸牛管の内部、管腔壁に移植細胞が一塊となって見出され、神経幹細胞が移植後数週間たっても生着しつづけることがわかった。また一部に神経幹細胞が有毛細胞上に生着したり、蝸牛コルチ器内に侵入して一部有毛細胞に置き換わっているのではないかという所見も見られた。このような神経幹細胞移植は内耳以外にも脳、網膜などですでに試みられているが、脳に移植において、適度に傷害を加えた場

合が最も神経への分化の効率が良かったことが報告されており、また網膜への移植においても無処置で移植を行った場合よりもあらかじめ網膜に障害を与えておいた方が移植細胞の生着の効率が良いことが報告されている(13)。障害された組織の再生を考える場合これはうってつけの話のように思われるが、そこで我々は、アミドグリコシド系抗生物質を用いてあらかじめマウスに内耳障害を与え、障害された内耳への神経幹細胞の移植を行い移植細胞の運命を追った。

移植後 7 日目では移植細胞の大部分は内リンパ腔、外リンパ腔内に集塊をなして存在し、一部は単独で存在していた。移植後 14 日、25 日目には移植細胞は外リンパ腔、内リンパ腔の全体にわたり内側壁に沿う形で存在していた。さらに一部の細胞は蝸牛軸の内部にも存在していた。前庭、蝸牛に分けて観察してみると、前庭では大部分の移植細胞が前庭感覚上皮の上または内部に存在していた。細胞骨格構成蛋白である F アクチンのマーカーであるファロイジンで染色すると卵形囊上皮に存在する移植細胞の大部分は F アクチンの蜂巢状の構造に入り込む形で存在しており、支持細胞層のレベルに入り込んで生存していることが示唆された(14)。蝸牛では大部分の細胞は前庭階、鼓室階の内腔側に添う形で存在していたが、一部の細胞はコルチ器に存在しており、また、鼓室階からコルチ器の内部まで移植細胞が連なっている像も観察され、鼓室階からコルチ器の内部に移動していることが推察された。

さらにこれらの移植細胞がどのように分化しているのか免疫組織化学的手法を用いて解析した。その結果、移植後 14 日あるいは 25 日の時点でグリア細胞のマーカーである GFAP に陽性を示す細胞が移植細胞全体の 90%と大部分を占めていた。一方、神経細胞のマーカーとされる MAP2 に陽性を示す細胞は約 10%と少数であり、移植細胞のほとんどがグリア細胞に分化していたが、

他方、神経幹細胞のマーカーであるネスチンに陽性を示す細胞が移植後 25 日の時点においても観察された。これらのネスチン陽性細胞は集塊をなして存在していた。また、前庭の感覚上皮層内部に生着している移植細胞の一部に内耳有毛細胞のマーカーである Myosin VIIa に陽性を示す細胞が移植後 14 日、25 日の時点で観察され、有毛細胞への分化が疑われた。また外リンパ腔内に存在している細胞でミオシン VIIa に陽性を示す細胞は認めなかつ

た。

今回の移植実験の結果、神経幹細胞は内耳において少なくとも 25 日間は生存しうること、また腫瘍を作ることなしに感覚細胞層を含む上皮内に入り込んで生存しうる事が確認された。さらに数は限られていたものの、感覚上皮内に入り込んでいた移植細胞の一部は有毛細胞のマーカーであるミオシン VIIa に陽性を示し、有毛細胞へ分化している可能性が伺われた。

一方、神経幹細胞の移植後の分化を見てみると、外リンパ腔では移植細胞の大部分がグリア細胞に分化しており、神経細胞のマーカーに陽性を示したものは一部であったのに対し、内耳有毛細胞のマーカーに陽性を示した移植細胞はすべて内リンパ腔の感覚細胞層に存在している細胞であり、外リンパ腔に生存している移植細胞で陽性を示す細胞は見られなかった。移植細胞の周囲の環境が分化の方向を大きく決定付けていることが示唆される。

有毛細胞の領域に生存していた移植細胞は有毛細胞のマーカーに陽性を示し、有毛細胞へ分化している可能性が疑われた。このことから将来への内耳有毛細胞の再生医療への応用を考えるにあたり、神経幹細胞は再生医療に応用できるポテンシャルを有していることが示唆される。しかしながら、現時点ではミオシン VIIa に陽性を示す細胞は限られており、効率よく有毛細胞へ分化させることが今度の課題である。

4) 間葉系幹細胞

骨髄には造血幹細胞が存在し、赤血球や白血球などすべての血球細胞に分化することが従来より知られているが、骨髄にはこの他に骨髄間質細胞と呼ばれる付着系の細胞があり、その中に間葉系幹細胞が存在することが明らかになっている。この間葉系幹細胞は骨、軟骨、脂肪細胞、筋肉など中胚葉系の細胞に分化しうる事が知られていたが、近年この間葉系幹細胞が中胚葉系だけでなく、神経細胞、肝細胞など他の胚葉系の細胞にも分化しうる事が報告された。再生移植医療を考えるに当たり、ドナー細胞をどのように供給するかという問題が常に存在しているが、間葉系幹細胞は患者本人の骨髄から採取できることから再生医療の実用化に向けた細胞の供給源として注目を集めている。

5) 内耳感覚器前駆細胞

内耳感覚器を構成する有毛細胞・支持細胞・蝸牛神経節神経細胞はいずれも胎生期の内耳原基耳胞から発生するが、その3種類の細胞の *in vivo* で の発生系譜は未だ不明な部分が多い。レトロウイルスを用いた細胞トレース法やレーザーを用いた有毛細胞の再生実験から有毛細胞と支持細胞が共通の前駆細胞から発生することが明らかにされているのみであり、胎生幹細胞や神経幹細胞等のような多能性を持つ細胞の存在が生体内で存在するか否かは未だに明らかにされていない。しかしながら、成長因子を添加した培地を用いた分散培養系の実験では最終分裂後の内耳感覚上皮から不動毛様の構造を持つ有毛細胞タイプの細胞に分化する細胞群が、不死化遺伝子を用いた分散培養系では有毛細胞または支持細胞、神経細胞、グリアのマーカー蛋白を発現する細胞群が胎生期のみならず、成熟した内耳感覚上皮からも同定されている。これらの培養細胞を用いた研究から、胎生初期の感覚上皮内には有毛細胞や支持細胞、神経細胞、グリアの共通の前駆細胞が存在する可能性が示唆されていた。

著者らは細胞移植による内耳再生の可能性を探るため、胎生12日ラット内耳から不死化遺伝子を用いることなく培養細胞系を樹立した。この時期の内耳では蝸牛の形成が始まっておらず、有毛細胞や支持細胞に将来分化していく未分化な細胞が豊富に存在すると考えられている。その細胞群から樹立した、たった1つの細胞由来の細胞株1005は旺盛な増殖を示している培養状態では神経幹細胞のマーカー蛋白であるネスチンを高率に発現するが、増殖がとまり、分化傾向になる培養状態では有毛細胞(ミオシンVI, VIIa)、支持細胞(サイトケラチン, p27Kip1, Hes1)、神経細胞(ニューロフィラメント200, MAP1)、グリア(A2B5, GFAP)のマーカー蛋白を発現する細胞が出現した。この結果から細胞株1005は多能性を持つ細胞すなわち、有毛細胞、支持細胞、神経細胞、グリアに分化する能力を持つ細胞であった事が示され、内耳感覚器前駆細胞の候補細胞と考えられる¹¹⁾。

我々はこの内耳前駆細胞を障害を与えたラットの内耳に移植したところ、その細胞は内、外有毛細胞の層で生着した。しかしながらこの細胞株1005が移植先の生体内で多能性を発揮できるか否か、また、正常の内耳発達過程においてこのような性質を持つ細胞がその多能性を発揮しているか否かは今後の研究成果を待つ必要がある。

【内耳再生医療支援技術】

1) 内耳への新しい薬物投与方法

再生医療の目的は、障害された生体組織の再生あるいは代替を行うことである。再生医療が成り立つには、①障害を受けた組織(細胞)に代わりうる「細胞」を供給すること。②その細胞が生着するための適切な環境(「足場」)を提供すること。③「細胞」、「足場」が効率よく機能するための「環境因子」を供給すること。この3つが重要な要素となる。細胞に関しては近年特に発展に著しい「幹細胞」技術が応用されている。内耳再生医療を実現に近づけるためには、上記の幹細胞移植技術は有効な手段と考えられる。しかし、いかに幹細胞医学が進歩しても細胞が活動する周囲環境が適切に機能しないと組織の再生は誘導されない。

組織(臓器)によっては適切な足場を供給するだけで再生が誘導される場合もある。耳鼻科領域で、単純な鼓膜穿孔の場合、コラーゲン膜、ベスキチン膜などを足場として置くだけで鼓膜が再生されるのも、この考え方を応用したものである。しかし、組織の再生能力が低い場合には、細胞を提供し、足場を作るだけでは組織再生は期待できない場合もある。そこで必要になるのが「環境因子」である。この「環境因子」の1種と考えられ再生医療で対象となるものに、細胞の増殖・分化促進作用をもつ細胞成長因子(growth factor)(細胞増殖因子)などの物質があげられる。細胞成長因子は分子生物学や細胞生物学などの進歩にともなって、その作用メカニズムが明らかになるとともに、遺伝子操作により大量生産が可能となっている。細胞の増殖や分化、形態形成などに働くこれらの因子を利用すれば組織の再生促進が期待できる。

2) 再生を促進する物質とその投与方法

内耳に関してもこれまでいくつかの物質が感覚細胞保護、または再生に有効であると報告されている。しかし、細胞成長因子は一般にはタンパクであり、生体内では非常に不安定で、生体に投与しても直ぐ代謝され、期待する組織再生効果は得られないことが多い。またこれらの物質の投与方法として、例えば全身投与する場合は内耳に作用させるためには大量頻回投与しか方法が無く、薬物が正常細胞にも高濃度で作用することが考えられ、副作用の原因となる可能性がある。理想的には必要な物質を必要な部位に、

必要な量だけ、適切な期間投与することである。物質の濃度を、必要な場所で必要な期間にわたって有効値に保つドラッグデリバリーシステム(DDS)の応用が期待される。

3) 薬物徐放化技術と内耳再生医療

内耳など全身的な薬物投与効果の少ない部位では、局所にしかも薬物を少しずつ徐放できる技術が必要である。特に内耳有毛細胞の発達・再生に役立つと考えられている細胞成長因子は現在ではまだ入手が困難な状況にあり、できる限り少量で最大限の効果が期待できる投与方法の開発が望まれる。これらの薬物の投与方法の可能性を以下に示す。

① 生体吸収性ゼラチンハイドロゲルを用いた薬物の徐放

薬物の徐放に、生体吸収性ハイドロゲル(biodegradable hydrogel)を徐放キャリアーとして用いる方法が試みられている¹⁵⁾。このハイドロゲルは徐放したい薬物(主にたんぱく質である)に対して刺激が少なく、安全性が確立されているため、徐放キャリアーとして有用である。薬物を効果的に局所に投与するためには少なくとも数日間から数週間の期間で徐放するよう操作することが必要である。また徐放キャリアーが生体内に残存することは好ましくなく、最終的には生体内で吸収されることが要求される。徐放期間の調節に関しては、徐放キャリアーであるハイドロゲルと薬物の間に生じる分子間相互作用力を利用されている。つまり生体内で薬物がハイドロゲルとの分子間相互作用により一定の期間局所に留まり、ハイドロゲルに分解酵素が作用することによりそれと同時に薬物が徐々に放出されるしくみである²⁾。このハイドロゲルには生体内での安全性と生体内での吸収性、さらに徐放したい薬物との分子間親和性が要求される。これらの要望を満たす材料として、コラーゲン、ゼラチン、ヒアルロン酸、アルギン酸などがあり、それら単独またはいくつかの物質の組み合わせで架橋を作製し徐放キャリアーとして用いる。

② 徐放性ゼラチンハイドロゲルを用いた内耳への細胞成長因子の投与

内耳へ薬物を徐放する研究として、BDNF(brain-derived neurotrophic factor)を組み込んだハイドロゲルをモルモットの正円窓に留置した。留置後3日後に蝸牛より外リンパ液を採取し、BDNF

が内耳リンパ液中に放出されているかどうかを確かめた。コントロールとして、BDNFを含まないハイドロゲルのみの群、BDNFを直接正円窓から微小針で投与した動物と比較検討した。その結果、ハイドロゲルにBDNFを組み込んだ場合、一定の濃度のBDNFが外リンパ液から検出された。一方BDNFを含まないハイドロゲルの場合は当然のことであるが、外リンパ液中にはBDNFは検出されず、また急速投与した場合も3日後にはほとんどBDNFは検出されず、代謝されたか脳脊髄液に流失したなどの可能性が考えられた。以上の研究結果により徐放性のハイドロゲルに組み込まれたBDNFは徐々に内耳に放出され、一定の期間内耳である濃度を保ちながら留まることが確認された。この徐放性ゼラチンハイドロゲル含BDNFの内耳に対する保護作用も、内耳の有毛細胞、神経細胞の数をカウントすることにより確かめられ、内耳細胞の保護、再生に有用であることが推測された。

③ 今後の展開

内耳の特に有毛細胞が傷害されるとそれは回復不能であると考えられてきた。しかし、最近では傷害を受けた有毛細胞を回復させる、また再生を促す物質が色々報告されるようになってきた。一方、内耳という特殊な解剖学的構造、特殊なバリアー(blood cochlear barrier)などの存在により内耳に薬物を局所投与することは難しいとされてきた。また仮にうまく投与されても脳脊髄液方向に流出してしまうなど、効果を発揮するには至らない結果が報告されている。今回紹介した徐放システム、特に徐放性ハイドロゲルを用いた薬物投与方法、さらにはナノテクノロジーを利用したナノカプセルの利用、薬物徐放の可能性のある細胞の移植などは内耳障害への新しい治療方法への可能性を示すものとして期待される。

【論文発表】

- 1) Endo T, Nakagawa T, Iguchi F, Kita T, Okano T, Sha SH, Schacht J, Shiga A, Kim TS, Ito J. Elevation of superoxide dismutase increases acoustic trauma from noise exposure. *Free Rad Biol Med* 2005; 38: 492-498.
- 2) Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Endo T, Shiga A, Iguchi F, Lee SH, Ito J. Role of reactive radicals in degeneration of the

- auditory system of mice following cisplatin treatment. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 1131-1135.
- 3) Lee JE, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Shiga A, Lee SH, Ito J. Mechanisms of apoptosis induced by cisplatin in marginal cells in mouse stria vascularis. *ORL* 2004;66:111-8.
 - 4) Kitajiri S, Fukumoto K, Hata M, Sasaki H, Katsuno T, Nakagawa T, Ito J, Tsukita S, Tsukita S. Radixin deficiency causes deafness associated with progressive degeneration of cochlear stereocilia. *J Cell Biol.* 2004;166:559-5570.
 - 5) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, Kim TS, Hiratsuka Y, Tamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, Ito J. Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2004; 15: 1-4.
 - 6) Kojima K, Takebayashi S, Nakagawa T, Ito J: Expression of nestin epitopes in the developing rat cochlea sensory epithelia. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004 551:14-17
 - 7) Takebayashi S, Nakagawa T, Kojima K, Kim TS, Kita T, Dong Y, Endo T, Iguchi F, Naito Y, Omori K, Ito J: Expression of β -catenin in developing auditory epithelia of mice. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:18-21
 - 8) Kim TS, Nakagawa T, Lee JE, Fujino K, Iguchi F, Endo T, Naito Y, Omori K, Lefebvre PP, Ito J :Induction of cell proliferation and catenin β -expression in rat utricles in vitro. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:22-25
 - 9) Kojima K, Tamura S, Nishida A, Ito J: Generation of inner ear hair cell immunophenotypes from neurospheres obtained from fetal rat central nervous system in vitro. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:26-30
 - 10) Fujino K, Kim TS, Nishida A, Nakagawa T, Omori K, Naito Y, Ito J: Transplantation of neural stem cells into explants of rat inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:31-33
 - 11) Kim TS, Kojima K, Nishida A, Tashiro K, Lee JE, Fujino K, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Naito Y, Omori K, Lefebvre PP, Ito J: Expression of calretinin by fetal otocyst cells after transplantation into damaged rat utricle explants. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:34-38
 - 12) Taura A, Ito J, Ohmori H: A fine method to evaluate the physiological function of vestibular hair cells. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:39-42
 - 13) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Endo T, Kim TS, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Surgical techniques for cell transplantation into the mouse cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004; 551:43-47
 - 14) Sakamoto T, Nakagawa T, Endo T, Kim TS, Iguchi F, Naito Y, Sasai Y, Ito J: Fates of mouse ES cells transplanted into inner ears of adult mice and embryonic chickens. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:48-52
 - 15) Kojima K, Murata M, Nishio T, Kawaguchi S, Ito J: Survival of fetal rat otocyst cells grafted into the damaged inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:53-55
 - 16) Morita T, Naito Y, Tsuji J, Nakamura T, Yamaguchi S, Ito J: The Relationship between cochlear implant outcome and a diameter of cochlear nerve depicted in MRI. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551: 56-59
 - 17) Morita T, Naito Y, Nakamura T, Yamaguchi S, Tsuji J, Ito J: Chronological changes of stimulation levels in prelingually deafened children with cochlear implant. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:60-64
 - 18) Tamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Tateya I, Endo T, Kim TS, Dong Y, Kita T, Kojima K, Naito Y, Omori K, Ito J: Transplantation of neural stem cells into the modiolus of mouse cochleae injured by cisplatin. *Acta*

- Otolaryngol (Stockh) Suppl 2004;551:65-68
- 19) Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Kita T, Murai N, Naito Y, Lee SH, Ito J: Signaling pathway for apoptosis of vestibular hair cells of mice due to aminoglycosides. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:69-74
 - 20) Magrúfov A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Yamashita M, Shimizu Y, Ito J: Tissue engineering for the regeneration of the mastoid air cells: a preliminary in vitro study. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551:75-79
 - 21) Kanemaru S, Nakamura T, Omori K, Magrúfov A, Yamashita M, Shimizu Y, Takahashi H, Ito J: Regeneration of the mastoid air cells in clinical applications. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 2004;551: 80-84
 - 22) Morita T, Naito Y, Nagamine T, Fujiki N, Shibasaki H, Ito J: Enhanced activation of the auditory cortex in patients with inner-ear hearing impairment: a magnetoencephalographic study. *Clin Neurophysiol* 2003; 114:851-9
 - 23) Tateya I, Naito Y, Hirano S, Kojima H, Inoue M, Kaneko K, Toyoda H, Ueno M, Ishizu K, Ito J: Inner ear hearing loss modulates ipsilateral temporal lobe activation by monaural speech stimuli. *Neuroreport* 2003; 15:14:763-7
 - 24) Naito Y, Tateya I, Hirano S, Inoue M, Funabiki K, Toyoda H, Ueno M, Ishizu K, Nagahama Y, Fukuyama H, Ito J: Cortical correlates of vestibulo-ocular reflex modulation: a PET study. *Brain* 2003; 126:1562-78
 - 25) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, Endo T, Yamada S, Kageyama R, Naito Y, Ito J: Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003;15:1677-81
 - 26) Murai N, Tsuji J, Ito J, Mishina M, Hirano T: Vestibular compensation in glutamate receptor delta-2 subunit knockout mice: dynamic property of vestibulo-ocular reflex. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;261:82-86
 - 27) Lee JE, Nakagawa T, Kim TS, Iguchi F, Endo T, Dong Y, Yuki K, Naito Y, Lee SH, Ito J: A novel model for rapid induction of apoptosis in spiral ganglions of mice. *Laryngoscope* 2003;113:6:994-9
 - 28) Morita T, Naito Y, Hirai T, Yamaguchi S, Ito J: The Relationship between intraoperative ECAP threshold and postoperative behavioral levels: Difference between postlingually deafened adults and prelingually deafened pediatric cochlear implant users. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260: 67-72
 - 29) Iguchi F, Nakagawa T, Tateya I, Kim TS, Endo T, Taniguchi Z, Naito Y and Ito J: Trophic support of mouse inner ear by neural stem cell transplantation. *Neuro Report*. 2003;14:77-80
 - 30) Nakagawa T, Kim TS, Murai N, Endo T, Iguchi F, Tateya I, Yamamoto N, Naito Y, Ito J: A novel technique for inducing local inner ear damage. *Hear Res* 2003;176: 122-127
 - 31) Naito Y, Nakamura T, Nakagawa T, Iguchi F, Endo T, Fujino K, Kim TS, Hiratsuka Y, Tamura T, Kanemaru S, Shimizu Y, Ito J: Transplantation of bone marrow stromal cells into the cochlea of chinchillas. *Neuroreport* 2003;15:1-4
 - 32) Kitajiri S, Furuse M, Morita K, Saishin-Kiuchi Y, Kido H, Ito J, Tsukita S: Expression patterns of claudins, tight junction adhesion molecules, in the inner ear. *Hearing Reserch* 2003;187:25-34
 - 33) Funabiki K, Naito Y: Validity and limitation of detection of peripheral vestibular imbalance from analysis of manually rotated vestibulo-ocular reflex recorded in the routine vestibular clinic. *Acta Otolaryngol* 2002;122: 1: 31-36
 - 34) Kim TS, Nakagawa T, Endo T, Iguchi F, Murai N, Naito Y, Ito J: Alteration of E-cadherin and β -catenin in mouse

vestibular epithelia during induction of apoptosis. *Neurosci Lett* 2002;329: 173-176

- 35) Endo T, Nakagawa T, Lee JE, Dong Y, Kim TS, Iguchi F, Taniguchi Z, Naito Y, Ito J: Alteration in expression of p27 in auditory epithelia and neurons of mice during degeneration. *Neurosci Lett* 2002;334: 173-176

【学会発表】

- 1) Kitajiri S, Fukumoto K, Kikuchi S, Hata M, Nakagawa T, Kim TS, Sasaki H, Ito J, Tsukita S, Tsukita S: ERM proteins are directly involved in the formation of stereocilia in a complicated redundant manner. ARO 2004 The 27th Annual MidWinter Meeting. 2004/2/22~2004/2/26. Florida, Daytona Beach, USA.
- 2) Lee JE, Lee SH, Nakagawa T, Kim TS, Ito J: The mechanism of aminoglycoside ototoxicity in mouse. The 9th Korea combined otolaryngologic congress. 2003/4/25~2003/4/26. Seoul, Korea
- 3) 伊藤壽一: 内耳障害の再生医学的アプローチ. 第104回日本耳鼻咽喉科学会. 2003年5月22日~2003年5月24日. 東京.
- 4) 北尻真一郎, 伊藤壽一: ラディキシンノックアウトマウスにおける不動毛形成不全と難聴. 第104回日本耳鼻咽喉科学会. 2003年5月22日~2003年5月24日. 東京
- 5) 喜多知子, 中川隆之, Lee Ji-Eun, 金 泰秀, 井口福一郎, 遠藤 剛, 志賀 敦, 小島 憲, 内藤 泰, 伊藤壽一: シスプラチン傷害マウスにおける血管系アポトーシス関連因子の解明. 第21回頭頸部自律神経研究会. 2003年8月23日. 大阪.
- 6) 田村哲也, 中川隆之, Lee Ji-Eun, 金 泰秀, 喜多知子, 遠藤 剛, 井口福一郎, 志賀 敦, 小島 憲, 内藤 泰, 伊藤壽一: シスプラチン傷害マウス蝸牛における nitrotyrosine, hydroxynonenal の発現. 第21回頭頸部自律神経研究会. 2003年8月23日. 大阪.
- 7) 竹林慎治, 中川隆之, 小島 憲, 金 泰秀, 喜多知子, 遠藤 剛, 井口福一郎, 内藤 泰, Dong Youyi, 伊藤壽一: マウス発生期の蝸牛における細胞増殖調節因子の発現について. 第21回頭頸部自律神経研究会. 2003年8月23日. 大阪.
- 8) Endo T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Naito Y, Ito J: A new strategy of the drug delivery system to the inner ear. The 3rd International Symposium Inner Ear Pharmacology 2003/9/5. Malaga, Spain.
- 9) Kita T, Nakagawa T, Kim TS, Iwai K, Takebayashi S, Endo T, Iguchi F, Kojima K, Naito Y, Akaike A, Ito J: Effects of serofendic acid on survival of hair cells following aminoglycoside treatment. The 3rd International Symposium Inner Ear Pharmacology. 2003/9/5. Malaga, Spain.
- 10) Nakagawa T, Endo T, Iguchi F, Kita T, Tateya I, Kim TS, Tamura T, Takebayashi S, Naito Y, Tabata Y, Ito J: Novel strategies for sustained drug delivery into the inner ear. The 3rd International Symposium Inner Ear Pharmacology. 2003/9/5. Malaga, Spain.
- 11) Nakagawa T, Endo T, Iguchi F, Kita T, Tateya I, Kim TS, Tamura T, Takebayashi S, Naito Y, Tabata Y, Ito J: Novel strategies for sustained drug delivery into the inner ear. The 3rd International Symposium Inner Ear Pharmacology. 2003/9/5. Malaga, Spain.
- 12) Endo T, Nakagawa T, Kita T, Kim TS, Iguchi F, Naito Y, Tabata Y, Ito J: A novel drug delivery system into inner ear. The 40th meeting of the Inner Ear Biology Society. 2003/9/7~2003/9/10. Granada, Spain.
- 13) Ito J, Nakagawa T, Kojima K, Tateya I, Iguchi F, Endo T, Kim TS, Naito Y: Hair cell restoration by cell transplantation. The 40th meeting of the Inner Ear Biology Society. 2003/9/7~2003/9/10. Granada, Spain.
- 14) Kim TS, Nakagawa T, Kitajiri S, Iguchi F, Endo T, Takebayashi S, Tamura T, Kita T, Kojima K, Naito Y, Lee JE, Ito J: Temporal