

200834036A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

急性高度難聴に関する調査研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 小川 郁

平成 21(2009)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

急性高度難聴に関する調査研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

目 次

I. 平成 20 年度急性高度難聴に関する調査研究班班員名簿	1
II. 総括研究報告	5
	小川 郁 (慶應大)
III. 分担研究報告	
1. 遺伝性難聴例を対象としたミトコンドリア DNA 変異網羅的検出法による遺伝子解析	17
	加藤智史 (東京医科歯科大)
2. 加齢に伴う進行性感音難聴におけるミトコンドリア機能の影響	21
	山嶋達也 (東京大)
3. 本邦における USH2A の遺伝子変異解析	26
	中西 啓 (浜松医大)
4. 特発性難聴患者における遺伝的背景について	29
	塚田景大 (信州大)
5. 突発性難聴における虚血関連遺伝子 SNP の検討	32
	兵頭 純 (愛媛大)
6. 突発性難聴とメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素遺伝子多型の検討 —『老化に関する長期縦断疫学研究』より—	36
	内田育恵 (名古屋大)
7. 突発性難聴・急性低音障害型感音難聴の遺伝的背景研究のシミュレーション	39
	宇佐美真一 (信州大)
8. 変動性感音難聴を呈したクリオピリン関連症候群の一例	45
	福島邦博 (岡山大)
9. 急性難聴症例における MRI 所見の検討	48
	安井拓也 (東京大)
10. 突発性難聴患者におけるガドリニウム造影剤静注4時間後の3テスラMRI	53
	多賀谷満彦 (名古屋大)
11. 急性感音難聴における酸化ストレスの検討	55
	菊池 淳 (岩手医大)
12. 突発性難聴における酸化ストレスの検討	58
	鬼頭良輔 (信州大)
13. 選択的セロトニン再取り込み阻害薬による マウス下丘神経細胞自発発火パターンの変化	62
	小原修幸 (北海道大)

14. アポトーシス抑制蛋白 PTD-FNK の内耳取り込みと蝸牛有毛細胞障害の予防 —蛋白治療の可能性について—	66
	梶尾明憲 (東京大)
15. 蝸牛器官培養における microRNA 発現について	70
	前田幸英 (岡山大)
16. 音響外傷蝸牛に対するインターロイキン6阻害剤の効果	72
	若林健一郎 (慶應大)
17. パラフィン包埋ヒト側頭骨標本の免疫組織学的研究	75
	高橋正時 (東京医科歯科大)
18. ラット台形体におけるサリチル酸の効果—パッチクランプ法による検討	79
	藤川太郎 (東京医科歯科大)
19. 突発性難聴に対する内耳低温療法の臨床研究	82
	羽藤直人 (愛媛大)
20. 一過性虚血後の内耳障害に対する低体温の影響 —追加報告:蝸牛内の NOx 濃度について—	86
	竹田将一郎 (愛媛大)
21. 急性低音障害型感音難聴難治例に対する鼓室内ステロイド注入療法	90
	津布久崇 (北海道大)
22. 突発性難聴 gradeIV 症例に対する鼓室内ステロイド注入の治療成績	93
	上條貴裕 (北里大)
23. 突発性難聴症例の自覚症状の調査—急性期および聴力固定後の変化—	95
	佐野 肇 (北里大)
24. 海外における突発性難聴の診断基準と ALHL のオーバーラップについて	98
	水川敦裕 (岩手医大)
25. 人工内耳装用児に対する DSM-IV・IT-MAIS を用いた 注意力欠損・多動性傾向の評価	100
	橋本泰幸 (浜松医大)
26. 突発性難聴におけるバイオマーカーの検討	104
	神崎 晶 (慶應大)
27. 突発性難聴(片側聾)のハンディーキャップ調査	107
	岩崎 聡 (浜松日赤)
28. 突発性難聴患者の QOL	111
	加藤 健 (名古屋大)
29. 低音障害型感音難聴に対する単剤治療における共同研究	114
	井上泰宏 (慶應大)
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	119

I. 急性高度難聴に関する調査研究班

班員名簿

急性高度難聴に関する調査研究班

区分	氏名	所属等	職名
主任研究者	小川 郁	慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
研究分担者	喜多村 健	東京医科歯科大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	宇佐美 真一	信州大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	中島 務	名古屋大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	岡本 牧人	北里大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	暁 清文	愛媛大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	福田 諭	北海道大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	山嵜 達也	東京大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	佐藤 宏昭	岩手医科大学医学部 耳鼻咽喉科	教授
	水田 邦博	浜松医科大学 耳鼻咽喉科	准教授
研究協力者	福島 邦博	岡山大学医学部 耳鼻咽喉科	講師
	岩崎 聡	浜松赤十字病院 耳鼻咽喉科	部長
事務局	井上 泰宏	理化学研究所ゲノム科学総合研究センター	上級研究員
		慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地 TEL 03-5863-3827 FAX 03-3353-1211	
経理事務担当者	鈴木 文子	慶應義塾大学医学部研究支援センター	職員
		〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地	
		TEL 03-5363-3879 FAX 03-5363-3610	
		e-mail fumiko.suzuki@adst.keio.ac.jp	

II. 総括研究報告

平成20年度 総括研究報告
主任研究者:小川 郁 (慶應義塾大学)

研究要旨

突発性難聴の全国疫学調査は疫学調査研究班と共同で1970年代から約10年ごとに行っているが、本年度は平成21年度の疫学調査を目標に準備した。突発性難聴発症に関わるバイオマーカーとしては早期に来院した症例ほど好中球が高く初診時聴力の重症度、予後と相関した。一方、NK細胞活性は好中球数と負の相関があった。突発性難聴で酸化ストレスの異常を示した症例は多く、全症例での平均値も正常値を超えていた。抗酸化力も有意差はなかったが多くの症例で異常値を示した。突発性難聴と虚血関連遺伝子SNPタイプの出現頻度について検討したが、コントロールと比較して差を認めたものは蛋白リン酸化酵素 PRKCH であった。また、60歳以下の両側感音難聴患者のうち54%が難聴の進行を自覚しており、そのうち32%が常染色体優性遺伝または母系遺伝形式を示していた。加齢に伴う進行性感音難聴では特にミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現低下が顕著であった。突発性難聴患者の QOL についての検討では発症直後の急性期も聴力が固定した後も一般的な国民より低い傾向にあった。突発性難聴の後遺症が仕事や普段の活動をしたときに身体面に何らかの影響を与えていたことが示唆された。内耳画像診断法では血液迷路関門が障害されると、外リンパの造影が顕著となり、内リンパの検出が容易となった。今後、内耳病態の画像診断法として期待される。突発性難聴の局所療法としてステロイド鼓室内注入療法および内耳低温療法が注目される。急性低音障害型感音難聴に対するプレドニゾン、イソパイド、ATP の単剤治療については継続して検討を行うこととした。聴覚障害の病態解明のための基礎研究は不可欠であり、臨床的研究と表裏一体で進行することを目指したい。突発性難聴をはじめとする急性感音難聴の QOL について SF-36 などの調査票を用いて継続して調査することにした。高分解能3T-MRIによる内耳画像診断法の診断的有用性を報告した。急性低音障害型感音難聴における内リンパ水腫のシミュレーション解析を行ったが、更に解析精度を上げて検討する。突発性難聴および急性低音障害型感音難聴の診断基準について海外の現状を明確して検討した。

研究目的

本研究では対象疾患を1)急性高度感音難聴(突発性難聴、外リンパ瘻、ムンプス難聴、急性低音障害型感音難聴、急性音響性感音難聴)と2)進行性または慢性高度感音難聴(遺伝性難聴、特発性進行性感音難聴、加齢性感音難聴、騒音性感音難聴)の高度感音難聴として、高度感音難聴を呈する疾患の難聴

発症メカニズムを解明して、各標準的な治療方針を定めて、治療・予防法を確立することが目標である。今回は特に高度感音難聴発症に関与する遺伝子または遺伝子変異を検出し、難聴発症機構を分子細胞レベルで解明することを大きな目標の一つとする。

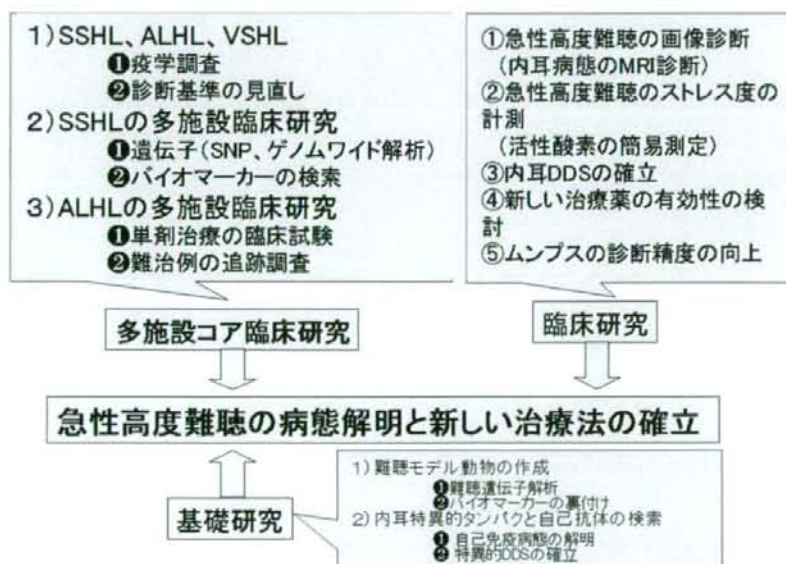
突発性難聴の発症者数は疫学調査研究班との共同調査で年間約35,000人、人口100万

人対で275人の罹患率と考えられている。急性低音障害型感音難聴も突発性難聴と同程度またはその3倍以上の罹患率と考えられており、これら罹患率の高い高度感音難聴を来す疾患の難聴発症メカニズムの解明は重要である。また、ムンプス難聴や他のウイルス性難聴ではワクチン接種による予防の可能性について検討する必要がある。外リンパ瘻も突発性難聴との鑑別上、重要な疾患であり、これらの診断および治療法の確立も待たれている。一方、遺伝性難聴や個人差の大きい加齢性難聴も遺伝子または遺伝子の変異がその発症にどのように関与するのかを明らかにすることは、その予防上きわめて重要である。

本研究の特徴は多施設での横断的研究が行えることであり、この特徴を利用して突発性難聴の疫学調査、QOLの調査、新しい治療法の確立など、国際的にも不明な事項について明らかにする。高度難聴は重篤なコミュニケーション障害を来すが、ハンディキャップが適切に克服されれば、通常の社会生活に復帰

することが可能であり、国民の健康増進という厚生労働行政上の観点からも、その病態解明および治療法・予防法の確立は重要な研究テーマのひとつである。

本研究では3年間に多施設横断的研究で各高度感音難聴を来す疾患の1)疫学調査、2)発症に関連する遺伝子または遺伝子異常の検出、3)QOLへの影響、4)発症と予後に関わるバイオマーカーの検索、5)新しい治療法としての鼓室内局所療法の有効性の検証を行い、最終的にこれらの所見から各疾患の診断基準の見直しと、診療ガイドラインの作成を目指す。一方で各施設での独創的なアプローチによる3T-MRIによる内耳画像診断法などの新しい診断法や各種実験動物モデルの検討による急性高度感音難聴の発症機序の解明と新しい治療法の確立を目指す。これらの多様なアプローチから有効な診断法、治療法の可能性が生じた場合には多施設での検証を行う。



SSHL=突発性難聴、ALHL=急性低音障害型感音難聴、VSHL=ウイルス性感音難聴

研究方法

1) 突発性難聴の病態に関する研究

急性感音難聴におけるストレスをストレス関連物質およびバイオマーカーを用いて検討した。突発性難聴患者に対して、白血球数、細胞分画、NK 細胞活性、IL-6、TNF α 、高感度 CRP (hCRP)、心理検査について治療開始1日目と治療開始後7日目を測定した。

また、突発性難聴の発症にはフリーラジカルの関与が疑われているが、今回は突発性難聴患者の末梢血液を用いて FRAS4 によって酸化ストレス・抗酸化力を測定し、突発性難聴の発症や治療効果への関与の可能性を検討した。

2) 突発性難聴、加齢性難聴の関連遺伝子に関する研究

突発性難聴の関連遺伝子の検索、および加齢性難聴などに特異的なミトコンドリア遺伝子多型をはじめとする遺伝子検索、アッシュヤー症候群の日本人における遺伝子変異を検索した。

突発性難聴に対する虚血の関与を解明するために、突発性難聴患者における17種類の虚血関連遺伝子 SNP について健常者コントロールと比較検討した。さらに虚血関連遺伝子 SNP の有無と突発性難聴の治療効果の関連性について検討した。

メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(以下 MTHFR)の C677T 遺伝子多型と、自己報告式質問票で得た突発性難聴の既往について、中高年齢の地域住民 2174 名について検討した。①突発性難聴群とそれ以外の②コントロール群で allele-specific primer/polymerase chain reaction (PCR) assay system にて検討した。

また、進行する両側性感音難聴のうち原因

不明のものには家族歴に血族結婚や難聴者が存在することが多く、遺伝的素因の関与が考えられてきたが、今回は両側感音難聴患者における進行性および遺伝的背景について検討した。

次に加齢に伴う進行性感音難聴におけるミトコンドリア機能の影響について検討した。Stereocilia で重要な働きをする cadherin タンパクをコードする遺伝子 Cdh23 に変異を持つ DB A/2J マウスを用いて蝸牛内の遺伝子発現が加齢に伴う難聴進行によりどのように変化するかを検討した。

遺伝性難聴が疑われた症例を対象にミトコンドリア DNA の代表的な 28 変異の網羅的解析を行った。ピオチン標識プライマーを用いた 28-plex PCR により、mtDNA のほぼ全領域を増幅した。次に蛍光ビーズ・アレイ PCR-Luminex®法によってミトコンドリア DNA 変異の網羅的解析を行った。

突発性難聴では先行研究で遺伝的な関連が報告されているためその遺伝的影響の強さおよび、高血圧や糖尿病など遺伝的要因+環境要因で発症することが知られている他の疾患の遺伝的影響の強さ、また一般的な薬剤の効果あるいは副作用に関する遺伝的影響の強さとのそれぞれにおいて、統計学的に意味のある正しいデータを得るために必要な、サンプル数および解析対象遺伝子数をシミュレーションした。来年度以降の多施設共同研究を行うための患者選定基準(案)の作成を行い、選定基準に合致した症例の DNA の収集および候補遺伝子の解析を開始した。

アッシュヤー症候群は、感音難聴に網膜色素変性症を合併する常染色体劣性遺伝性疾患である。アッシュヤー症候群の早期診断に有効

な遺伝子診断システムの構築を目指し、本邦におけるアッシャー症候群患者の遺伝子解析を行った。最も頻度の高いタイプ2の患者を対象として、タイプ 2A の原因遺伝子である *USH2A* の遺伝子解析を行った。

3) 突発性難聴の QOL に関する研究

突発性難聴は一側性のことが多く、例え治療しなくても重大なコミュニケーション障害をもたらすことがないため、患者の症状や QOL について注目されることは少なかった。今回、と突発性難聴症例の QOL について SF-36 を用いて検討した。治療開始前および聴力固定期の QOL の変化、および発症後 30 日以前の急性期群、31 日以降の聴力固定期群での QOL の変化を比較した。また、QOL に関連する突発性難聴症例の自覚症状を検討するために自覚症状についてアンケート調査を行った。耳症状としては「耳鳴」「周囲の音のひびき」「耳の圧迫感」「聞こえづらさ」について質問しその他は自由記載とした。

4) 内耳画像診断法に関する研究

内耳性難聴疾患の画像診断法を確立するために 3 テスラ耳 MRI による造影検査について検討した。3 テスラ耳 MRI 単純撮影後にオムニスキャンを静注し 10 分以内に撮影した。2 日後に再度プロハンスを静注後 4 時間に同じ条件で MRI を撮影した。

5) 突発性難聴の局所療法、内耳低温療法に関する検討

① 突発性難聴の局所療法

突発性難聴 grade IV の症例でステロイドの注射及び内服による全身投与と ATP 製剤、Vit. B 製剤の内服、PGE 製剤の点滴の既存治療にデキサメタゾン鼓室内注入療法の併用効果を検討した。また、同時期に初期治療開始後 1 ヶ月の時点で改善の得られなかったものの鼓室

内ステロイド注入療法を施行せずに経過を追えた対照群と比較検討した。

② 突発性難聴に対する内耳低温療法

突発性難聴のモデル動物である一過性内耳虚血モデルを用いた低体温療法の効果を検討から、低体温療法は突発性難聴に代表される急性内耳障害の治療に有効と考えられ、その効果を臨床的に確認するため、急性期の突発性難聴患者を対象とした検証を行った。突発性難聴患者を対象として、従来の治療法に 15°C に設定した水枕を患側乳突部から頸部に当てる内耳低温療法を加えて治療効果を検討した。

6) 急性低音障害型感音難聴に対する単剤治療における共同研究

急性低音障害型感音難聴に対する単剤治療の多施設臨床試験を継続した。プレドニゾロンを 3 施設、イソパイドを 4 施設、ATP を 3 施設にそれぞれ振り分けた。

7) 聴覚障害の病態解明のための基礎研究

① 蝸牛器官培養における microRNA 発現

蝸牛器官培養において遺伝子発現を検討する系が確立されれば、蝸牛において様々な病態の解明および薬剤の効果などを検討するのに有用なツールになる。BALB/c マウス蝸牛器官培養内 microRNA 発現を microRNA アレイを用いて生体内での発現と比較検討し、これを指標として蝸牛器官培養系の妥当性を検討した。

② 音響外傷蝸牛に対するインターロイキン 6 阻害剤の効果

実験的音響外傷に対する IL-6 阻害剤の効果を検討した。

③ 内耳病変のパラフィン包埋法のヒト側頭骨分子病理学的研究

内耳病変の病理組織学的評価は、硬組織

内の膜様物の中に高度に分化した機能をもつ複数の組織が存在するという解剖学的特殊性により、マクロでの形態を温存しながら大きな切片作製が可能であるセロイジン包埋法を用いることが一般的であったこの方法はコストや時間的ならびに人的資源を要し、また、内耳に発現するタンパクの免疫染色等の分子生物学的研究をする上では限界があるため、パラフィン包埋法の有用性を検討した。免疫染色として抗 Neurofilament 抗体、抗 Prestin 抗体を用いた。

④ラット台形体におけるサリチル酸の効果

サリチル酸はヒトおよび実験動物において、可逆性の難聴と耳鳴を生じさせるが、比較的高濃度(10mM)のサリチル酸が中枢聴覚路に与える効果を検討した。ウイスターラットの脳幹スライスで台形体内側核のニューロンを同定し、台形体内側核のグリシン性 mIPSCs の導出を行った。

⑤選択的セロトニン再取り込み阻害薬によるマウス下丘神経細胞自発発火パターンの変化

慢性聴覚障害による耳鳴に対して用いられる選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)の下丘神経細胞に対する薬理作用を検討した。中脳下丘を含む脳幹スライスを作成し、下丘中心核神経細胞からパッチクランプ法を用い細胞内記録を行った。

⑥一過性虚血後の内耳障害に対する低体温の影響

一過性内耳虚血に対する低体温療法の効果を明らかにするために、 $32 \pm 1^\circ\text{C}$ の低体温での窒素酸化物(NO_x)の蝸牛内濃度の変化を測定した。蝸牛外リンパ液中の NO^2 、 NO^3 を微小透析膜を用いた酸化窒素分析システムで測定した。

研究結果

1) 突発性難聴の病態に関する研究

突発性難聴発症に関わるバイオマーカーとしては早期に来院した症例ほど好中球が高く初診時聴力の重症度、予後と相関した。初診時、好中球が高値だった症例も、発症後2週間以上経過すると低下し、好中球の上昇が発症と密接に関わる現象である可能性がある。一方、NK 細胞活性は好中球数と負の相関があった。好中球は高かったが、NK 細胞活性は早く発症から早期に来院した人ほど低値であり、NK 細胞活性は初診時聴力の重症度と相関していた。

突発性難聴で酸化ストレスの異常を示した症例は多く、全症例での平均値も正常値を超えていた。抗酸化力も有意差はなかったが多くの症例で異常値を示した。以上より突発性難聴の患者では発症期に酸化ストレス度が高値となる傾向が認められた。特に治療効果判定で著明回復以上を示した症例は治療前の酸化ストレス度が高い症例で多くみられた。

2) 突発性難聴、加齢性難聴の関連遺伝子に関する研究

17種類の虚血関連遺伝子 SNP タイプの出現頻度でコントロールと比較して差を認めたものは蛋白リン酸化酵素 PRKCH であった。この SNP にはアデニン(A)とグアニン(G)という塩基があり、人には A/A、A/G、G/G の3タイプがあるが、突発性難聴患者は健常者に比べ、A 塩基をもつ頻度が約2倍であった。A 塩基の有無では治療効果に差は認められなかった。

多重ロジスティック回帰分析にて解析すると、変異アレルが1つ増えるごとに、突発性難聴のリスクが約1.7倍増加するという結果が得られ、この関係は、心循環器系疾患既往歴や喫煙

歴、糖尿病、BMIを調整してもなお有意であった。MTHFRのC677T多型の変異アレルは、突発性難聴と関連がある可能性が考えられた。

60歳以下の両側感音難聴患者のうち54%が難聴の進行を自覚しており、そのうち32%が常染色体優性遺伝または母系遺伝形式を示していた。難聴の発症年齢で検討すると、難聴の発症が10歳以上の症例では、その80%が進行を自覚していた。常染色体劣性遺伝/孤発例、常染色体優性遺伝/母系遺伝で進行性の有無を検討した場合、前者では47%に難聴の進行を自覚したのに対して、後者では68%と高率に進行性を自覚しており常染色体優性遺伝形式または母系遺伝形式をとる難聴患者では進行する可能性が高い可能性が示唆された。

加齢に伴う進行性感音難聴では特にミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現低下が顕著であった。

ミトコンドリア遺伝子変異難聴をきたすミトコンドリアDNA変異としては1555A>G変異や3243A>G変異などが代表的なものであるが、今回の主要28種類の変異解析においてはそれぞれ全体の2.9%、2.7%で検出された。このうちMELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes)の病変変異として知られる3243A>G変異は10人中7人中7人全例でMELASを疑わせる所見は認めなかった。したがって、確定診断に至っていない難聴患者の中には3243A>G変異陽性例が潜在している可能性が示唆された。

アッシャー症候群タイプ2におけるUSH2Aの遺伝子解析では10個の疾患原因変異のうち、9個は新規の遺伝子変異であった。C212

は他の患者に比べ難聴が軽度であった。この患者は、2つのミスセンス変異によりアッシャー症候群を発症していたのに対し、他の患者では、ミスセンス変異+ミスセンス変異以外の変異、またはミスセンス変異以外の変異の組み合わせにより、アッシャー症候群を発症していた。

3) 突発性難聴のQOLに関する研究

身体的QOLと心理的QOLのSF-36値を求めたところ、肉体的QOLより心理的QOLの方が悪い傾向にあった。下位尺度の8項目でも全体的に一般的な国民と比較してQOLが低下している傾向にある。突発性難聴患者のQOLは発症直後の急性期も聴力が固定した後も一般的な国民より低い傾向にあった。突発性難聴の後遺症が仕事や普段の活動をしたときに身体面に何らかの影響を与えていたことが示唆された。

アンケート調査では「耳鳴」は91%、「周囲の騒音がひびいて不快である」と回答したものは66%、「耳の圧迫感」は72%、「聞こえづらさ」については「ない」と回答したものは13%に過ぎなかった。耳鳴が「かなり気になる」「気になる」と回答した割合は、急性期68%で、固定後77%とむしろ増加していた。周囲の雑音のひびきに関して、「かなり不快」「不快」と回答した割合は、急性期65%、固定後58%とあまり変化がなかった。耳の圧迫感は急性期で74%、固定後では55%と減少した。

4) 内耳画像診断法に関する研究

ガドリニウム静注後4時間でのMRI撮影により、前庭において内リンパと外リンパの判別が可能である症例がある。前庭と比較し蝸牛での内リンパの同定は困難である。血液迷路閉門が障害され、外リンパをとりまく血管の透過性が亢進している場合は、外リンパの造影が

顕著となり、内リンパの検出が容易となる。

5) 突発性難聴の局所療法に関する検討

① 突発性難聴の局所療法

聴力回復の判定基準に従うと、デキサメサゾン鼓室内注入群では著明回復以上と良好な反応があったが、聴力改善度では統計学的な有意差はなかった。

② 突発性難聴に対する内耳低温療法

内耳低温群の治癒率は 41.9%、治癒に著明回復を加えた有効率は 65.2%で有意の有効率を認めた。

6) 急性低音障害型感音難聴に対する単剤治療における共同研究

現在までに登録された症例はプレドニゾン 41例、イソバイド74例、ATP33例(計148例)である。うち、前医での治療歴が明らかなイソバイド投与例2例を除外した146例の性別、平均年齢、患側、発症から初診までの平均日数には、各薬剤間で明らかな偏りは認められなかった。

7) 聴覚障害の病態解明のための基礎研究

① 蝸牛器培養における microRNA 発現

培養前と培養後の microRNA 発現量は非常に高い相関を示し、変化した microRNA の内容の再現性は良好であり、培養条件下の比較検討には十分利用できるものと考えられた。

② 音響外傷蝸牛に対するインターロイキン6阻害剤の効果

音響外傷後の ABR ではインターロイキン6阻害剤投与群において有意な聴力の改善を認めた。組織学的にもらせん神経節細胞数の減少が有意に抑制された。CD45、Iba-1 を用いた免疫染色ではらせん神経節において投与3日後の切片で薬剤投与群では炎症細胞の増加が有意に抑制された。

① 内耳病変のパラフィン包埋法のヒト側頭骨分子病理学的研究

パラフィン包埋の HE 染色ではライスネル膜の破綻や基底版の歪みなど膜迷路の形態保存の点では劣るものの、パラフィン包埋切片においてもコルチ器の形態は比較的温存されていた。免疫組織化学染色では、neurofilament は聴神経や末梢神経に発現が認められ、内耳内においても神経線維に強い発現を確認することができ、さらにコルチ器内においても有毛細胞の神経末端の部分にも発現を確認することができた。Prestin もコルチ器内の3列の外有毛細胞に強い発現を確認することができた。

② ラット台形体におけるサリチル酸の効果

サリチル酸投与時に mIPSCs の frequency の有意な増加がみられたが、amplitude には有意な変化は認められなかった。サリチル酸は mIPSCs の kinetics にも変化を与え、rise time と decay time が有意に増加した。中枢の聴覚路における興奮性入力と抑制性入力の不均衡が耳鳴の発生原因のひとつであると考えられているが、mIPSCs の frequency の増加がみられたことから、下位脳幹においても入力の不均衡が生じていると考えられた。

③ 選択的セロトニン再取り込み阻害薬によるマウス下丘神経細胞自発発火パターンの変化

セロトニン(5-HT)投与によって、sIPSC は頻度・振幅ともに増大がみられ、セロトニンは下丘において GABA 作動性ニューロンの神経伝達を亢進すると考えられた。

④ 一過性虚血後の内耳障害に対する低体温の影響

虚血中低体温群の NOx 濃度の上昇はいずれの群においても軽減され、コントロール群と間には有意な差が認められた。

考察

本研究では対象疾患を1)急性高度感音難聴(突発性難聴、外リンパ瘻、ムンプス難聴、急性低音障害型感音難聴、急性音響性感音難聴)と2)進行性または慢性高度感音難聴(遺伝性難聴、特発性進行性感音難聴、加齢性感音難聴、騒音性感音難聴)の高度感音難聴として、高度感音難聴を呈する疾患の難聴発症メカニズムを解明して、各標準的な治療方針を定めて、治療・予防法を確立することを目的として研究した。特に今回の3年間の研究では高度感音難聴発症に関与する遺伝子または遺伝子変異を検出し、難聴発症機構を分子細胞レベルで解明することを大きな目標の一つとした。超高齢化社会を迎えた本邦において聴覚障害の克服は大きな課題であり、高度難聴による重篤なコミュニケーション障害のハンディキャップが適切に克服されれば、国民の健康増進という厚生労働行政上の観点からも重要な研究テーマである。

本研究では3年間に多施設横断的研究で各高度感音難聴を来す疾患の1)疫学調査、2)発症に関連する遺伝子または遺伝子異常の検出、3)QOLへの影響、4)発症と予後に関わるバイオマーカーの検索、5)新しい治療法としての鼓室内局所療法の有効性の検証を行い、最終的にこれらの所見から各疾患の診断基準の見直しと、診療ガイドラインの作成を目指すことが大きな目的である。一方で各施設での独創的なアプローチによる3T-MRIによる内耳画像診断法などの新しい診断法や各種実験動物モデルの検討による急性高度感音難聴の発症機序の解明と新しい治療法の確立も積極的に推進したい。

1)突発性難聴の疫学調査および病態に関する研究

突発性難聴の全国疫学調査は疫学調査研究班と共同で1970年代から約10年ごとに行っているが、本年度は平成21年度の疫学調査を目標に準備した。

突発性難聴発症に関わるバイオマーカーとして好中球およびNK細胞活性が注目された。ルーティーン検査の項目の一つであり、容易に検討できることから来年度からは多施設で検討すべきと考えている。

突発性難聴の発症と酸化ストレスは大きな研究テーマであり、今回の検討でも発症時に異常を示した症例は多く、全症例での平均値も正常値を超えていた。抗酸化力も有意差はなかったが多くの症例で異常値を示した。これらの結果より突発性難聴の患者では発症期に酸化ストレス度が高値となる傾向が認められた。特に治療効果判定で著明回復以上を示した症例は治療前の酸化ストレス度が高い症例で多くみられたが、今後多施設で検討する予定である。

2)突発性難聴、加齢性難聴の関連遺伝子に関する研究

突発性難聴と虚血関連遺伝子SNPタイプの出現頻度で差を認めたものは蛋白リン酸化酵素PRKCHであった。この差が意味するものを明らかにするためにも多施設で検討する予定である。また、両側感音難聴の進行に関わる遺伝子、加齢に伴う進行性感音難聴では特にミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関与する遺伝子も解明されつつあり、このテーマもさらに検討したいと考えている。

3)突発性難聴のQOLに関する研究

突発性難聴のQOLでは特に心理的QOLが悪く、発症直後の急性期だけではなく聴力

が固定した後も一般的な国民より低い傾向にあった。突発性難聴の後遺症が仕事や普段の活動をしたときに身体面に何らかの影響を与えていたことが示唆された。一側性難聴でも QOL に対する影響は大きく、長期的なケアが必要であると考えられた。

4) 内耳画像診断法に関する研究

画像検査法が飛躍的に進歩している現状から考えて、内耳の画像診断法は大きく遅れている分野である。一連の造影 MRI 検査の検討から、外リンパの造影が可能となり、内リンパ水腫をはじめとする内耳障害の検出が可能となることが期待される。

5) 突発性難聴の局所療法に関する検討

ステロイド鼓室内注入療法や内耳低温療法は近年、国内外で多くの検討がなされている注目すべき治療法である。従来の治療法に反応しない症例を対象に検討されているが、今後は新鮮例も含めた有効性の検証が必要である。

6) 急性低音障害型感音難聴に対する単剤治療における共同研究

急性低音障害型感音難聴に対するプレドニゾロン、イソパイド、ATP による単剤治療はすでに6年間継続した臨床試験であり、現在までに148例が登録されているが、目標の200例まで継続して検討し、エビデンスのある結果を得たいと考えている。

7) 聴覚障害の病態解明のための基礎研究

基礎研究として独創的なテーマで研究が行われている。蝸牛器官培養における microRNA 発現や内耳病変のパラフィン包埋法のヒト側頭骨分子病理学的研究は新しい内耳研究の手法を確立するものであり、音響外傷蝸牛に対するインターロイキン6阻害剤の効果や一過性虚血後の内耳障害に対する低体

温の影響に関する研究は新しい治療法を模索する重要な基礎研究である。一方、ラット台形体におけるサリチル酸の効果に関する研究や選択的セロトニン再取り込み阻害薬によるマウス下丘神経細胞自発発火パターンの変化に関する研究は難聴のみならずそれによって生じる耳鳴の制御のための重要な研究である。臨床的研究のみならず、これら基礎的研究による新たな展開も不可欠であり、これらの研究が表裏一体として進行することを目指したい。

まとめ

1) 突発性難聴発症に関わるバイオマーカーとしては早期に来院した症例ほど好中球が高く初診時聴力の重症度、予後と相関した。一方、NK 細胞活性は好中球数と負の相関があった。突発性難聴で酸化ストレスの異常を示した症例は多く、全症例での平均値も正常値を超えていた。抗酸化力も有意差はなかったが多くの症例で異常値を示した。

2) 虚血関連遺伝子 SNP タイプの出現頻度でコントロールと比較して差を認めたものは蛋白リン酸化酵素 PRKCH であった。60歳以下の両側感音難聴患者のうち54%が難聴の進行を自覚しており、そのうち32%が常染色体優性遺伝または母系遺伝形式を示していた。加齢に伴う進行性感音難聴では特にミトコンドリア機能やエネルギー代謝に関与する遺伝子の発現低下が顕著であった。

3) 突発性難聴患者の QOL は発症直後の急性期も聴力が固定した後も一般的な国民より低い傾向にあった。突発性難聴の後遺症が仕事や普段の活動をしたときに身体面に何らかの影響を与えていたことが示唆された。

4) 内耳画像診断法では血液迷路関門が障害されると、外リンパの造影が顕著となり、内リン

パの検出が容易となった。今後、内耳病態の画像診断法として期待される。

5) 突発性難聴の局所療法としてステロイド鼓室内注入療法および内耳低温療法が注目される。

6) 急性低音障害型感音難聴に対するプレドニゾロン、イソバイド、ATP の単剤治療については継続して検討を行うこととした。

7) 聴覚障害の病態解明のための基礎研究は不可欠であり、臨床的研究と表裏一体で進行することを目指したい。

Ⅲ. 分担研究報告

遺伝性難聴例を対象としたミトコンドリア DNA 変異網羅的検出法による遺伝子解析

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：加藤 智史（東京都老人医療センター耳鼻咽喉科）
共同研究者：野口 佳裕（東京医科歯科大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：木村 百合香（東京都老人医療センター耳鼻咽喉科）
共同研究者：西垣 裕（東京都老人総合研究所健康長寿ゲノム探索）
共同研究者：田中 雅嗣（東京都老人総合研究所健康長寿ゲノム探索）

研究要旨

遺伝性難聴が疑われた患者 373 人の血液から抽出した DNA に対し、主要 28 種類のミトコンドリア DNA 変異の網羅的解析を施行した。結果は、1555A>G 変異を 11 人で、3243A>G 変異を 10 人で検出した。3243A>G 変異が検出された症例の中には糖尿病などを合併せず、臨床所見からは本変異が疑われなかった症例も存在した。これらの結果からこの網羅的解析方法の有用性が確認され、同時に未診断の変異の存在が示唆された。

研究目的

遺伝性難聴例に対して、ミトコンドリア DNA 変異のスクリーニングを行う。

研究方法

東京医科歯科大学耳鼻咽喉科難聴外来で遺伝性難聴の疑いと診断された 373 人の血液から抽出した DNA に対し、ミトコンドリア DNA の代表的な 28 変異（表 1）の網羅的解析を行った。方法としては、最初にピオチン標識プライマーを用いた 28-plex PCR により、mtDNA のほぼ全領域を増幅した。次にミトコンドリア DNA 変異の網羅的解析法として用いた蛍光ビーズ・アレイ PCR-Luminex®法（以下、Luminex 法）は、多項目の Assay を 1 本のマイクロチューブ内で緩衝液に懸濁した状態で、

同時に行う多項目同時解析手法である。2 種類の蛍光色素が異なる割合で配合された直径 5.6 ミクロンの微小なポリエチレンビーズ上に各変異の塩基配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブが共有結合によって結合されている。これらの蛍光ビーズと multiplex PCR 産物を 1 本のマイクロチューブ内でハイブリダイゼーションさせた後、ストレプトアビジン-フィコエリスリン (SA-PE) を添加し、ピオチン-ストレプトアビジン複合体形成反応を行った。その後 Luminex 法により、ビーズ上のフィコエリスリン蛍光値の測定と蛍光ビーズの判別をフローメトリーで行った。この方法を用いると、蛍光ビーズに共有結合したプローブの種類により、ミトコンドリア DNA の 28 変異の有無

を数時間以内に判定することが可能であった。

(倫理面への配慮)

本研究は東京都老人総合研究所長寿ゲノム探索チームと共同で実施した。また血液採取と DNA 抽出および遺伝子解析は、書面による患者の承諾を得た上で、東京医科歯科大学の倫理委員会により承認されている。

研究結果

373 例の解析にて検出されたミトコンドリア遺伝子変異の結果を表 2 に示した。Luminex 法で遺伝子変異が検出された検体については、引き続きシーケンサーによる解析を施行し、変異の有無を確認した。

考 察

難聴をきたすミトコンドリア DNA 変異としては 1555A>G 変異や 3243 A>G 変異などが代表的なものであるが、今回の主要 28 種類の変異解析においても各々 11 人 (全体の 2.9%)、10 人 (全体の 2.7%) が検出された。このうち、3243A>G 変異はミトコンドリア病で最も頻度が高い MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes) の病因変異として知られている。3243 A>G 変異を検出した 10 人の中で病歴が明らかな 7 人は全て

MELAS を疑わせる所見を認めなかった。糖尿病合併は 3 人、腎障害合併は 3 人で、合併症が無い患者も 2 人存在した。したがって、確定診断に至っていない難聴患者の中には 3243 A>G 変異陽性例が潜在している可能性が示唆された。

結 論

我々は遺伝性難聴が疑われた 373 人のミトコンドリア DNA 変異の網羅的解析を施行した。本法は、ミトコンドリア病における主要な 28 種類の DNA 変異を同時に解析し、数時間以内に全ての結果を得ることができるため、遺伝性難聴が疑われた場合すぐに実施可能なミトコンドリア病の一次スクリーニング検査として適している。今後、これらの検査法が、遺伝性難聴の診断および早期治療開始の一助となることが期待される。

健康危険情報

なし

研究発表

なし

知的財産権の出願・登録状況

なし