

[参考文献]

- (1) Liu P, Gliddon C, Lindsay L, Darlington CL, Smith PF. Nitric oxide synthase and arginase expression changes in the rat perirhinal and entorhinal cortices following unilateral vestibular damage: a link to deficits in object recognition? *J Vestib Res* 2004;14:411-7.
- (2) Zheng Y, Darlington CL, Smith PF. Bilateral labyrinthectomy causes long-term deficits in object recognition in rat. *NeuroReport* 2004;15:1913-6.
- (3) Goddard M, Zheng Y, Darlington CL, Smith PF. Synaptic protein expression in the medial temporal lobe and frontal cortex following chronic bilateral vestibular loss. *Hippocampus* 2008;18:440-4.
- (4) Russell NA, Horii A, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK. Bilateral peripheral vestibular lesions produce long-term changes in spatial learning in the rat. *J Vestib Res* 2003;13:9-16.
- (5) Zheng Y, Goddard M, Darlington CL, Smith PF. Long-term deficits on a foraging task after bilateral vestibular deafferentation in rats. *Hippocampus* 2009;19:480-6.

8. β -lactam系抗生物質による海馬CA1領域虚血性神経細胞死 に対する神経保護作用

高安幸弘, 高橋克昌, 古屋信彦 (群馬大)

[はじめに]

空間認知の中枢とされる大脳辺縁系の海馬CA1領域には場所特異的に発火する細胞(place cell)が存在し、前庭入力を介した位置情報がplace cellの場所に対する特異性の形成、維持に重要な役割を果たすとされている。一方、海馬CA1錐体細胞は、他の中枢神経細胞と比較して、虚血に対し顕著な脆弱性を持つ。これらのことから、めまい症の中枢focusとして海馬機能障害の関与が示唆される。現在、海馬CA1領域における一過性脳虚血後のCA1領域錐体細胞の選択的脱落は虚血性神経細胞死の実験モデルとして確立しており、アポトーシス誘導の初期メカニズムとしてグルタミン酸性興奮毒性が示されている。近年、 β -lactam系抗生物質によるグルタミン酸トランスポーターの発現増加により、グルタミン酸性興奮毒性を抑制し、神経保護作用が得られることが報告された(Rothstein JD, et al, 2005)。本研究では、 β -lactam系抗生物質投与によるラット海馬CA1領域の選択的神経細胞死に対する影響をin vivoモデルにて調べ、虚血性神経障害に対する β -lactam系抗生物質の神経保護作用を検討した。

[対象と方法]

Wisterラットを用いた4 vessel occlusionによる全脳虚血モデルを使用した。 β -lactam系抗生物質はCeftriaxonを200 mg/kgで5日間連日腹腔内投与を行った。投与開始後6日目に10分間の虚血負荷を行った後脳血流を再還流させ、虚血刺激後7日目に海馬を取り出し凍結切片(40 μ m)作成、TB染色を行った。染色された細胞数を残存細胞数として海馬CA1領域の錐体細胞数をカウントし、虚血性神経細胞死の評価を行った。さらに、同様に同一動物から得られた反対側の海馬から蛋白を抽出し、ウェスタンブロッティング法によりGLT-1蛋白の定量解析を行った。

[結果]

虚血刺激7日目における残存海馬CA1錐体細胞は、生食を腹腔内投与したコントロール群の全脳虚血動物では正常の $23.0 \pm 4.0\%$ ($n = 8$)であったのに対し、Ceftriaxon投与群では $46.2 \pm 6.0\%$ ($n = 10$)であった。t-testによる統計学的検定において有意差を持って残存海馬CA1錐体細胞の増加が確認された($p < 0.01$)。さらに、GLT-1抗体を用いたウェスタンブロッティング法による蛋白定量解析の結果、Ceftriaxon投与群の海馬CA1領域では、生食投与のコントロール群と比較して 2.7 ± 0.8 倍 ($n = 7$, $p < 0.01$)のGLT-1蛋白の増加が確認された。

[考察]

Ceftriaxon投与により、全脳虚血のin vivoモデルラットにおいて有意に海馬CA1領域錐体細胞の遅発性神経細胞死が減少した。これは、Ceftriaxon投与によるGLT-1蛋白の増加が関与すると考えられた。

[結論]

Ceftriaxon投与によりグルタミン酸トランスポーターのサブタイプの1つであるGLT-1の発現増加が誘導され、このGLT-1の発現増加は、虚血性神経細胞死に対し神経保護的に作用すると考えられた。

[参考文献]

Rothstein JD, et al., Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77, 2005.

9. マウス内耳におけるプロスタノイドレセプターの発現

工田昌也、平川勝洋（広島大）

[はじめに]

プロスタグランジン (PG) はシクロオキシゲナーゼ (COX) によってアラキドン酸から合成される。COX は細胞の小胞体と核膜に局在しており、PG は細胞内で合成された後、トランスポーターを介して細胞膜を通過し、細胞外で細胞膜表面の受容体に結合して多彩な生理作用を発現する。PG の生理活性はプロスタノイドレセプター (PR) に結合することで発揮される。現在、少なくとも 8 種類の PR が存在することが知られており、それぞれ DP (PGD₂)、EP₁ (PGE₂)、EP₂ (PGE₂)、EP₃ (PGE₂)、EP₄ (PGE₂)、FP (PGF_{2α})、IP (PGI₂)、TP (Tx A₂) と名づけられている^{1,2)}。内耳疾患においては PGE₁、PGI₂、PGF_{2α} などが突発性難聴³⁾やメニエール病の治療^{4,5)}に用いられているが、その作用機序については不明な点が多い。加えて、内耳における PR の局在についてもその詳細は判明していない^{6,7)}。今回の検討は PR の内耳での局在を明らかにし、内耳での PG の作用を明らかにするために行われた。

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常の CBA/J マウス、8 週齢 (体重約 20g) を使用した。動物はネンブタールによる深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、断頭、側頭骨を摘出した。試料は EDTA にて脱灰後、4 μm の厚さで凍結切片を作製、DP、EP₁、EP₂、EP₃、EP₄、FP、IP、TP、COX1、COX2 に対する抗体を用いて、免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。

[結果]

蝸牛側壁では、血管条全体に EP₂、EP₄、FP、IP、COX1、基底細胞領域で DP、EP₁、EP₃ の発現が認められた。コルチ器では感覚細胞に DP、EP₁、EP₂、EP₃、EP₄、FP、IP、COX1、支持細胞に EP₂、EP₃、EP₄、FP、IP、TP、COX1 の局在が認められた。蝸牛神経節では EP₃、EP₄、IP、COX1 が神経節細胞全体に、EP₂、TP、COX2 が神経節細胞細胞質に FP が神経節細胞核に認められた。

前庭器では前庭感覚細胞に EP₂、EP₄、FP、IP、TP、COX1 が、感覚細胞表面に EP₁、EP₃ が、暗細胞に EP₂、EP₄、FP、IP、COX1 が認められ、上皮下の神経では EP₂、EP₃、EP₄、FP、IP、COX1 が発現していた。前庭神経節では EP₁、EP₂、EP₃、EP₄、FP、IP、TP、COX1 が神経節細胞に認められ、IP、COX1 は核に多く、EP₂ は均一、EP₁、EP₃、EP₄、FP、TP は細胞質に強く認められた。

内リンパ嚢では上皮細胞で EP₁、EP₂、EP₃、EP₄、FP、IP、COX1 の発現が認められた。(表 1)

[考察]

これまでの研究から内耳には各種の PR が存在することが報告されており、近年その機能についてもかなりのことがわかってきている^{6,7)}。内耳に存在する PR としては EP₁、EP₄、FP が蝸牛に、FP が半規管、内リンパ管に存在することがすでに報告されている^{6,7)}。また、その機能については FP が正常聴力の維持に強く関与し⁶⁾、EP₄ は内耳障害軽減作用を有する⁷⁾ことが示唆されている。今回、8 種類の PR の内耳での発現を免疫組織学的に検討した結果、そのすべてが程度の差はあれ内耳のいずれかの部分に存在することが明らかとなった。中でも EP₄、FP、IP の発現が内耳の多くの部位で強く認められ、これらの PR が内耳機能に強く関連していることが推察された。このうち EP₄ については EP₄ が抗アポトーシス、抗炎症、抗興奮毒性作用を持つことや^{1,2,6)}、内耳で EP₄ 作動薬が急性感音難聴を予防することも報告されており⁶⁾、内耳障害に対する PGE₁ の効果の一部はこ

れにより説明できると考えられた。これらの所見は突発性難聴に対するPGI₂の効果³⁾や、メニエール病に対するPGI₂⁴⁾やPGF_{2α}⁵⁾の効果にも当てはまり、内耳障害に対するPGの効果は内耳に存在するPRを介して生じると考えられた。ここで各PRの作用を見るとDP、EP₂、EP₄、IPはcAMPを上昇させ、反対にEP₃はcAMPを低下させることが知られている。またEP₁、FP、TPは細胞内Caイオンを上昇させる^{1,2)}。臨床的には突発性難聴に対する効果ではPGE₁よりもPGI₂のほうが治療効果が高いとの報告もあり³⁾、これらのことを考えると内耳障害の治療にPGを使用する場合PGE₁よりもPGI₂あるいはEP₄ 作動薬の使用のほうが望ましいことが考えられた。PGF_{2α}に関しては作用機序にまだ不明な点が多く今後の検討が必要である。

[結論]

マウス内耳におけるPRの局在を検討した結果、内耳では8種類のPRが程度の差はあれ、各部位に発現しており、それぞれ様々な機能に関連していることが推察された。中でもEP₄、FP、IPは内耳の各領域に強く発現しており、内耳の機能の維持や障害からの回復に大きな役割を果たしていることが考えられた。

[参考文献]

1. Matsuoka T, Narumiya S: The roles of prostanoids in infection and sickness behaviors. J Infect Chemother 14:270-278, 2008.
2. Matsuoka T, Narumiya S: Prostaglandin receptor signaling in disease. TheScientificWorldJOURNAL 7:1329-1347, 2007.
3. 森光 保: 突発性難聴の治療的診断改善への提言. 耳鼻 55:89-96, 2009.
4. 北原 紘、武田憲昭、肥塚 泉、荻野 仁: 前庭型メニエール病に対するプロスタグランジン I₂ 誘導体の治療効果. Equilibrium Res 65:116-121, 2006.
5. Rask-Andersen H, Friberg U, Johansson M, Stjernschantz J: Effects of intratympanic injection of latanoprost in Meniere's disease: A randomized, placebo-controlled, double-blind, pilot study. Otolaryngol Head Neck Surg 133:441-443, 2005.
6. Hori R, Nakagawa T, Sugimoto Y, Sakamoto T, Yamamoto N, Hamaguchi K, Ito J: Prostaglandin E receptor subtype EP4 agonist protects cochlea against noise-induced trauma. Neuroscience 160:813-819, 2009.
7. Stjernschantz J, Wentzel P, Rask-Andersen H: Localization of prostanoid receptors and cyclo-oxygenase enzymes in guinea pig and human cochlea. Hearing Res 197:65-73, 2004.

表1：マウス内耳でのプロスタノイドレセプターの発現

		DP	EP1	EP2	EP3	EP4	FP	IP	TP	COX1	COX2
cochlea	SV	(+)	(+)	+	(+)	++	++	++	±	++	-
	SL	-	-	-	+	++	±	+	-	±	-
	SP	-	-	+	+	++	±	+	-	+	-
	OHC	-	±	+	+	++	++	++	±	+	-
	IHC	+	±	++	+	++	++	+	±	++	-
	SC	-	-	+	+	++	++	+	+	+	-
SG	Nucleus	±	-	-	+	++	++	++	-	++	-
	cytoplasm	±	±	+	+	+	±	++	+	++	±
	NF	-	-	±	±	+	+	±	-	+	-
vestibuli	VHC	±	(+)	+	(+)	++	++	++	+	++	-
	VSC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	DC	-	±	+	±	++	(++)	+	±	+	-
	NF	-	-	+	+	++	++	++	++	+	-
VG	Nucleus	-	-	++	±	+	-	++	-	++	-
	cytoplasm	±	+	++	+	++	++	++	+	+	-
	NF	-	±	-	+	±	++	±	-	+	-
ES		±	+	+	+	++	++	++	±	++	-

10. マウス内耳におけるエストロゲンレセプター α 、 β 発現への加齢、性別の影響

本橋 玲, 清水 顕, 許斐氏元, 鈴木 衛 (東京医大), 工田昌也 (広島大)

[はじめに]

性ホルモンであるエストロゲンはさまざまな機能を有し、生殖のほか記憶の保護や骨の成長にも関わっている (1, 2)。エストロゲンの生理的な働きはエストロゲンレセプターER α と遺伝子発現を調節する核レセプターのサブタイプ、ER β を通して伝えられる。エストロゲンは細胞内の目的受容体へ結合し、その複合体はクロマチンと結合し特異的mRNAの合成が行われる。ER α 、 β の発現は組織や生物種によって異なるが、その発現パターンや生殖器以外の組織でのERの機能については十分に分かっていない (1-3)。

内耳でのエストロゲンの機能としては聴力や前庭機能への効果が示唆されているが、まだ十分に解明されていない。エストロゲン量の違いによる男女間の聴力の差が指摘されている (4)。また、高齢になるに従いめまいは増加し、BPPVは女性に多く、年齢を重ねるほどおきやすい (6)。これらには内耳でのエストロゲンの関係が示唆される。

今回内耳でのエストロゲンの機能を明確にするために、マウス内耳のER α 、 β の発現と性別や加齢による変化について検索した。

[方法]

14匹の8週齢の鼓膜所見、Preyer's反射正常な20-25gのCBAマウス雄雌と30-35gの24ヵ月齢のマウス雄雌を使用した。ペントバルビタールの深麻酔後4%パラホルムアルデヒドにて還流固定を行った。側頭骨を摘出し同様の固定液にて1時間以上固定した。0.1MのNa-EDTA液にて14日間脱灰した。顕微鏡観察には、エタノール脱水後Water-soluble resin (JB-4) で包埋し、トルイジンブルー染色した4 μ m薄切標本を使用した。

免疫化学染色は20%シュークロース入りPBSに浸し、その後冷凍し低温槽で4 μ mに薄切して行った。ブロッキング処置後に抗ER α ウサギポリクローナル抗体 (1:100 Affinity BioReagents社)、抗ER α マウスモノクローナル抗体 (1:10 Affinity BioReagents社)、または抗ER β ウサギポリクローナル抗体 (1:100 Affinity BioReagents社) を一次抗体として使用、0.3%トリトンX-100入りPBSに浸し4°Cで48時間保存した。その後PBSにて洗浄し、Alexa Fluor 488抗ウサギ・ヤギ、または抗マウス・ウサギ二次抗体 (1:500 Molecular Probes社) にて1時間おいた。洗浄後Dako Cytomatia Fluorescent Mounting Mediumで封入した。同様のもので一次抗体を使用しないものを対照とした。抗体の特異性は事前にコントロール蛋白と内耳切片を利用し確認した。二重染色はER α とは対になったAlexa 568 (赤)、ER β はAlexa488 (緑) を使用した。観察はNikon社の特殊フィルター付き蛍光顕微鏡で行った。得られた像はデジタル処理後保存した。

血管条、外有毛細胞、ラセン神経節、前庭有毛細胞、前庭暗細胞、前庭神経節などを若年マウスと老齡マウスの雄雌で蛍光強度を比較した。感覚細胞、神経細胞、暗細胞、血管条辺縁細胞は各標本をランダムに選りその核の蛍光強度を測定した。10個の細胞の平均値を測り、各グループの6-8標本の平均値を評価した。蛍光強度を視覚化し濃い強度を紫として表し、薄い強度を赤で表した。

[結果]

1. ER α 、 β の発現

ER α 、 β とも内耳の細胞核に後述するように染まった。コントロールは細胞質や間質に淡く染まったが核には染まらなかった。

ER α は、蝸牛では内有毛細胞、外有毛細胞に発現し柱細胞、支持細胞にも発現した。ラセン神経節では特にI型細胞が強く染色し、II型細胞は弱く染色された。血管条の基底細胞は強く染色され、辺縁細胞と中間細胞は弱かった。蝸牛らせん隆起は弱く染まり、らせん靭帯はいくつかの核が染まった。前庭では卵形囊、球形囊、膨大部の感覚細胞、暗細胞に染まった。前庭神経節はI型細胞は染まったがII型細胞は弱かった。内リンパ囊の上皮細胞の核も染色された(図1)。

ER β は、内有毛細胞、外有毛細胞、柱細胞、支持細胞に染まり、らせん神経節I型、II型細胞とも強く染色された。血管条は基底細胞、辺縁細胞は強く染まり中間細胞も染まった。卵形囊、球形囊、膨大部の感覚細胞、暗細胞、前庭神経節I型、II型細胞、内リンパ囊上皮細胞も染色された(図2)。

2. 二重染色

二重染色によりERの発現がより詳細に判った。ER α 、ER β 、双方をそれぞれ赤、緑、黄色で標識した。ER α 、 β は内耳全般に発現し黄色に染色された。血管条は基底細胞は黄色であったが辺縁細胞は緑に染色され、ER α が少ないことが示された。内有毛細胞は黄色に染まったが外有毛細胞は緑を帯びて染色された。ラセン神経節I型細胞は黄色に染まりII型細胞は緑を帯びて染まった。前庭感覚細胞は黄色から緑色に染まり、暗細胞は黄色に染色された。前庭神経節I型細胞は黄色くII型細胞は緑に染まった。内リンパ囊上皮は黄色に染まった(図3)。

3. 性と加齢によるERの発現の相違

ERの発現を若年雄、若年雌、老齢雄、老齢雌で比べた。ER α も β も内耳への発現部位に差はなかった。しかし蛍光強度に違いがあった。ER α は若年雌が若年雄よりも強く染色されたがER β は大きな違いはなかった。老齢マウスでは蝸牛有毛細胞は消失し、血管条は萎縮していた。ラセン神経節細胞も減少していた。前庭感覚細胞も高度に障害されていたが、蝸牛より軽度であった。耳石層は薄くなり前庭神経節細胞も減っていた(図3)。

雄、雌ともに老齢ではER α 、 β の著しい蛍光強度の低下を認めた(図4—7)。

若年雌のER α の蛍光強度は、血管条が 92 ± 6.2 (mean \pm SD)、外有毛細胞 75 ± 7.7 、ラセン神経節 91 ± 9.6 、前庭感覚細胞 81 ± 6.9 、暗細胞 85 ± 4.1 、前庭神経節 118 ± 9.5 であった。若年雄は、血管条 83 ± 18.1 ($p < 0.05$)、外有毛細胞 61 ± 14.2 ($p < 0.05$)、ラセン神経節 81 ± 6.3 ($p < 0.05$)、前庭感覚細胞 71 ± 8.3 ($p < 0.05$)、暗細胞 77 ± 5.6 ($p < 0.05$)、前庭神経節 103 ± 9.7 ($p < 0.01$)と有意に蛍光強度は低下していた。高齢雌も血管条 57 ± 1.6 ($p < 0.01$)、外有毛細胞 54 ± 2.8 ($p < 0.01$)、ラセン神経節 74 ± 10.0 ($p < 0.01$)、前庭神経節 54 ± 3.1 ($p < 0.01$)、暗細胞 61 ± 5.6 ($p < 0.01$)、前庭神経節 55 ± 2.8 ($p < 0.01$)と蛍光強度の有意の減少を認めた。高齢雄も同様に血管条 58 ± 4.3 ($p < 0.01$)、外有毛細胞 52 ± 10.7 ($p < 0.05$)、ラセン神経節 56 ± 5.4 ($p < 0.01$)、前庭感覚細胞 54 ± 4.0 ($p < 0.01$)、暗細胞 61 ± 6.1 ($p < 0.01$)、前庭神経節 64 ± 6.5 ($p < 0.01$)と蛍光強度の有意の低下を認めた。高齢雌と高齢雄ではラセン神経節のみ有意の差を認めた ($p < 0.05$) (図8)。

ER β では、若年雌では血管条 94 ± 6.8 、外有毛細胞 100 ± 13.7 、ラセン神経節 146 ± 14.2 、前庭感覚細胞 111 ± 12.8 、暗細胞 129 ± 11.4 、前庭神経節 148 ± 18.3 であった。これに対し若年雄は、血管条 93 ± 7.0 、外有毛細胞 105 ± 20.0 、ラセン神経節 137 ± 14.0 、前庭感覚細胞 111 ± 15.4 、暗細胞 129 ± 16.9 、前庭神経節 140 ± 9.5 と有意差は認めなかった。高齢雌では、血管条 76 ± 6.8 ($p < 0.01$)、外有毛細胞 57 ± 12.7 ($p < 0.01$)、ラセン神経節 67 ± 14.7 ($p < 0.01$)、前庭感覚細胞 86 ± 14.8 ($p < 0.01$)、暗細胞 79 ± 10.3 ($p < 0.01$)、前庭神経節 74 ± 6.8 ($p < 0.01$)と有意差をみとめ、高齢雄でも血管条 77 ± 9.3 ($p < 0.01$)、外有毛細胞 56 ± 8.8 ($p < 0.01$)、ラセン神経節 58 ± 8.3 ($p < 0.01$)、前庭感覚細胞 58 ± 5.7 ($p < 0.01$)、暗細胞 64 ± 5.2 ($p < 0.01$)、前庭神経節 61 ± 7.1 ($p < 0.01$)と有意差を認めた。高齢雌と高齢雄では血管条 ($p < 0.01$)、前庭感覚細胞 ($p < 0.01$)、暗細胞 ($p < 0.01$)、前庭神経節 ($p < 0.01$)にて有意差を認めた(図7)。

[考察]

ER α 、 β は内有毛細胞、外有毛細胞、血管条、ラセン神経節、前庭感覚細胞、暗細胞、前庭神経節、内リ

ンパ囊上皮に発現を認め、発現部位からエストロゲンは内耳に影響していると考えられる。今回の実験の発現部位は他の報告とはやや異なっていた。Stenbergら(7)は卵形囊、外有毛細胞にはER β は発現せず、Meltserらは(9)血管条にER β は発現しないと報告している。この差は染色法や抗体の違いのためであろう。

ERが内毛細胞、外毛細胞、ラセン神経節に発現しているため聴力との関わりが考えられるが、月経周期により聴力が変動することが報告されている。排卵期より月経期のほうが4000Hz 閾値が高いが、避妊薬服用中の女性や男性ではこれは認めない(10)。また、エストロゲンがABRの潜時を変えたとの報告もあり、若い女性は男性に比べABRの潜時が短く振幅が大きい。更年期になると振幅は男性に近づくが男性の振幅は年齢にかかわらず一定である。ラットでは卵巣摘出後に潜時は延長するが、エストロゲンの補充により短縮し、エストロゲンは聴力に影響する(12)。また、若いアカゲザルではエストロゲン補充グループのほうがABRの潜時が短くなるとの報告もある(2)。今回見られた高齢マウスの蝸牛のERの減少はこれらの報告とよく相関するものと考えられる。

染色体異常(45X0)であるターナー症候群では低身長のほか、卵巣のエストロゲン欠如、不妊、難聴などが起こり、中年のターナー症候群の女性には早期の老人性難聴が発生する(2)。ターナー症候群の動物モデルマウスでも聴力低下や外有毛細胞の消失と病的な内毛細胞が認められる(2)。これらは遺伝的要素、エストロゲン欠乏、また両方によるものが考えられている。

ERはいくつかの臓器に同時に発現し、ある臓器では一方のERが優位に発現する。二重染色により内耳のER α 、 β の発現が明らかになり、血管条中間細胞、ラセン神経節II型細胞はER β が優位に発現した。しかし、それぞれのERがどの程度聴力、前庭機能、性特異性について影響しているかは詳しくわかっていない。ERにおけるシグナル変換はエストロゲン反応性の組織の成長、代謝に影響し、ERの数は細胞のエストロゲン感受性を左右するので重要である。ERの発現は性特有の乳腺や卵巣などでは発育度、年齢、ゴナドトロピンなどの影響を受け、大脳皮質では17 β エストラジオールやテストステロンは年齢、性別、ER蛋白量に依存する。これらの結果から、年齢と性別はmRNA量、ERのサブタイプへの変化、転写率などに影響する(13)。エストロゲン不足のマウスやターナーマウスは早期から難聴になり、ABRの潜時は延長する(2)。これらのマウスでは蝸牛内毛細胞のER発現は低下していた(8)。卵巣摘出後に子宮のERは減少するが、エストロゲンを投与すると血管条のERは増える。また、ラットの血管条中間細胞のER α は抗エストロゲン投与で減少する(2, 16)。これらの結果から、ERの発現はエストロゲン量にかかわっていると考えられる。

今回の実験で性別によるERの発現の違いが明らかになった。ER α の蛍光強度は若年雌のほうが若年雄より強かったが、ER β は若いマウスでは性差はなかった。これらはマウス内耳のER β 発現の性差を比べた過去の報告と一致した(9)。マウス大脳皮質の検討でも成熟雌のほうが成熟雄に比べてER α のmRNA量が多いが、ER β mRNAは性差がない(13)。ER α の性差は、若い女性ではABR潜時が短く振幅が大きいことにも関与しているものと考えられる。

年齢による内耳のERの変化については、高齢マウスではER α は雄雌ともラセン神経節を除いて性差なく著しく減少した。ER β は高齢マウスでは雄雌とも著しく減少したが、ラセン神経節、前庭神経節、暗細胞、前庭有毛細胞では雌のほうが雄よりも多かった。この結果は、若い女性が男性に比べABR潜時が短く振幅が大きいことや、閉経後の女性の振幅は男性に近づくこと(11)を裏付けるものである。

ER β の機能については、ER β は神経の生存に不可欠で脳の感覚刺激に重要な役割を果たすとされる。Hultcrants(2)らによるとER β ノックアウトマウスでは急激に聴力が低下し、12か月齢でほとんど聾になるという。アロマターゼノックアウトマウス(ARKO)、ER α ノックアウトマウス(ERKO)、ER β ノックアウトマウス(BERKO)を使用した研究では、若いBERKOとARKOではER β の減少は基本聴力や蝸牛の形態に影響せず、12-22週のマウスではアロマターゼ、ER α 、ER β の不足は聴力には影響しなかった。このように、聴力悪化の程度によりBERKOとARKOの機能の違いが明白になった(2, 9)。これらの知見は内耳におけるER β の神経保護作用を示唆している。高齢者特有の感音難聴は加齢の結果であるが、最近では活性酸素や酸化還元バランスが難聴の一要素と考えられている(17)。正常人の大規模コホート研究では、高齢男性は同年代の女性に

比べて10-25dB聴力が悪い(6)。本研究で、ER β の量は男女ともに減少するが、女性のほうが男性に比べER β の量は多いことが明らかになった。ER β の神経保護作用は加齢性難聴の予防に関係しており、高齢女性が高齢男性に比べ聴力が良い結果になったものと考えられる。

血管条や前庭暗細胞、内リンパ嚢上皮細胞などの内リンパのイオンと体液調節にかかわる部位へのER α 、ER β の発現も認められた。エストロゲンはステロイドホルモンで、糖質コルチコイドに似て腎臓のナトリウムと水の代謝を司っている(2,3)。内耳液の恒常性にエストロゲンが関与しており、FITC β エストロゲンは血管条に取り込まれ、メガリン欠損マウスではFITC β エストロゲンの取り込みは減少する。内耳では β エストロゲンはメガリンと結合し運ばれて機能する(15)。エストロゲンは血管内から血管外への水分の移動を促進し、浮腫を起こすことが知られており、このため月経前にメニエール病の症状が悪化することが推測される(2)。今回の実験で、内耳の水分輸送細胞のER発現の性差が明らかになった。卵摘後エストロゲンを投与されたラットでは血管条のERは再上昇し、抗エストロゲン薬使用後のラットの血管条辺縁細胞ではER α は低下する(2,16)。これらの結果からERの発現はエストロゲン量により変化することが考えられる。高齢マウスでの内耳の水分輸送細胞におけるER発現の低下はこのためであろう。

今回の実験で前庭感覚細胞と前庭神経節への発現も明らかになり、エストロゲンは前庭機能の活動性を修飾することも考えられた。性差や加齢による前庭機能の相違については報告されており、高齢男性は高齢女性に比べ前庭眼反射による姿勢保持が著しく劣るといふ(5)。また、更年期後の女性にエストロゲン補充療法を行うと、重心動揺検査が改善する。前庭にはER α もER β も存在し加齢とともにその発現は低下することから、ERレベルの低下は高齢者の前庭機能の悪化と関係していると考えられる。

エストロゲンは耳石代謝にも重要な役割を果たしている。BPPVは女性に多く、年齢の上昇とともに増加する。再発性のBPPVに悩む50歳以上の女性に骨量減少や骨粗しょう症があると報告されている。再発性BPPVと骨のカルシウム低下との関わりも示唆され、卵巣摘出後は耳石の密度が減少しサイズが大きくなるという(18)。また、高齢動物では耳石の数とカルシウム濃度が減少する(19)。今回、前庭暗細胞のERが加齢により低下することが判明した。これが高齢動物での耳石の変化と関係していることが考えられる。近年、新しいカルシウムチャンネルのTRPV5とTRPV6が発見され、耳石代謝に重要な役割を担っているとされる。これらは内耳では前庭暗細胞と血管条に発現し、前庭のカルシウムの調節や吸収に関わっている。このチャンネルの機能障害はPendred症候群や耳石奇形(巨大化)など一部の前庭機能障害を起こす(17)。ER α は子宮のTRPV6を調節し、TRPV6はER α に依存してエストロゲンにより調節されている(20)。今回ER α が高齢で減少することが判明したが、ER α の減少がTRPV6を減少させ、その結果耳石奇形や耳石の減少が生じると考えられる。更年期により急速にエストロゲンが減少し、それによりERが減少し、特にER α の減少は耳石の代謝障害を引き起こし、結果として高率にBPPVが発症すると考えられた。

[結論]

ER α 、 β はそれぞれ内耳の血管条、外有毛細胞、内内毛細胞、らせん神経節、前庭神経節、前庭暗細胞、内リンパ嚢の核に発現を認めた。血管条の辺縁細胞と外有毛細胞および神経節II型細胞ではER α の発現はわずかであった。ERの発現部位に性別と年齢の違いによるものはなかった。しかし蛍光染色による染色強度の違いはER α では雌の若年マウスが若年雄のマウスに比べ非常に強く染まり、ER β では大きな違いはなかった。高齢マウスではER α 、 β ともに雄雌どちらでも染色強度が減少していた。ER α 、 β は年齢の増加に伴いその内耳への発現は減少した。更年期により急速にエストロゲンが減少し、それによりERが減少し、特にER α の減少は耳石の代謝障害を引き起こし、結果として高率にBPPVなどの末梢性めまいが発症すると推測した。

[参考文献]

1. Kuiper GGJM, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al: The estrogen receptor β subtype: A novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol* 1998; 19: 253-86.
2. Hultcrantz M, Simonoska R, Stenberg AE. : Estrogen and hearing: a summary of recent investigation. *Acta Otolaryngol* 2006; 126: 10-14.
3. Kumagami H. : Sex hormones in the kidney and endolymphatic sac. An immunohistological study. *Acta Otolaryngol* 1994; 114: 48-51.
4. Jönsson R, Rosenhall U, Gause-Nilsson I, et al: Auditory function in 70- and 75-year-olds of four age cohorts. *Scand Audiol* 1998; 27: 81-93.
5. Matheson AJ, Darlington CL, Smith PF: Further evidence for age-related deficits in human postural function. *J Vestib Res* 1999; 9: 261-4.
6. Salvinelli F, Firrisi L, Casale M, et al: Benign paroxysmal positional vertigo: diagnosis and treatment. *Clin Ter* 2004; 155: 395-400.
7. Stenberg AE, Wang H, Sahlin L, et al: Mapping of estrogen receptors α and β in the inner ear of mouse and rat. *Hear Res* 1999; 136: 29-34.
8. Stenberg AE, Wang H, Sahlin L, et al: Estrogen receptors α and β in the inner ear of the 'Turner mouse' and an estrogen β knockout mouse. *Hear Res* 2002; 166: 1-8.
9. Meltser I, Tahera Y, Simpson E, et al: Estrogen receptor β protects against acoustic trauma in mice. *J Clin Invest* 2008; 118: 1563-70.
10. Swanson SJ, Dengerin HA. : Changes in pure-tone thresholds and temporary shifts as a function of menstrual cycle and oral contraceptives. *J Speech Hear Res* 1992; 314: 569-574.
11. Wharton JA, Church GT. : Influence of menopause on the auditory brainstem response. *Audiology* 1990; 29: 196-201.
12. Coleman JR, Campbell D, Cooper A, et al: Auditory brainstem response after ovariectomy and estrogen replacement in rat. *Hear Res* 1994; 80: 209-15.
13. Thakur MK, Sharma PK. : Transcription of estrogen α and β in mouse cerebral cortex: Effect of age, sex, 17 β -estradiol and testosterone. *Neurochemistry International* 2007; 50: 314-21.
14. Hammar ML, Lindgren R, Berg GE, et al: Effects of hormonal replacement therapy on the postural balance among postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1996; 88: 955-60.
15. König O, Rüttiger L, Müller M, et al: Estrogen and the inner ear: megalin knockout mice suffer progressive hearing loss. *FASEB J* 2008; 22: 410-7.
16. Stenberg AE, Simonoska R, Stygar D, et al: Effect of estrogen and antiestrogens on the estrogen receptor content in the cochlea of ovariectomized rats. *Hear Res* 2003; 182:19-23.
17. Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, et al: Age-dependent alterations in the expression of Klotho protein, TRPV5 and TRPV6 in the mouse inner ear. *Acta Otolaryngol* (in press)
18. Vibert D, Sans A, Kompis M, et al: Ultrastructural changes in otococnia of osteoporotic rats. *Audiol Neurotol* 2008; 13: 293-301.
19. Takumida M, Zhang DM. :Electron probe X-ray microanalysis of otoconia in guinea pig inner ear: A comparison between young and old animals. *Acta Otolaryngol* 1997; 117: 529-537.
20. Lee G-S, Jeung E-B. : Uterine TRPV6 expression during the estrous cycle and pregnancy in a mouse model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293: E132-8.

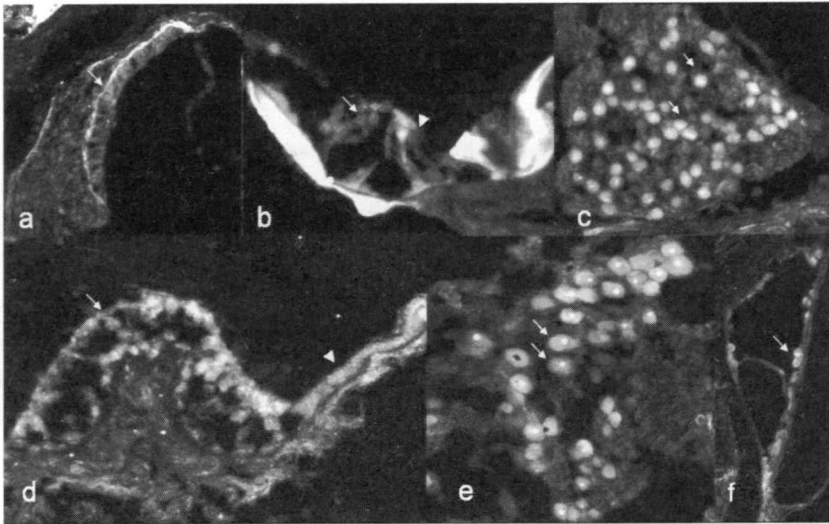


図 1: ER α の発現について

- a: 血管条の基底細胞は強く染色され (→) 辺縁細胞と中間細胞は弱く染色された。
 b: 内有毛細胞 (△)、外有毛細胞 (→) とともに発現し柱細胞、支持細胞にも発現を認めた。
 c: ラセン神経節では特に I 型細胞 (→) が強く染色し、II 型細胞は弱く染色された。ラセン隆起は弱く染まり、らせん靭帯はいくつかの核が染まった。
 d: 前庭では卵形嚢、球形嚢、膨大部の感覚細胞が染まり (→)、また暗細胞 (△) にも適度に染色を認めた。
 e: 前庭神経節は I 型細胞 (→) は強く染まり II 型細胞は弱く染まった。
 f: 内リンパ嚢の上皮細胞も染色を認めた。

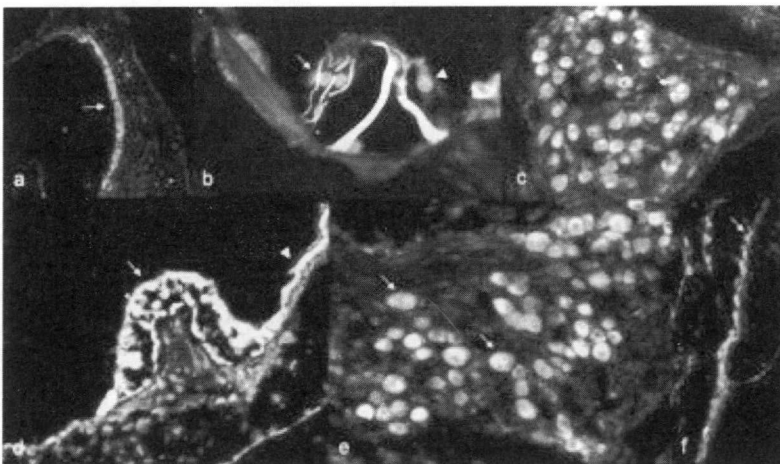


図 2: ER β の発現について

- a: 血管条は基底細胞、辺縁細胞は強く (→) 中間細胞も染色された。
 b: 内有毛細胞 (△)、外有毛細胞 (→)、柱細胞、支持細胞に発現を認めた。
 c: ラセン神経節 I 型、II 型細胞とも強く染色された。ラセン隆起は弱くらせん靭帯はいくつかの核が染まった。
 d: 卵形嚢、球形嚢、膨大部の感覚細胞 (→)、暗細胞 (△) に発現を認めた。
 e: 前庭神経節 I 型 (→)、II 型細胞も染色された。
 f: 内リンパ嚢の上皮細胞も染色を認めた。

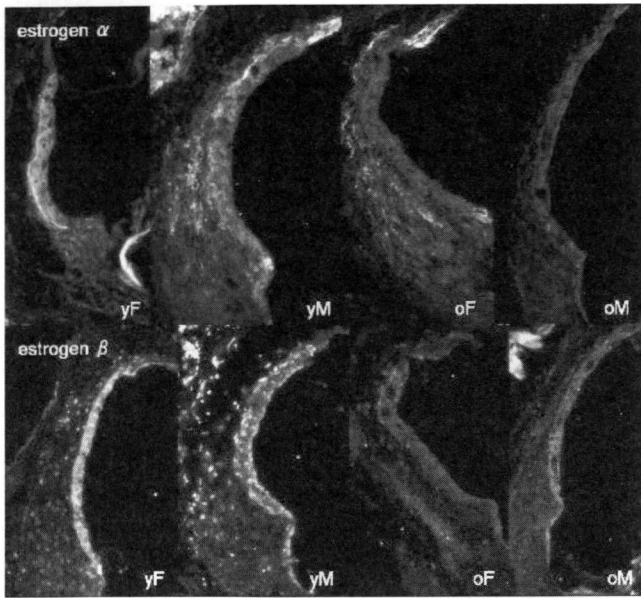


図3. 血管条

ER α は若年雌(yF)に比べ若年雄(yM)が蛍光強度が弱かった。ER β では差は認めなかった。高齢ではER α ER β どちらも雌雄(oF、oM)とも若年に比べ蛍光強度が減少していた。

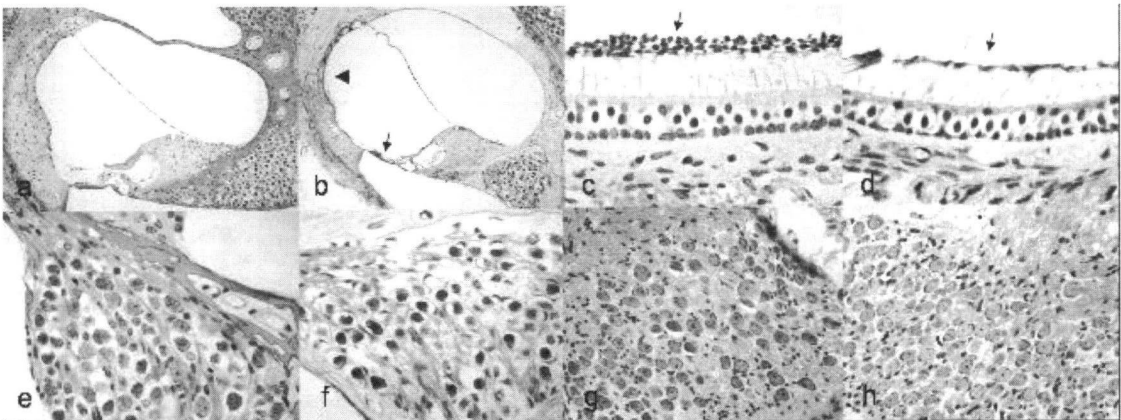


図4. 形態の変化 (トルイジンブルーで染色)

a: 若年蝸牛

b: 老齡蝸牛 蝸牛は退化し有毛細胞は消失し平たく歪んでいた(→)、血管条は薄く萎縮していた(Δ)。

c: 若年卵形囊 耳石(→)。

d: 高齢卵形囊 感覚細胞の減少を認めるが蝸牛より軽度であった。耳石層は薄くなっている(→)。

e: 若年蝸牛神経節

f: 高齢蝸牛神経節 蝸牛神経節の減少を認める

g: 若年前庭神経節

h: 高齢前庭神経節 前庭神経節の減少を認める。

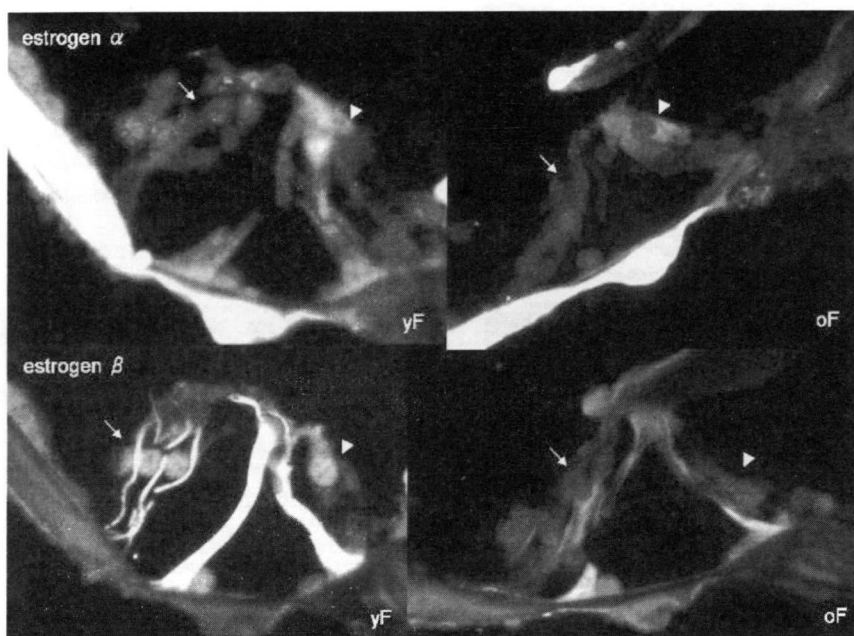


図5. コルチ器

外有毛細胞 (→)、内有毛細胞 (△) とともに高齢でER α ER β どちらも蛍光強度が減少した (yF: 若年雌、oF: 高齢雌)。

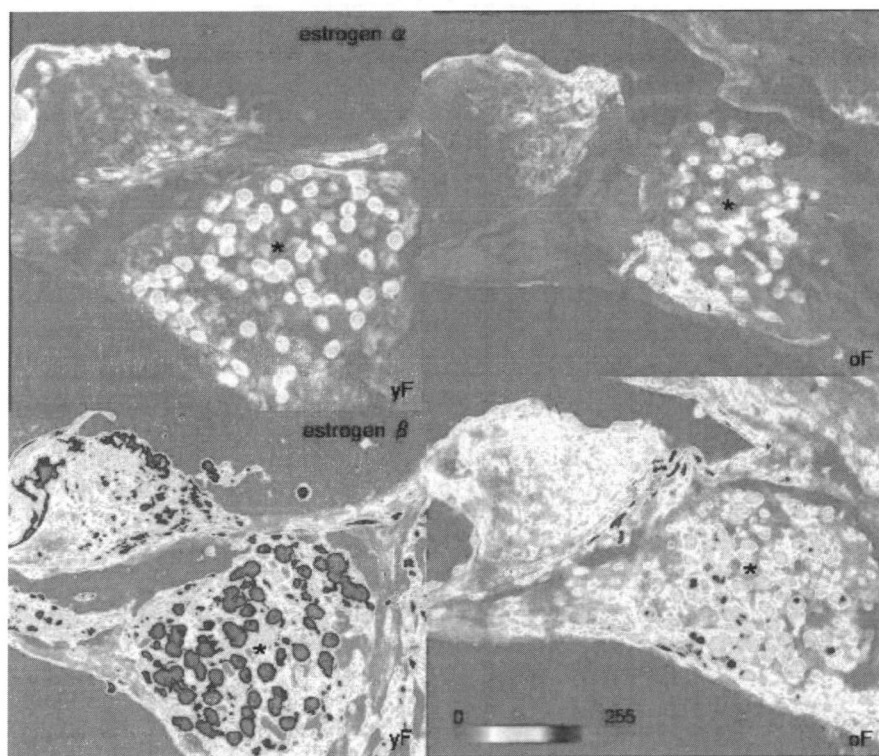


図6. ラセン神経節

高齢でラセン神経節 (*) の減少を認め、ER α ER β いずれも蛍光強度が減少した (yF: 若年雌、oF: 高齢雌)。

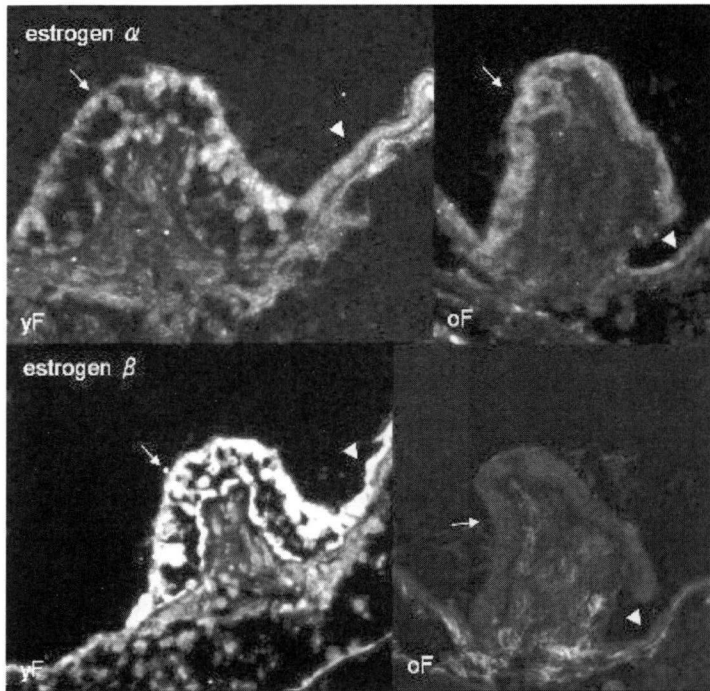


図7. 膨大部

高齢でER α ER β いずれも蛍光強度が減少した(yF:若年雌、oF:高齢雌、感覚細胞(→)、暗細胞(△))。

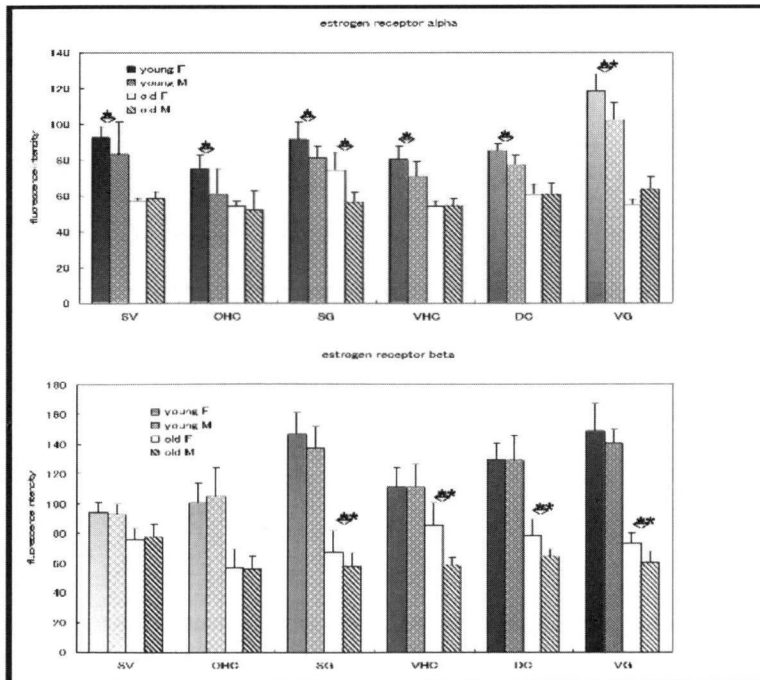


図8. 各部位の蛍光強度の比較

すべての部位で高齢の染色強度が低下していた。(SV: 血管条、OHC: 外有毛細胞、SG: ラセン神経節、VHC: 前庭感覚細胞、DC: 前庭暗細胞、VG: 前庭神経節、*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

11. 生後ラット内耳におけるCOCH ー蛋白と遺伝子発現の比較ー

新藤 晋・池園哲郎・椎葉恭子・関根久遠・八木聰明 (日本医大)

[はじめに]

われわれは、めまいを伴う常染色体優性、非症候性遺伝性難聴のひとつ、DFNA9の病因蛋白(cochlin1)～5)に着目して研究を行ってきた。なかでも内耳発達過程におけるcochlinの発現パターンの解析をテーマの一つとして研究を進めた。ラット及びヒトの“内耳組織”を使用した研究によると、Cochlinの発現は内耳成熟前では検出限界以下であり、内耳の成熟期に発現が増強していた5)。その後、ラットの“外リンパ”をサンプルとして研究を進めた結果、Cochlinの一部は、内耳成熟期前である生後9日目にはすでに高発現しており、その後徐々に減少していくことが分かった。内耳組織の研究結果と異なり、ラット内耳が成熟する前の生後初期から外リンパにCochlinが高発現していることは、我々にとって驚くべき結果であった。

そこで、今回我々は、発生過程のCochlin発現を遺伝子レベルからも検討するため、生後ラットの内耳を用いて、発達過程におけるCOCH遺伝子の発現について検討を行った。

[対象と方法]

生後3、6、9、12、15、24、36、70日のウィスターラットを深麻酔下に断頭し内耳を採取した。採取した組織よりtotal RNAを抽出し、吸光度からRNA濃度を測定した。逆転写反応を行った後、COCHおよびGapdh(内部標準)をターゲットとしたリアルタイムPCRを $\Delta\Delta Ct$ 法で行った。Gapdhを内部標準として補正した後、COCHの発現を各発達日数間で相対比較定量した。

[結果]

COCH遺伝子の発現は生後3日目から認められた。その後生後15日目をピークに徐々に発現は増強していた。生後18日目以降は減少に転じ、生後70日目まで徐々に発現は減少した。(Fig. 1)

[考察]

内耳発達過程におけるCOCH遺伝子の発現について今まで報告はされていない。今回の検討により、ラットにおいてCOCH遺伝子は生後3日目、cochlinは外リンパにおいて生後9日目とそれぞれ内耳が成熟する前から発現していることが明らかとなった。Cochlinの機能は今まではっきりとは分かっていないが、内耳の細胞外マトリックスとして線維細胞周囲の結合組織の特にタイプIIコラーゲンに付着し6, 7)、内耳の成熟とともに発現が増強することから、イオンや水輸送などに関与する蛋白ではないかとの推測もされている。外リンパをサンプルとした生後発達過程における難聴遺伝子関連蛋白の発現パターンの解析は未だ報告されておらず、外リンパには未知の部分が多い。今後、外リンパの研究が発展することにより、cochlinの未知の機能が明らかになる一助となっていくものと思われる。

[結論]

生後ラット内耳発達過程におけるCOCH遺伝子の発現解析をReal Time PCR法を用いて行った。また生後ラットにおいてCOCH遺伝子は生後初期から認められ、その後内耳の成熟期をピークに増加した。

[参考文献]

1)Robertson N G, Hamaker S A, et al. Subcellular localization, 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.
- 2) Ikezono T, Omori A, et al. Identification of the protein product of the COCH gene-hereditary deafness gene- as the major component of inner ear protein, *Biochim Biophys Acta* 2001; 1535: 258-265.
 - 3) Ikezono T, Shindo S, et al. 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: 440-446.
 - 4) Li L. Ikezono T, et al. Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx* 2005; 32: 219-223.
 - 5) Shindo S, Ikezono T, et al. Spatiotemporal expression of cochlin in the inner ear of rats during postnatal development. *Neuroscience letters* 2008; 444: 148-152.
 - 6) Hosokawa S, Mizuta K, Nakanishi H, Hashimoto Y, Arai M, Mineta H, Shindo S, Ikezono T. (2009) Ultrastructural localization of cochlin in the rat cochlear duct. *Audiol Neurootol.* 2009; 15(4):247-253.
 - 7) Mizuta K, Ikezono T, Iwasaki S, Arai M, Hashimoto Y, Pawankar R, Watanabe T, Shindo S, Mineta H. Ultrastructural co-localization of cochlin and type II collagen in the rat semicircular canal. *Neuroscience Letters.* 2008; 434:104-107.

12. 難治性内耳疾患の遺伝子バンク構築研究

宇佐美真一, 工 穰, 鬼頭良輔, 西尾信哉 (信州大), 小川 郁 (慶應大), 渡辺行雄 (富山大), 喜多村 健 (東京医歯大), 中島 務 (名古屋大), 岡本牧人 (北里大), 暁 清文 (愛媛大), 福田 諭 (北海道大), 佐藤宏昭 (岩手医大), 山嵜達也 (東京大), 福島邦博 (岡山大), 水田邦博 (浜松医大), 池園哲郎 (日本医大), 伊藤壽一 (京都大), 柿本章伸 (東京大), 肥塚 泉 (聖マリアンナ医大), 鈴木 衛 (東京医大), 高橋克昌 (群馬大), 工田昌也 (広島大), 武田憲昭 (徳島大), 土井勝美 (大阪大), 山下裕司 (山口大), 高橋正紘 (めまいメニエール病センター), 青木光広 (岐阜大), 長沼英明 (北里大)

[はじめに]

突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫は特定疾患（難病）に含まれ、患者のQOLを著しく低下させるため疾患の克服が期待されている。これらの疾患に関して、従来から種々のアプローチで研究されているにもかかわらず、未だ発症メカニズムは不明である。

本研究では、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫に加え、急性低音障害型感音難聴および良性発作性頭位めまい症を対象に、原因の特定および新たな治療法を開発するために必要な、発症メカニズムの解明等の基礎研究の推進に必要な遺伝子バンクを構築することを目的としている。本研究により、遺伝子バンクが構築され、分子遺伝学的解析によって疾患の発症メカニズムが解明されることで、研究領域全体にブレークスルーがもたらされることが期待される。本研究は、急性高度難聴に関する調査研究班および前庭機能異常に関する調査研究班と連携して、サンプルおよび臨床データの収集を行い、遺伝子バンクを構築することで、短期間で充実したDNAバンクの構築を目指して研究を実施した。

[対象と方法]

本研究の目的は、従来から種々のアプローチで研究されているにもかかわらず、未だ発症メカニズムが未解明の突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫の発症メカニズムの推定および薬剤効果の解明などを研究する際の基盤情報となる生体試料（DNA）の収集およびバンクの構築である。将来的に疾病の易罹患性に関与する遺伝子や薬剤効果と相関する遺伝的要因の探索といった検討を行うためには、遺伝子バンクの構築とともに、臨床データにより検索可能なデータベース化も不可欠である。そこで、本研究では下記の方法により遺伝子バンクおよび臨床データベースの構築を実施した。（図1）

(1) 臨床情報収集のための調査項目の検討

本研究により構築されるDNAバンクは、ゲノムワイドの相関解析や薬剤効果の違いに基づいたファーマコゲノミクス解析に利用されることが想定されるため、DNAの収集とともに臨床情報を収集する必要がある。また、多施設共同研究の体制により研究を行うため、試料収集に先立ち、調査する患者の選定基準を統一するとともに、調査する臨床情報項目を統一する必要がある。

本研究の対象とする疾患は、遺伝的要因と環境的要因の複合により発症すると考えられているため、収集する臨床情報としては、経過・発症から受診までの期間・治療前の聴力・薬剤の種類・投与量・投与期間・聴力の改善の程度・既往歴などの臨床情報とともに、喫煙歴・飲酒歴などの環境情報を含めた。

(2) 遺伝子バンクの技術基盤整備

遺伝子バンクの構築に必要な、コンピュータ等のハードウェアおよびデータベースソフトウェアを整備す

る。また、安定して増幅可能な全ゲノム増幅キットの選定を行なった。

(3) DNA および臨床情報の収集

上記(1)で確定した患者選定基準に基づき、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫と診断された患者を対象に、十分な説明の上、書面で同意を得て臨床情報調査項目の調査・採血を行う。各研究機関において採血時に匿名化を行い個人情報保護に配慮を行う。匿名化された血液は委託業者でDNA抽出を行った後、信州大学に搬送されバンクする。集積されたDNA試料は、全ゲノム増幅を行い、希少なDNA試料を安定に供給可能な体制を整えた。

(4) 臨床情報データベースの構築

構築されたDNAバンクは、将来的にゲノムワイドの相関解析や薬剤効果の違いに基づいたファーマコゲノミクス解析に利用されることが想定されるため、臨床情報のデータベースを構築して、経過・発症から受診までの期間・治療前の聴力・薬剤の種類・投与量・投与期間・聴力の改善の程度・既往歴などの臨床情報、喫煙歴・飲酒歴などの環境情報のどちらでも検索可能なデータベースを構築して、解析対象DNAサンプルを効率的に選び出せるシステムを用意し、DNAバンク構築後の利用を促進する必要がある。本研究では信州大学医学部耳鼻咽喉科の管理運する日本人難聴遺伝子データベースを基にカスタマイズを行い、各疾患の調査項目でクロス検索可能なデータベースの構築を行った。

(倫理面への配慮)

研究の実施に先立ち主任研究機関および共同研究機関とも遺伝子解析倫理委員会に倫理審査の申請を行い、承認を受けた上で実施している。試料の採取に際しては、患者用説明書を用いて十分な説明を行った上、書面で同意を得てから実施する。また、個人情報の保護に配慮し、採血を行う時点で各施設において匿名化を行い個人を特定できないようにした後でDNA抽出およびバンクを行う手順を遵守して実施している。

[結果と考察]

(1) 臨床情報収集のための調査項目の検討

本研究により構築されるDNAバンクは、ゲノムワイドの相関解析や薬剤効果の違いに基づいたファーマコゲノミクス解析に利用されることが想定されるため、DNAの収集とともに聴力像や治療効果などの臨床情報を収集する必要がある。また、多施設共同研究の体制により研究を行うため、試料収集に先立ち、調査する患者の選定基準を統一するとともに、調査する臨床情報項目を統一する必要がある。そこで研究分担者および研究協力者を対象に研究班会議を行い、患者選定基準および調査項目に関する検討を行った。検討結果を基に別紙のように各疾患ごとに臨床情報調査用紙(DNA採血時チェックリスト)を作成した。

臨床調査用紙には患者選定基準を要約したものを掲載することで、試料収集時に用紙が複数にわたることで生じる混乱を回避するよう配慮を行った。また、機能検査に関しても同様に同一様式内に判定基準を掲載することで、共同研究機関での記載の統一化・簡素化につながるよう配慮した。

調査項目としては、患者基本情報(採血日、性別、発症年齢、慎重、体重、生年月日、年齢)、診断基準情報(診断基準による症例の評価、罹患側)、問診調査項目(めまいの有無、耳鳴の有無、家系内罹患者の有無、糖尿病の既往、高脂血症の既往、腎疾患の既往、脳梗塞の既往、心疾患の既往、喫煙習慣の有無、飲酒習慣の有無など)、治療内容(ステロイド、ビタミン製剤、循環改善薬等の薬剤治療の内容など)、聴力検査の結果(初診時聴力、固定時あるいは最新聴力)、機能検査項目(カロリック検査、VEMP、グリセロールテストなど)など、各疾患の特徴に併せて項目を選定した。

(2) 遺伝子バンクの技術基盤整備

遺伝子バンクの構築に関しては、信州大学医学部耳鼻咽喉科学教室が従来より管理・運営している日本人難聴遺伝子データベースが、クロス検索や絞り込み検索も可能であり聴力像や臨床像を基に様々な条件での検索が可能なプラットフォームを利用しており優れていること、また研究期間が短いためゼロからデータベースを構築する時間が無いため既存のデータベースを基盤に整備した方が効率的であることをふまえ、本研究では、日本人難聴遺伝子データベースを基に上記(1)で確定した調査項目に対応するようにカスタマイズを行い、各疾患の調査項目でクロス検索可能なデータベースの構築を行った。

また、本研究により構築される DNA バンクは、発症メカニズムの推定や薬剤効果の解明などを研究する複数のプロジェクトでの利用が想定される。希少疾患の DNA バンクであるため、できるだけ多くの研究プロジェクトに DNA 分与を行うためには、TaqMan 法やマイクロアレイを用いた SNP タイピングなどの比較的短い DNA でも解析可能な研究に関しては、全ゲノム増幅法 (Whole Genome Amplification : WGA) で増幅したゲノム DNA を分与することで、貴重な試料をより多くのプロジェクトに分与することが今後重要となってくる。

現在、候補遺伝子や関連遺伝子解析のツールとして主に用いられているのは、マイクロアレイを用いた SNP タイピングによるゲノムワイド相関解析 (Genome Wide Association Study : GWAS) や Taq Man 法を用いた候補遺伝子解析であるため、これらのアプリケーションに対応可能な全ゲノム増幅キットの使用が望ましい。現在、全ゲノム増幅キットとしては illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GEヘルスケアバイオ) と TITANIUM DNA Amplification Kit (Clontech) が illumina・Affimetrix 社の DNA マイクロアレイを用いる際の基盤技術として比較的良く用いられている。TITANIUM DNA Amplification Kit は PCR ベースの技術であるため技術的信頼度は高いが、反面増幅産物の平均塩基長が非常に短くなる傾向があるため、増幅産物を直接シーケンス法などの比較的長い DNA が必要な研究に汎用することが困難となる。そこで、本研究では illustra GenomiPhi DNA Amplification Kit を採用し全ゲノム増幅を行なった。また、サンプル間のばらつきを軽減し等しい効率で全ゲノム増幅を行うためには、正確な DNA 濃度の測定が必要である。本研究ではインターカーレーター法を用いた 2 本鎖 DNA 特異的定量法である Quant-iT PicoGreen ds DNA 定量キットを用いて 2 本鎖 DNA の濃度を正確に計測して増幅を行う前の定量を行った。

(3) DNA および臨床情報の収集

本研究は、急性高度難聴に関する調査研究班および前庭機能異常に関する調査研究班と連携して試料および臨床情報の収集を行う研究体制であるため、各班の研究打合せの際に共同研究の詳細な内容説明を行うとともに、倫理委員会申請およびサンプル収集の流れに関して打合せを行った。共同研究各施設では試料収集に先立ち、遺伝子解析倫理委員会に倫理審査の申請を行い、承認を得られた施設から順次試料の収集及び臨床情報の収集を開始している状況である。

本研究では、抽出された DNA の品質がその後の解析に影響を及ぼす可能性を十分に考慮し、常に安定した高品質の DNA を得ることを目的に、血液試料の回収および血液試料からの DNA の抽出を外部委託で実施している (図 2)。

倫理委員会で承認の得られた施設では、上記(1)で確定した患者選定基準に基づき、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、急性低音障害型難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫、良性発作性頭位めまい症と診断された患者を対象に、患者用説明用紙を用いて十分な説明を行った上、書面で同意を得て、臨床情報調査項目の調査・採血を行った。研究期間が 6 ヶ月と短いため、多くの施設が倫理委員会の承認待ちあるいは承認が得られたばかりという状況であり、本格的な試料の収集はこれからであるが、現在までに、信州大学を中心に 250 例以上の収集が行われており、今後さらに多くの試料の収集が可能であると考えられる。また、本研究での収集対象試料が DNA であることより、過去に突発性難聴、特発性両側性感音難聴、急性低音障害型難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫、良性発作性頭位めまい症に罹患し、共同研究各施設で加療を受け

た患者に対する後ろ向きの試料収集も可能であるため、今後バンク症例数の増加が期待出来る。

[結論]

本年度の研究により、特定疾患（難病）に含まれている希少な疾患である、突発性難聴、特発性両側性感音難聴、メニエール病、遅発性内リンパ水腫の DNA 試料収集のための基盤体制となる臨床調査項目の決定、試料収集システムの開発、全ゲノム増幅キットの選定、データベースの構築を行い、DNA バンクを構築するための基盤を整備することができた。また、実際に 250 症例を超える試料を収集することができた。

[参考文献]

1. Dean, F. et al., *Genome Research* 11, 1095–1099 (2001).
2. Lizardi, P. et al., *Nat. Genet.* 19, 225–232 (1998).
3. Estaban, J.A. et al., *J. Biol. Chem.* 268, 2719–2726 (1993).
4. Nelson, J.R. et al; *BioTechniques* 32, S44–S47 (2002).