

がら左右に 180 度ずつ回してから引き伸ばしを作成した。先端の形状は、加熱時間や牽引力を調整して行った。液状イオン交換体を挿入するほうの後端を長めに作成し、200°Cに熱したチャンパーに立て、この長いガラス管のみをシラン処理する。短いガラス管には小さく切ったパラフィルムで栓をしておく。短いガラス管は 500 mM NaCl を長いガラス管に液状イオン交換体を満たし銀—塩化銀電極を挿入する。これを記録電極とし、腹部筋上においた銀—塩化銀電極を不関電極とした。記録は FD223a Electrometer (World Precision Instruments, New Haven, CT)にて増幅させ、analog-to-digital converter (Power Lab/4s; Power Lab, Gladstone, Australia)にて変換し記録した。イオン濃度に関しては予め作製した濃度の違う溶液を用いて 37°C下にキャリブレーションを行い、キャリブレーションで得られたグラフより実際の測定値を計算。Double-barreled electrodes で得られた両方の電位の差を計測することで、Nernst の式 $E = RT/ZF \ln ([I]_{out}/[I]_{in})$ により計算し、イオン濃度を測定した。

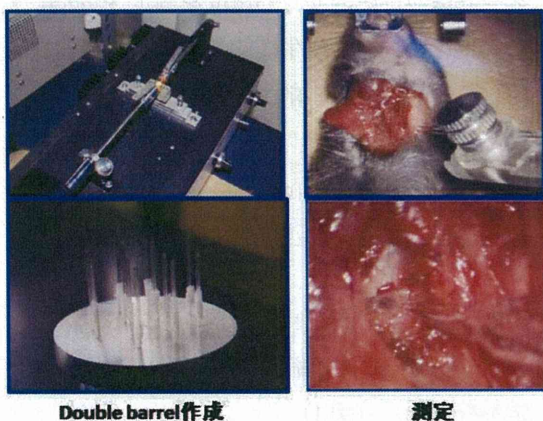


図1 蝸牛内リンパ電位およびイオン濃度の測定

(倫理面への配慮)

本研究には遺伝子組換え実験および動物実験が含まれる。遺伝子組換え実験は、「国立大学法人東北大学遺伝子組換え実験安全管理規程」に基づき、遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た上で行った。動物実験は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき、学内の動物実験委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

C. K⁺イオン濃度および内リンパ電位の測定

対象として、正常マウス (C57BL6J) で測定を行った。(n=3) 正常マウス (C57BL6J) において、前述の方法で K⁺イオンおよび内リンパ電

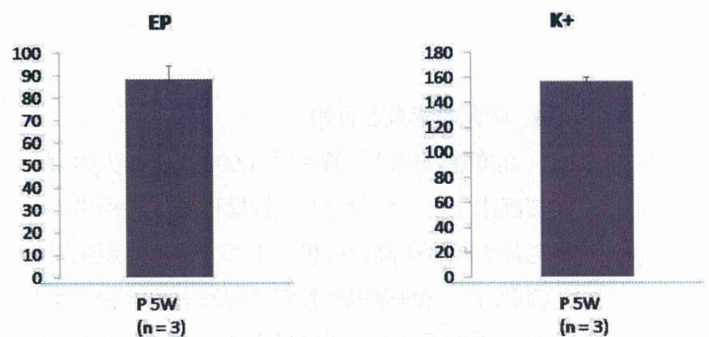


図2 正常マウス(C57BL6J)での測定

位の測定が正確に測定できることが確認された。(図2)

D. 考察

今回の測定法方法により、正常マウス (C57BL6J)において K⁺イオン濃度および蝸牛内リンパ電位が正確に測定できた。

これにより、マウスの K⁺イオン濃度および蝸牛内リンパ電位測定法が確立された。

今後、Pendrin ノックインマウスを繁殖し

個体数が増え次第, Pendrin ノックインマウスの K⁺イオン濃度および蝸牛内リンパ電位の測定を開始する予定である.

E. 結論

マウスにおける K⁺イオン濃度および蝸牛内リンパ電位の測定方法を確立した. 今後 Pendrin ノックインマウスに対する測定を行っていく.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Hasegawa, J., Hidaka, H., Tateda, M., Kudo, T., Sagai, S., Miyazaki, M., Katagiri, K., Nakanome, A., Ishida, E., Ozawa, D., Kobayashi, T., An analysis of clinical risk factors of deep neck infection. *Auris.Nasus.Larynx*. 2011, 38(1): 101-107.
- (2) Hidaka, H., Kuriyama, SI., Yano, H., Tsuji, I., Kobayashi, T., Precipitating factors in the pathogenesis of peritonsillar abscess and bacteriological significance of the Streptococcus milleri group. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011, 30(4): 527-532.
- (3) Kawase, T., Maki, A., Takata, Y., Miyazaki, H., Kobayashi, T., Effects of neck muscle vibration on subjective visual vertical: comparative analysis with effects on nystagmus. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 2011, 268(6): 823-827.
- (4) Ogawa, T., Matsuura, K., Shiga, K., Tateda, M., Katagiri, K., Kato, K., Saijo, S., Kobayashi, T., Surgical treatment is recommended for advanced oral squamous cell carcinoma. *Tohoku J. Exp. Med.* 2011, 223(1): 17-25.
- (5) Ikeda, R., Nakaya, K., Yamazaki, M., Oshima, T., Kawase, T., Kobayashi, T., Effect of vestibular labyrinth destruction on endocochlear potential and potassium concentration of the cochlea. *Hear. Res.* 2010, 265(1-2): 90-95.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

各種化合物の変異 Pendrin の機能回復活性の評価方法の構築

研究分担者 平澤 典保 東北大学 教授

研究要旨

遺伝性難聴の原因遺伝子の1つである Pendrin は、一塩基変異により機能が消失し、その結果として難聴となる。その変異 Pendrin の機能を回復させる薬物を探索するために、ハイスループットな評価系の構築が不可欠である。

これまで、Pendrin の Cl⁻ と I⁻ の交換活性を ¹²⁵I を用いて定量的に解析したが、これらの実験系では野生型 Pendrin と変異 Pendrin の活性の相違、ならびに既にある種の変異 Pendrin の活性を回復させることが報告されているサリチル酸の効果を明確にできず、さらに新たな実験系の開発が必要であると考えられた。そこで本年度は、細胞内 pH の変化、ならびにサリチル酸の HSP の発現について解析したが、感度よく Pendrin の機能回復を明らかにする系の確立にはいたらず、さらに条件検討が必要である。

A. 研究の背景と目的

遺伝性難聴の原因の1つとして Pendrin の一塩基変異が報告されている。Pendrin にはこれまで日本人では 10 種類の変異が報告されており、変異によって機能が消失する結果として難聴になることが明らかにされている。Pendrin の一塩基変異には、Pendrin の細胞内局在を変化させるものがあり、この細胞内局在の変化を指標にして、サリチル酸が変異 Pendrin の機能を回復させることが示唆されている。しかし必要とされるサリチル酸の濃度が高く、副作用の発現が懸念される。そこで、さらに低濃度において Pendrin の機能を回復させる医薬品を開発するために、Pendrin の機能回復活性をハイスループットでスクリーニングできる実験系の開発を試みてきた。Pendrin の Cl⁻ と I⁻ 交換する活性に着目し、¹²⁵I を用いて定量的に解析することを目的として、Wild-type, H723R, および M147V の変異を持つ Pendrin を安定に発現する細胞、さらに ¹²⁵I の取り込みを促進するために NaI

symporter を共発現する細胞を作製し、高感度に Pendrin 活性を測定する系の確立を試みたが、これらの実験系では野生型 Pendrin と変異 Pendrin の活性の相違、ならびに既にある種の変異 Pendrin の活性を回復させることが報告されているサリチル酸の効果を明確にできず、さらに新たな実験系の開発が必要であると考えられた。

そこで本年度は、Pendrin の機能の指標として細胞内 pH の変化について解析した。また、サリチル酸が Pendrin の局在を回復する作用機構は不明であるため、蛋白質の構造の維持・巻き戻す作用を持つ化合物である化学シャペロンとしての作用の有無について heat shock protein の発現を指標に解析した。

B. 研究方法

B.1. 細胞内 pH の測定

B.1.1. 細胞培養と遺伝子導入

HEK293 細胞は、10% FBS, 100 U/ml ペニシリン, 100 µg/ml ストレプトマイシンを含んだ RPMI-1640 培地 (Sigma) を用いて、温度 37°C,

湿度 100%, CO₂ 5%の条件で培養した。遺伝子導入は, p100 dish に HEK293 細胞を 2.5 x 10⁶ 細胞の密度で播種し, 12 時間培養した後, FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Roche) を用いて, 10 μg の Pendrin 発現ベクターを細胞へ導入した。

B.1.2. BCECF-AM を用いた細胞内 pH の測定

細胞内 pH の測定は Biochem J. 434 61-72 (2011)ならびに Bull Sch Health Sci 6: 1-5 (1995)に基づいておこなった。トランスフェクションして 36 時間後, 細胞を浮遊させ, 2x10⁶/ml に調製した。BCECF-AM (0.1 μM) を含む Cl-含有培地 (0.2 mM KH₂PO₄, 0.8 mM K₂HPO₄, 1 mM Calcium gluconate, 1 mM magnesium gluconate, 10 mM HEPES) 存在下で 15 分処理した後で Cl⁻ の同緩衝液 (上記緩衝液の Cl 塩を gluconate 塩とした) に交換して, Cl⁻/HCO₃⁻ の交換反応を細胞内 pH 変化を BCECF の蛍光強度の変化として FACScan で解析した。

なお, 細胞内 pH の検量線は, 各 pH の緩衝液中で, 10 μg/ml の nigericin を加えて作製した。

B.2. HSP の発現

これまで変異 Pendrin の発現細胞として HEK 細胞を用いてきたので, HEK 細胞において HSP 蛋白の発現を解析した。HEK を各種濃度のサリチル酸存在下で 6 時間培養し, HSP70 並びに HSP105 の mRNA を real time PCR 法で定量した。

C. 研究結果

C.1 細胞内 pH 変化

pH 6.2-7.6 において, BCECF の蛍光強度変化が認められるかどうか明らかにするために, 各 pH の緩衝液中の nigericin を加えて検討した。その結果図 1 に示すように良好な検量線を描くことができ, 本法により細胞内 pH をモニターすることが可能であると考えられた。

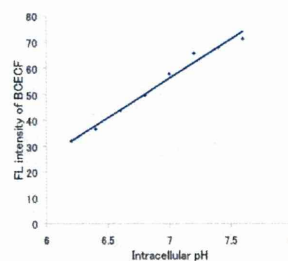


図1 BCECFによる細胞内pHの測定

C.2. 野生型ならびに変異ペンドリン発現細胞での pH 変化

野生型 Pendrin を発現させた細胞では, 図 2 のように, Cl⁻ を含まない緩衝液に交換すると, Cl⁻ が細胞外へ輸送され, かわりに HCO₃⁻ が細胞内に輸送されて細胞内 pH が上昇し, 活性のない変異 Pendrin を発現した細胞ではこの交換作用がないために pH の変化は認められないはずである。実際に測定したところ, 上記のような傾向は見られたものの, 有意差はなく, サリチル酸の効果を評価できるほどの差は認められなかった (図 3)。

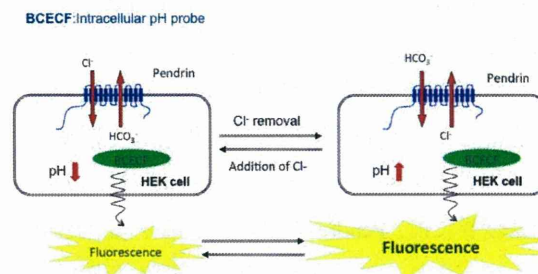


図2 Pendrin機能と細胞内pH

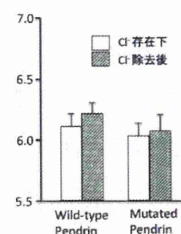


図3 Pendrinならびに変異Pendrinの作用

C.3. HSP の発現

変異 Pendrin の局在変化をサリチル酸が回復するが、この作用が直接 Pendrin に結合してそのコンフォメーションに影響を与えているのか、シャペロン蛋白である HSP の発現を増大させているのかは明らかではない (図4)。そこで、サリチル酸が Pendrin の局在を変化させる濃度において HSP70 および HSP105 を誘導するかどうか、real-time PCR 法により解析した。その結果、HEK 細胞では HSP70 の発現は極めて低いこと、HSP70 ならびに 05 はいずれもサリチル酸により増大しないことが明らかになった (図5)。

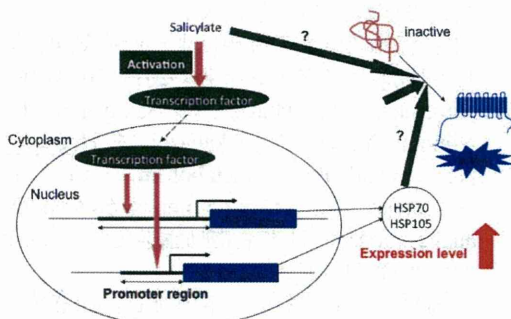


図4 サリチル酸の想定される作用機構

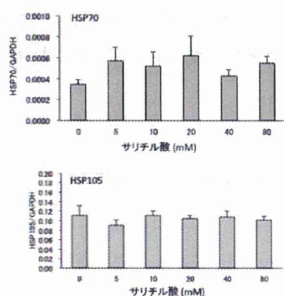


図5 サリチル酸のHSP70/HSP105の発現に対する作用

D. 考察

サリチル酸は変異 Pendrin の細胞内局在を回復する作用があるが、その機能の回復を誘導するかどうかについては未だ十分には明らかではない。そこで本年は細胞内 pH を指標としてか Pendrin の機能を測定する系の開発を試みた。しかし、本法においても Pendrin および変異 Pendrin の機能差は十分には明らかにはできず、評価系

として適していないことが示唆された。Pendrin の発現量や、HEK をモデル細胞として用いる点に問題がある可能性があり、実際の内耳細胞を用いた実験系を構築する必要があるのかもしれない。

サリチル酸はまた HSP の発現も誘導しなかった。この結果は、サリチル酸の作用機構として、Pendrin と直接結合している可能性を示唆している。実際、化学シャペロンとして蛋白変性を抑制するものは基質結合部位に結合することにより構造を安定化させるものが知られており、サリチル酸もそのような作用機構を有しているのかもしれない。

E. 結論

変異 Pendrin の機能を回復させる低分子化合物の探索は、遺伝子疾患の薬物による治療を可能にするもので、大変重要な試みである。しかし、優れた医薬品候補化合物を見いだすためにはそのスクリーニング系の構築が最も重要であり、さらに作用機構の解明とともに解析を進めていく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Mizuno, N., Suzuki, T., Hirasawa, N., Nakahata, N., Hetero-oligomerization between adenosine A1 and thromboxane A2 receptors affects cellular signal transduction on stimulation with high and low concentrations of agonists for both receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2012, 677:5-14.
- (2) Satou, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Tanaka, H., Endo, Y., Saito, S., Iwatate, Y., Leonard, W.J., Hirasawa, N., Induction of thymic stromal lymphopoietin production by xylene and exacerbation of picryl chloride-induced allergic inflammation in mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2011, 157:194-201.
- (3) Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Hiratsuka, M.,

- Hirasawa, N., Enhancement of nickel elution by lipopolysaccharide-induced inflammation. *J. Derm. Sci.* 2011, 62:50-57.
- (4) Tanaka, R., Goi, Y., Ishihara, K., Ueda, K., Narushima, T., Ohtsu, H., Ohuchi, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N., Assessment of the release of nickel from biomaterials in vivo and in vitro: enhancement by lipopolysaccharide. *Inflam. Regene.* 2011, 31:302-306.
- (5) Sato, N., Ishihara, K., Hiratsuka, M., Hirasawa, N., Induction of thymic stromal lymphopoietin by chemical compounds in vivo and exacerbation of allergy. *Inflam. Regene.* 2011, 31:184-188.
- (6) Hong, J., Aoyama, S., Hirasawa, N., Zee, O., Ishihara, K., Hashida, C., Kimura, M., Seyama, T., Ohuchi, K., Suppression of intracellular calcium levels and inhibition of degranulation in RBL-2H3 mast cells by the sesquiterpene lactone parthenolide. *Planta Medica.* 2011, 77: 252-256.
- (7) Tamaki, Y., Honda, M., Muroi, Y., Arai, T., Sugimura, H., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M., Novel Single Nucleotide Polymorphism of the CYP2A13 gene in Japanese individuals. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics.* 2011, 26: 544-547.
- (8) Tamaki, Y., Arai, T., Sugimura, H., Sasaki, T., Honda, M., Muroi, Y., Matsubara, Y., Kanno, S., Ishikawa, M., Hirasawa, N., Hiratsuka, M., Association between Cancer Risk and Drug Metabolizing Enzyme Gene (CYP2A6, CYP2A13, CYP4B1, SULT1A1, GSTM1, and GSTT1) Polymorphisms in Japanese Cases of Lung Cancer. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics.* 2011, 26:516-522.
- (9) Honda, M., Muroi, Y., Tamaki, Y., Saigusa, D., Suzuki, N., Tomioka, Y., Matsubara Y., Oda, A., Hirasawa, N., Hiratsuka, M., Functional characterization of CYP2B6 allelic variants in demethylation of anti-malarial artemether. *Drug Metab. Dispos.* 2011, 39:1860-1865.
- 2) 一般講演**
- (1) 平塚真弘, 本田雅志, 三枝大輔, 鈴木直人, 富岡佳久, 平澤典保, 抗マラリア薬アーテメーター代謝における CYP2B6 遺伝子多型バリエーションの機能解析, 第 32 回日本臨床薬理学会年会, 2011. 12. 浜松.
- (2) 瀬川良佑, 平澤典保, 空気嚢型炎症モデルにおける TSLP 産生制御機構の解析, 第 50 回記念日本薬学会東北支部大会, 2011. 10. 仙台.
- (3) 佐藤大樹, 平澤典保, 前脂肪細胞株 OP9 における TLR4 刺激による IL-6 産生: HDAC 阻害薬の効果, 第 50 回記念日本薬学会東北支部大会, 2011. 10. 仙台.
- (4) 平塚真弘, 田巻佑一朗, 新井富生, 梶村春彦, 平澤典保, 肺がん発症リスクと薬物代謝酵素遺伝子多型との関連, 第 21 回日本医療薬学会年会, 2011. 10. 神戸.
- (5) 大澤雄亮, 平澤典保, マウスアトピー性皮膚炎モデルにおけるヒスタミン H1 および H4 受容体拮抗薬の併用による治療効果, 第 15 回日本ヒスタミン学会, 2011. 10. 盛岡.
- (6) Hiratsuka, M., Muroi, Y., Sakuyama, K., Niinuma, Y., Saito, T., Takahashi, M., Hirasawa, N., Oxidative metabolism of n-desmethyltamoxifen to endoxifen by 50 Cyp2D6 allelic variants. 日本薬物動態学会第 26 回年会, 2011. 11. 広島.
- (7) 高橋亜希, 平塚真弘, 本田雅志, 田巻佑一朗, 室井祐佳, 新沼優衣, 眞野成康, 平澤典保, 東北大学病院における腎機能低下患者の割合と腎排泄型薬剤の使用状況調査, 第 5 回日本腎と薬剤研究会学術大会, 2011. 9. 北九州.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

学会発表

1) 招待講演、シンポジウム

- (1) 平澤典保, 特別講演, 化学物質による TSLP 産生とアレルギー増悪化, 平成 23 年度日本薬学会東北支部講演会第 33 回東北薬学セミナー, 2011. 12. 仙台.
- (2) 平澤典保, 金属アレルギーの新たなアプローチ, 第 15 回日本ヒスタミン学会シンポジウム「炎症・アレルギーを巡る最近のトピックス」, 2011. 10. 盛岡.

化合物の設計と合成

研究分担者 中村 浩之 学習院大学 教授

研究要旨

遺伝性難聴。患者の大半は内耳に発現する膜タンパク質 Pendrin 及び Connexin26 の遺伝子変異に起因する。遺伝子を操作せずに難聴を治療する方法を開発する画期的な方法として、本研究代表者により治療薬を内耳局所に投薬するための体内埋め込み式のマイクロポンプシステムが提案され、本研究事業によりその実用化研究が進められている。本分担研究では、それと相補的な役割を持つ薬剤開発を行う。本研究では、Pendrin 遺伝子の変異により難聴となった患者の持つ遺伝子そのものではなく、その遺伝子から産生される機能を失った変異 Pendrin を標的にし、その機能を回復させるシャペロン活性を有する化合物を探索し創薬に結びつける。鎮痛作用を有することが古くから知られているサリチル酸が、この機能を失った変異 Pendrin に対し、シャペロン活性作用を有することが、研究代表者の先行研究よりわかっている。本研究では、サリチル酸よりも高いシャペロン活性を有する化合物を見出すために、そのアッセイ方法を確立することを目的として、膜タンパク質 Pendrin およびその変異体定常発現株の樹立を行った。

A. 研究の背景と目的

遺伝性難聴患者の大半は内耳に発現する膜タンパク質 Pendrin 及び Connexin26 の遺伝子変異に起因する。本研究代表者らのこれまでの研究により、Pendrin と相同性が高く、内耳外有毛細胞に発現する膜タンパク質 Prestin (SLC26A5) において、変異により Prestin が細胞内でミスフォールディングして機能を失う場合、分子シャペロンとして働く物質を細胞に投与すると、変異 Prestin がリフォールディングし、その機能が回復することが発見された。そこで、変異 Prestin と同様にミスフォールディングした変異 Pendrin をリフォールディングさせ、それらの機能を回復させる薬剤の開発を目的とする。このような薬剤が見出すことができれば、本研究代表者らにより進められているマイクロポンプシステムと組み合わせることにより、遺伝性難聴の治療においてQOLの向上が期待できる。

これまで鎮痛作用を有することが古くから知られているサリチル酸が、Pendrin 変異体に分子シャペロンとして働き膜移行性を促しその機能発揮に関わっていることが本研究代表者らにより明らかにされてきている。本研究では、サリチル酸よりも高いシャペロン活性を有する化合物を見出すために、そのアッセイ方法として膜タンパク質 Pendrin およびその変異体定常発現株の樹立を行い、遺伝性難聴の革新的治療法の創生を目指す。

B. 研究方法

サリチル酸が Pendrin 変異体に分子シャペロンとして働き膜移行性を促しその機能発揮に関わっていることが、本研究事業の代表者・和田および分担者・平澤、石原によって明らかとなった。具体的には、HEK293 細胞に発現させた 10 種類のミスセンス変異 Pendrin (P123S, M147V,

K369E, A372V, N392Y, C565Y, S657N, S666F, T721M, H723R)のうち, 8種類の変異体(P123S, M147V, A732V, N392Y, S657N, S666F, T721M, H723R)が細胞質内に蓄積されており, 更に, サリチル酸により4種類の変異体(P123S, M147V, S657N, H723R)が細胞内から細胞膜に移行することが見出された. これらの変異株のうちから, P123S 変異体定常発現株を, また比較対象に野生型 Pendrin の定常発現株を樹立することを計画した.

B.1. 野生型 Pendrin 定常発現株の樹立

本研究事業の代表者・和田および分担者・平澤, 石原によって作成された Pendrin-3xFLAG が挿入されているプラスミドベクター pcDNA3.1(+)を FuGENE HD を用いて HEK293 細胞へ遺伝子導入を行った.

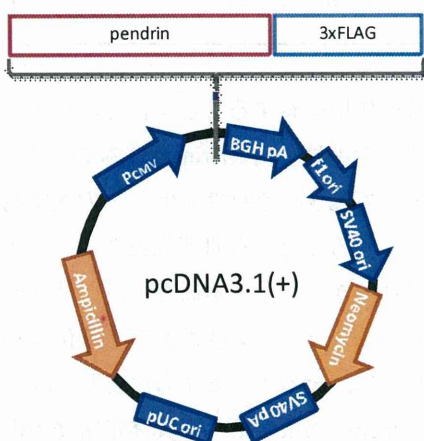


図1. Pendrin-3xFLAG が挿入されているプラスミドベクター pcDNA3.1(+). Neomycin および Ampicillin 耐性遺伝子が組み込まれている.

HEK293 細胞は, 10% FBS, 100 U/ml ペニシリン, 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含んだ RPMI-1640 培地 (Sigma) を用いて, 温度 37°C, 湿度 100%, CO₂ 5% の条件で培養した. 遺伝子導入は, 96 穴プレートに HEK293 細胞を 2×10^5

cell/ml \times 100 μ L (2×10^4 cell/well) 細胞の密度で播種し, 12 時間培養した後, FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Promega) を用いて, 1 穴あたり 0.1 μ g の Pendrin 発現ベクターを細胞へ導入した.

抗生物質 G418 を用いたスクリーニングにより, 耐性遺伝子導入された細胞を選択し, 限界希釈法によってクローニングをおこない, 単一クローン細胞株を作成した.

B.2. Pendrin 変異体 P123S 定常発現株の樹立

野生型 Pendrin 定常発現株の樹立と同様の方法により, HEK293 細胞に FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Promega) を用いて, 1 穴あたり 0.1 μ g の Pendrin 発現ベクターを細胞へ導入した.

抗生物質 G418 を用いたスクリーニングにより, 耐性遺伝子導入された細胞を選択し, 限界希釈法によってクローニングをおこない, 単一クローン細胞株を作成した.

B.3. 免疫蛍光染色

遺伝子限界希釈法によってクローニングを行った野生型 Pendrin 定常発現株および Pendrin 変異体 P123S 定常発現株 HEK293 細胞を 96 穴のプレートに移し, 12 時間の培養後, サリチル酸ナトリウム(10 mM)を添加し, 更に 12 時間培養した. 細胞を 4%パラホルムアルデヒドで 30 分間, 室温でインキュベーションして細胞を固定し, さらに 0.5% Triton-X 100 で 30 分間処理をした. 抗体の非特異的結合を避けるため, ブロッキング溶液 (1%BSA 含有 PBS) で 30 時間, 37°C でインキュベーションした. PBS で洗浄後, 抗 FLAG M2 抗体 (Sigma) で 1 時間, 37°C でインキュベーションし, PBS で洗浄後, 抗マウス IgG FITC 標識二次抗体 (Sigma) で 1 時間, 37°C でインキュベーションした. 最後に, PBS で洗浄した後, 蛍光顕微鏡で蛍光画像を観

察した。

(倫理面への配慮)

本研究には遺伝子組換え実験が含まれる。遺伝子組換え実験は、「学習院大学遺伝子組換え実験安全管理規程」に基づき、遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

C.1 野生型 Pendrin 定常発現株の樹立

抗生物質 G418 を用いたスクリーニングにより、耐性遺伝子導入された細胞を選択し、限界希釈法によってクローニングをおこなった。細胞名は Pendrin の変異体名 (A), トランスフェクションした 96 ウェルの位置 (X), 限界希釈時濃度 (B cell/well), およびそのクローニングを行った 96 ウェルの位置 (Y) を基にして、「AX.BY」とした。例えば、「PF1.1D6 細胞株」は、P123S Pendrin プラスミドベクターをトランスフェクションしたとき F1 のウェルに存在し、1 cell/well の濃度で限界希釈クローニングを行ったプレートの D6 のウェルに存在した細胞を意味する。

野生型 Pendrin 定常発現株 HEK293 細胞の抗 FLAG 抗体での免疫染色を図 2 に示す。クローニングの結果、WC2.3A7 細胞株、WC2.3A10 細胞株、WC1.1D4 細胞株において、Pendrin の細胞膜上での局在が見られた。

一方、Pendrin 変異体 P123S 定常発現株 HEK293 細胞の抗 FLAG 抗体での免疫染色を図 3 に示す。クローニングの結果、PF1.10A1 細胞株および PF1.1D6 細胞株において、細胞質において Pendrin の局在が見られたが (図 3 (A) および (C)), サリチル酸ナトリウム投与後 12 時間培養したところ、図 3 (B) および (D) に示すように、Pendrin 変異体 P123S タンパクは、細胞膜上へ移行していることが分かる。

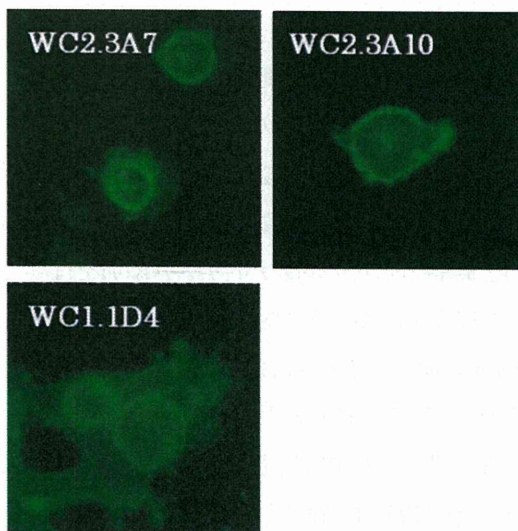


図 2. 野生型 Pendrin 定常発現株 HEK293 細胞の抗 FLAG 抗体での免疫染色

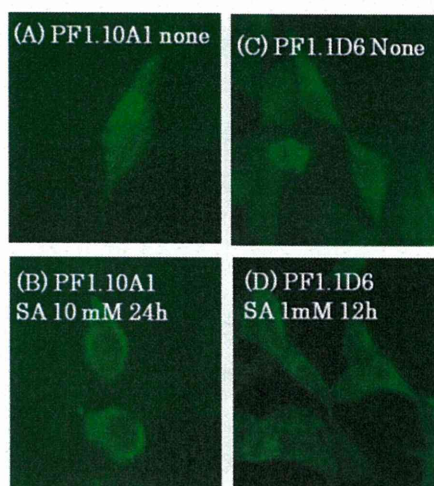


図 3. 変異体 P123S 定常発現株 HEK293 細胞の FLAG 抗体での免疫染色。(A)(C) サリチル酸ナトリウム投与前、(B)(D) サリチル酸ナトリウム投与 12 時間後

D. 考察

従来の方法では、Pendrin プラスミド DNA をトランスフェクションし、その後サリチル酸ナトリウムを投与、免疫染色を行うことにより Pendrin の細胞内局在を評価してきた。これに対し、今回我々が行った方法では、G418 によるスクリーニングとその後のクローニングを行うことにより、Pendrin を高発現している細胞株を樹

立することができた。

細胞株の特徴として、野生型 Pendrin 定常発現株は細胞膜に Pendrin の局在が確認されたのに対し、Pendrin 変異体 P123S 定常発現株は細胞質の核周辺に Pendrin の蓄積がみられた。これに 12 時間のサリチル酸ナトリウム添加を行うと、細胞質の Pendrin の減少と、細胞膜での Pendrin の増加が確認された。

また、サリチル酸ナトリウムを 12 時間より短い時間で投与した場合にも、Pendrin の局在変化が確認 (1 時間、6 時間でも局在変化)された。

以上の結果から、Pendrin 変異体 P123S 定常発現株は、本研究におけるトランスフェクションのステップが不要であり、実験開始から短時間で薬剤投与を速やかに行い、迅速に評価することができるため、様々な化合物を用いたアッセイにおいて有用であることが考えられる。

E. 結論

本研究において、我々はヒト腎臓由来の細胞株である HEK293 細胞に Pendrin-3xFLAG が挿入されているプラスミドベクター pcDNA3.1(+) を導入しクローニングすることで、野生型 Pendrin 定常発現株ならびに P123S 定常発現株を樹立することに成功した。野生型 Pendrin 定常発現株 HEK293 細胞では Pendrin が膜領域に局在して存在し、P123S 定常発現株 HEK293 細胞では細胞質に存在することを確認できた。さらに、P123S 定常発現株へのサリチル酸ナトリウム処理により、膜移行する個体を得ることができた。このことにより、化合物スクリーニングが可能となり、本研究結果は、サリチル酸よりも分子シャペロン活性の高い化合物探索研究へ大きく貢献すると確信する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Nakamura, H., Horikoshi, R., Usui, T., Ban, H. S., Selective Inhibition of EGFR and VEGFR2 Tyrosine Kinases Controlled by a Boronic Acid Substituent on 4-Anilinoquinazolines. *Med. Chem. Commun.* 2011, 1: 282-286.
- (2) Genady, A. R., Nakamura, H., Amphiphilic Allylation of Arylidene-1,3-oxazol-5(4H)-one Using Bis- π -allylpalladium Complexes: An Approach to Synthesis of Cyclohexyl and Cyclohexenyl α -Amino Acid. *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9: 7180-7189.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝性難聴モデルマウスを用いた分子病態解析および新規治療法の開発

研究分担者 池田勝久 順天堂大学 教授

研究要旨

遺伝性難聴は約1,000出生に1人（本邦では約年間700人に相当）と高頻度に発症し聴覚と言語発育の著しい障害を引き起こす極めて高度なQOLの低下をもたらす。遺伝性難聴の根本的治療法は長年にわたり研究されており、近年では再生医療の遺伝性難聴への応用が大きく期待されている。神谷は、蝸牛線維細胞を標的とし薬剤により誘発した難聴モデルの再生治療実験を昨年初めて成功し報告している（Kamiya et al. *Am. J. Pathol.* 2007）。しかし遺伝性難聴に関しては未だ根本的治療の道を開く研究成果は皆無である。

本研究では我々が開発した蝸牛線維細胞変性を有するヒト非症候性難聴 DFN3 モデル, Brn4 欠損マウス（Minowa, Ikeda et al. *Science* 1999）、並びに世界で最も高頻度に出現する難聴原因遺伝子であるコネクシン 26（Cx26）遺伝子変異の疾患モデルとして開発した遺伝子欠損(Cx26KO)マウスおよび優性阻害型トランスジェニック(Tg)マウス（*Hum Mol Genet.* 2003）を新規治療法の対象として用いることとした。Brn4 および Cx26 はいずれも前述した新規移植法のターゲットである蝸牛線維細胞に主に発現しているため、これら三種類の遺伝性難聴モデル（Brn4KO, Cx26KO, Cx26Tg）に対し、研究代表者が開発した有効性の高い幹細胞移植法を適用するという最も成功の可能性が高い組み合わせにより、これまで成功例のない遺伝性難聴に対する根本的治療法の開発を試みた。

骨髄間葉系幹細胞移植法では、移植前に蝸牛線維細胞のみに軽度な可逆的損傷を与えその損傷部に幹細胞を置換することを可能とした。また、近年新規に開発され成体細胞から樹立可能な新規多能性幹細胞 iPS 細胞もその多分化能から将来的な応用性が高く内耳移植への適用も非常に有効であると予想される。これらの幹細胞を遺伝性難聴マウスへの新規細胞移植法に適応することにより単に細胞を補うだけでなく遺伝子変異を持つ異常細胞を正常細胞に置換するという全く新しい観点での方法論の発展が期待できる。将来的には多様な遺伝性難聴患者に対し、薬物治療、遺伝子治療、組織移植とは異なり、組織損傷の種類と度合いに対応した低リスクで高い効果を持つ治療法の開発が期待できる。

現在までの主な研究では、ヒト遺伝性難聴で最も高頻度で発生する難聴原因遺伝子である Gjb2(コネクシン 26 遺伝子)の内耳特異的欠損マウスを完成させ、ヒト遺伝性難聴と病態がほぼ一致した遺伝性難聴モデルであることを機能および病理解析により確認している。同マウスは現存する遺伝性難聴モデルの中で最もヒト遺伝性難聴と病態が近似していると考えられ、新規治療法開発の研究に最適であると考えられた。さらに同モデルマウスおよび正常マウスを用いた骨髄間葉系幹細胞移植の検討により蝸牛組織内への細胞導入率を飛躍的に高める方法が開発された。これを応用しさらに効果を増強させることにより遺伝性難聴における正常細胞への細胞置換法が確立し、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善が一層現実化すると考えられる。

上記の方法を用いて新規開発した Cx26 欠損マウスへの CCR2 遺伝子導入間葉系幹細胞（MSC-CCR2）の導入を試みたところ移植した MSC-CCR2 は内耳組織を生着し細胞間に欠損していた Cx26 が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

A. 研究目的

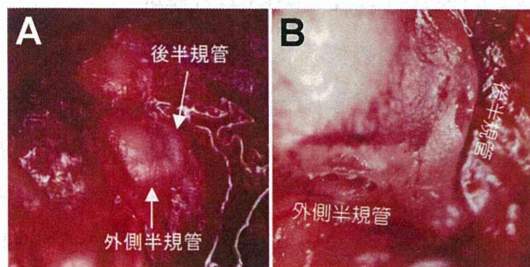
感音性難聴の原因は多岐にわたるが、近年の遺伝子改変動物開発技術の向上や多種のモデル動物の開発により多くの病態メカニズムが解明に近づいている。全ての先天性疾患の中でも頻度の高い遺伝性難聴においては、難聴家系や突然変異難聴マウスの遺伝子解析によって多くの遺伝性難聴原因遺伝子が同定されている。初期に発見された遺伝性難聴の原因の多くは内耳有毛細胞の変性または機能的・形態的異常であったため多くの研究者が有毛細胞を中心に難聴の病態メカニズム解明に取り組んできた。哺乳類の有毛細胞は再生能力を持たないため遺伝子導入などによる有毛細胞再生の誘導も盛んに研究されてきた。その一方で内耳への細胞移植による有毛細胞の修復の試みも行われているが、特殊なリンパ液で満たされた内耳の構造的な特徴から、聴力を保持しつつ標的部位に移植細胞を到達させ分化させることは容易ではない。そのため有毛細胞の修復には多種のモデル動物を用いた多くの検討実験が必要と考えられる。近年有毛細胞以外にも蝸牛線維細胞などの機能異常が単独で難聴病態の引き金となることも明らかとなっており多様な治療戦略が求められている。幹細胞の損傷部への移動能力や組織環境（ニッチ、niche）による分化誘導を十分に検討すれば細胞治療は内耳組織変性に対する治療にも応用可能と考えられる。著者らの報告では実験的に蝸牛線維細胞のみに傷害を与えたラットへ半規管外リンパ液を経由した細胞液還流法を用いることにより、損傷部の修復と聴力回復率を高めることに成功した。

現在はヒト疾患に近い遺伝性難聴モデル動物への骨髄間葉系幹細胞に取り組んでいる。また、サル類を用いた細胞移植アプローチの検討も今後応用性を高めるためには非常に重要であるため現在、カンクイザルによる検討を行っている。各種のモデル動物の特徴を考慮した細胞移植実験検討を積み重ねることにより、将来的には有毛細胞も標的とした多様な難聴に対する聴力回復も不可能ではないと考えられる。

B. 研究方法

マウス骨髄間葉系幹細胞調整および標識
生後 8 週齢の C57BL/6 マウス大腿骨を摘出、細胞培養液での骨髄還流により骨髄細胞を得た。同細胞に EGFP（緑色蛍光）または DsRed1（遠赤色蛍光）発現レトロウイルスにより標識した。

正常マウスおよび遺伝子改変マウス（Connexin26 R75W-Tg, Connexin26 KO）を麻酔後、後半規管および外側半規管に小孔を開け、外側半規管より半規管膨大部へ向けて微小チューブを挿入。1 X10⁵ cells in 20μl の間葉系幹細胞細胞液を 10 分間の注入により還流する。移植後 1 週間毎に聴力を聴性脳幹反応 (ABR) および歪成分耳音響放射 (DP-OAE) により測定。細胞移動を観察するため HcRed1 標識した間葉系幹細胞細胞液を移植 2 週間後に追加投与する実験群を設ける。移植 4 週間後に蝸牛を採取する。上記と同様の方法で移植 6 週間までの長期モニタリングを平行して行った。



A. 経半規管細胞移植時の成熟マウス半規管。B. 後半規管および外側半規管に細胞液を還流するための小孔を開け一方に微小チューブを挿入し細胞液を注入、もう一方より外リンパ液を排出する。

C. 研究結果

移植用幹細胞の樹立

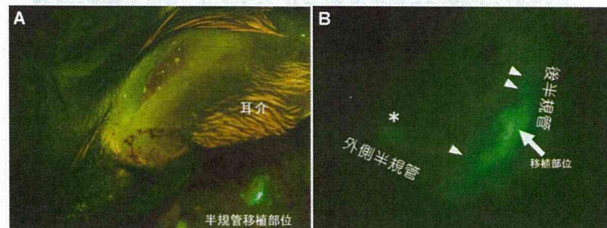
まず C57BL/6 マウス由来 H1/A 骨髄間葉系幹細胞株に EGFP 遺伝子をレトロウイルスにて発現させ、安定的に強い緑色蛍光を持つ細胞をクローニングした。さら H1/A より遠赤色光を発する HcRed 発現細胞も同様の方法にて作成し移植用細胞を樹立した。



マウスへ骨髄間葉系幹細胞およびリンパ液漏出を防ぐために使用した細胞塊。

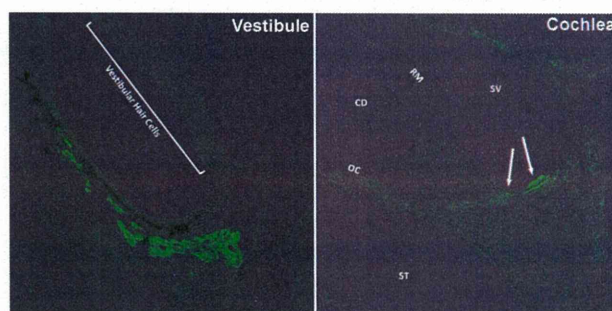
骨髄間葉系幹細胞の幹細胞の経半規管移植
後半規管および外側半規管に小孔をあけ、後半規管より 2×10^5 cells を還流し、小孔の修復のために MSC の無接着培養により作成した細胞塊 (cell sphere, 上図) を小孔部に挿入することにより術後のリンパ液の漏出を抑えた。同方法により挿入された移植細胞塊は術後 2 週間においても半規管組織内において維持、さらには進展していることが確認されている (図)。

移植細胞の検出

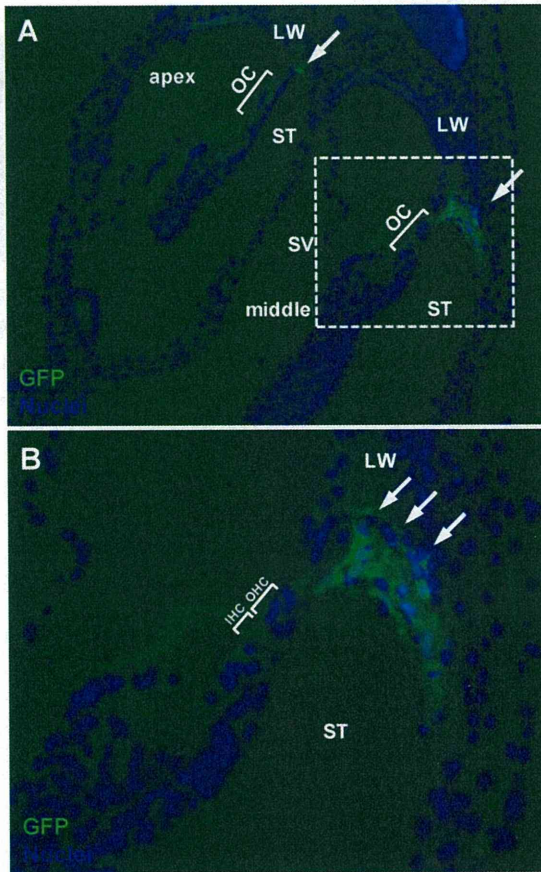


マウスへの骨髄間葉系幹細胞塊移植 2 週間後の移植部蛍光実体顕微鏡像 (A) および拡大像 (B)。耳後部切開により半規管を露出し、移植細胞塊が拒絶されずに生着していることを確認。さらに移植部位より播種性に進展し、コロニーを形成 (矢頭)。後半規管から外側半規管にも移行している (*)。

経半規管移植後の組織を抗 GFP 抗体での免疫蛍光染色により移植細胞の組織進入を解析したところ、前庭線維細胞組織内、蝸牛ラセン板縁組織内に移植細胞の生着を確認した。移植後の聴力を術後 8 週間までモニタリングしたが、手術による聴力低下は正常動物でも難聴モデルにおいても見られなかった。現在、細胞導入効率を向上させるために Rho 活性化剤で細胞運動・浸潤を高めることが知られる LPA (Lysophosphatidic acid) を幹細胞と同時投与を行っている。同薬剤による導入効率の向上は現在のところ認められていない。しかしミトコンドリアトキシンである 3NP で蝸牛に軽度損傷を与えたマウスでは導入効率が大きく上昇した。



内耳有毛細胞近傍に侵入した骨髄間葉系幹細胞
前庭 (Vestibule) および蝸牛 (Cochlea) の有毛細胞近傍の組織内に侵入していることが確認された。このような組織侵入率を飛躍的に高める検討を行っており、着実に導入効率が高まっている。Vestibular hair cell; 前庭有毛細胞、Cochlear hair cell; 蝸牛有毛細胞



3NPで蝸牛外側壁(Lateral Wall, LW)にごく軽微な損傷を与えることにより骨髄間葉系幹細胞(GFP標識、緑)の細胞侵入促進に成功した。3NP投与により外側壁において走化性因子の発現が誘導されることも確認されているため、蝸牛鼓室階(Scala Tympani, ST)の外リンパ液において浮遊していた細胞が外側壁側に誘導され外側壁組織内に侵入したと考えられる。

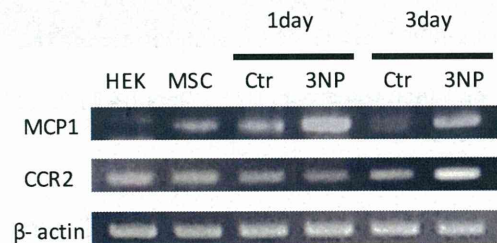
(A) 蝸牛頂回転(apex)および中回転(middle)の鼓室階側から外側壁へ細胞が接着し侵入している(矢印)。

(B) A点線枠の拡大像。複数の細胞が外側壁組織内へ浸潤している(矢印)。OC: Organ of Corti(コルチ器), IHC: Inner Hair Cell(内毛細胞), OHC: Outer Hair Cell(外毛細胞), SV: Scala Vestibuli(前庭階)。この誘導機序を応用して骨髄間葉系幹細胞の内耳組織内への誘導効率および細胞置換を飛躍的に高めることができると考えられる。

骨髄間葉系幹細胞誘導因子の解析

蝸牛線維細胞の修復に関わる遺伝子のスクリーニングを目的として3NP投与後蝸牛外側壁組織のDNAマイクロアレイ解析が行われ、発現上昇因子として単球走化活性因子MCP1(Monocyte Chemotactic Protein-1)がスクリーニングされた(Kamiya et al. *Am J Pathol.* 2007)。

我々はMCP1およびその受容体であるCCR2に関しRT-PCRによりそれらの発現動態を解析した。その結果、蝸牛線維組織損傷におけるMCP1の急激な発現上昇およびそれに引き続くMCP1受容体であるCCR2の発現上昇が確認された。蝸牛組織でのMCP1のmRNA発現は3NP投与後1日で急激に上昇し3日目に低下するが高発現状態を保っている。CCR2は1日目よりも3日目に上昇することが明らかとなった。骨髄間葉系幹細胞においてもCCR2のmRNA発現が確認され、同細胞がMCP1によって誘導され得ることが示された。



蝸牛線維細胞および骨髄間葉系幹細胞における3NP投与後のMCP1とその受容体CCR2のmRNA発現の変化

Connexin26 コンディショナルノックアウトマウスの作製

これまで作製された Connexin26 floxed マウスと P0-Cre トランスジェニックマウスとの選抜・交配により内耳特異的に Connexin26 が欠損するコンディショナルノックアウトマウスが完成した。これまでの欠損マウスは全身で Cx26 が欠損するため胎生致死であったが、今回開発されたマウスは聴力以外は正常な表現型をもつ。高度に聴力低下を有するが平衡感覚や他の生体機能はほぼ正常であり、Cx26 変異を持つヒト遺伝性難聴モデルとして理想的なモデル動物であることが示された。

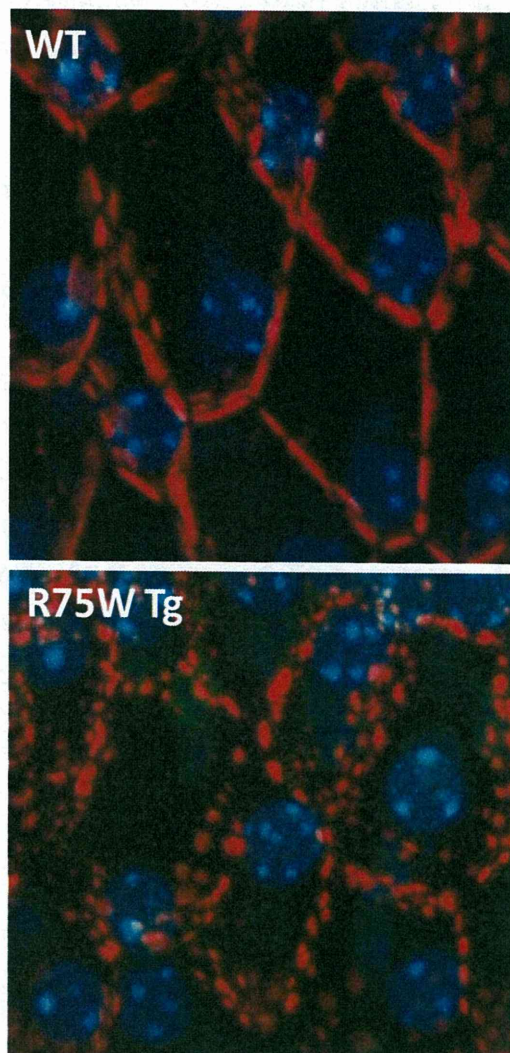
Connexin26 コンディショナルノックアウトマウス、および Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスへの骨髄間葉系幹細胞 (MSC) 移植

上記二種類の遺伝性難聴モデルに対し、前述した MSC 移植が行われた。前述したように手術によるさらなる聴力低下は見られなかったが、現在のところ、無処置の移植では聴力が改善した例は見られていない。前述した 3NP 投与後の移植や、MCP1, MCP1 受容体遺伝子の導入移植細胞を用いることにより導入細胞数の飛躍的な上昇が期待でき、これにより聴力改善も期待できると考えられる。

Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスにおける新たな難聴分子病態の発見

我々は遺伝性難聴モデル Connexin26 R75W 優性阻害変異トランスジェニックマウスの詳細な分子病態解析を行った結果、まったく新しい分子病態変化を発見した。Connexin26 は蝸

牛のギャップジャンクションを形成し蝸牛内のイオン輸送で重要な機能を担うと考えられてきたが、これまでは同遺伝子変異での難聴はイオン輸送の機能低下によるものという認識しか持たれていなかった。しかし蝸牛にはイオン輸送を担うタンパク質は Cx26 以外にも Cx30 や Cx43 などほぼ同一箇所に着目してタンパク質発現の代償機能などを考慮すると、Cx26 のみの異常によりギャップジャンクション機能が低下することを説明することは困難であった。しかし本研究で我々は新たな病態として、Connexin26 の変異により、ギャッ

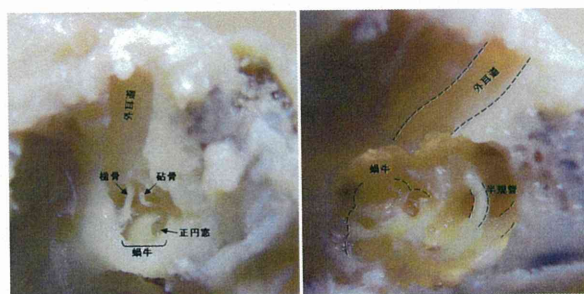


遺伝性難聴の新たな分子病態の発見
ギャップジャンクションプラークの崩壊・断片化

プジャンクションの複合体ユニットであるギャップジャンクションプラークの形成に生後初期から異常が発生することを発見した。通常は図にあるように線上の長いプラークによって5角形または6角形の細胞構造を形成するが R75W 変異を持つトランスジェニックマウスの蝸牛ではギャップジャンクションプラークが分裂し円形または楕円形の多数の小プラークが散在していることが確認された。同現象は我々が作製した Connexin26 コンディショナル KO マウスのギャップジャンクションプラークにおいても確認された。これは全く新しい難聴分子病態であり、初代培養や *in vitro* 分子イメージングによって詳細なメカニズムを解析している。

カニクイザル内耳における細胞投与アプローチの検討

マウス内耳への細胞移植研究によって得られた技術をヒトへ応用するため、現在カニクイザルを用いた細胞投与アプローチの検討を行っている。ホルマリン固定された成熟カニクイザル頭部および安楽殺直後のカニクイザルを用い、ヒト鍍骨手術の手技と同様、耳後部より削開し半規管を露出させ、マウスと同様に移植用の小孔を開けることが可能であった。右上図には我々が検討したカニクイザルの解剖像を示しており、ヒトと極めて類似した構造であることがわかる。

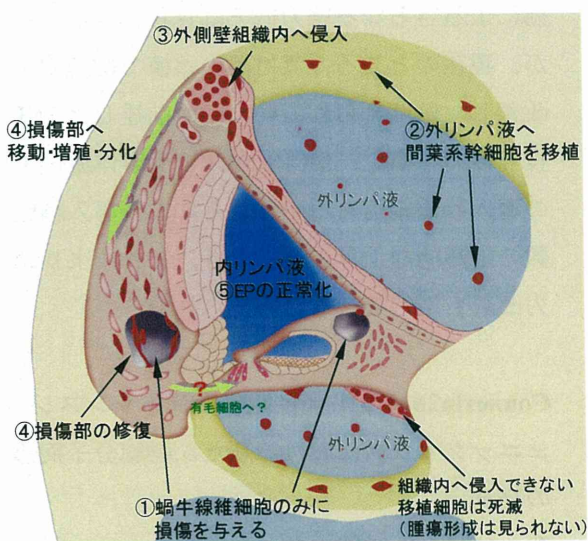


成熟カニクイザルの内耳 A. 上顎側より削開し外耳道、耳小骨、蝸牛を露出した。B. さらに内耳周囲を削開し蝸牛内部および半規管を露出した。ヒトとほぼ同様の内耳構造およびその周囲構造を示す。(神谷和作、池田勝久 耳鼻咽喉科臨床 2010 補 126, 1-5)

D. 考察

本研究において骨髄間葉系幹細胞の蝸牛組織導入効率の大きな上昇が確認されたが、走化性因子の遺伝子発現解析のデータと総合すると、以下のような細胞誘導メカニズムが必要であると考えられる(下図)。

1. 蝸牛外側壁に軽度な損傷を与える。 2.1 日後より走化性因子 MCP1 の mRNA 発現は 3N P 投与後 1 日に急激に上昇。その後外リンパ液



蝸牛線維細胞をターゲットとした骨髄間葉系幹細胞移植での損傷部の修復および推測された移植細胞の移動経路。(Kamiya et al. *Am J Pathology* 2007, 神谷和作 医学のあゆみ 特集・細胞治療 update 2009)

へ投与されたMSCも細胞表面にMCP1受容体であるCCR2を発現しているため、3.外側壁側へ誘導され、侵入を始める。4.損傷を修復するため移動・増殖・分化により外側壁組織内部において生着。

このメカニズムを応用しMSCにMCP1およびCCR2の発現プラスミドを移植細胞内で強発現させることにより、生体内での自然な細胞誘導反応を増強させ、蝸牛内へのMSCの導入効率を飛躍的に高める方法を確立できると考えられる。

既にMCP1およびCCR2の条件付き発現プラスミドが完成しており、次段階としてはこれらの遺伝子をMSCへ導入・安定株を樹立し、MCP1発現MSCおよびCCR2発現MSCを段階的に蝸牛内へ投与し各遺伝子を発現制御することにより細胞導入率が飛躍的に高まり、正常細胞の導入により聴覚機能が改善されることが十分期待できる。

また、我々はヒト遺伝性難聴で最も高頻度に発生する難聴原因遺伝子である Gjb2(コネキシン 26 遺伝子)の内耳特異的欠損マウスを完成させ、ヒト遺伝性難聴と病態がほぼ一致した遺伝性難聴モデルであることを機能および病理解析により確認している。同マウスは現存する遺伝性難聴モデルの中で最もヒト遺伝性難聴と病態が近似していると考えられ、我々の新規治療法開発の研究に最適であると考えられた。同マウスに上記の細胞導入システムの効果を増強させて用いることにより、遺伝性難聴における正常細胞への細胞置換法が確立し、これまで不可能であった遺伝性難聴の聴力改善が徐々に現実化すると考えられる。

E. 結論

- 1.ヒト遺伝性難聴の新規治療法開発のための最適な遺伝子改変モデルマウスを開発した。
- 2.骨髄間葉系幹細胞のマウス内耳への導入法を改良し、蝸牛組織への細胞導入効率を飛躍的に高める方法を開発した。
3. 新規開発したコネキシン26欠損マウスへのCCR2遺伝子導入間葉系幹細胞 (MSC-CCR2) の導入。移植したMSC-CCR2は内耳組織を生着し細胞間に欠損していたCx26が含まれるギャップ結合プラークを構築させることに成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

- (1) Okada, H., Iizuka, T., Mochizuki, H., Nihira, T., Kamiya, K., Inoshita, A., Kasagi, H., Kasai, M., Ikeda, K., Gene transfer targeting mouse vestibule using adenovirus and adeno-associated virus vectors. *Otology & Neurotology*, 2012 (in press).
- (2) 神谷和作, 池田勝久, 多能性幹細胞を用いた遺伝性難聴に対する内耳細胞治療法の開発. 日本臨床. 2011, 69(12): 2215-2219.
- (3) Hayashi, C., Funayama, M., Li, Y., Kamiya, K., Kawano, A., Suzuki, M., Hattori, N., Ikeda, K., Prevalence of GJB2 causing recessive profound non-syndromic deafness in Japanese children. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2011, 75(2): 211-214.

学会発表

- (1) Kamiya, K., Muraki, M., Ogawa, K., Ikeda, K., Cell therapy for hereditary hearing loss with stem cell homing factors. 第85回日本薬理学会シンポジウム講演, 2012. 3. 京都.
- (2) 神谷和作, 池田勝久, コネキシン 26 遺伝子変異による蝸牛ギャップ結合プラークの崩壊, 第21回日本耳科学会総会・学術

- 講演会, 2011. 6. 沖縄.
- (3) 神谷和作, 村木美帆, 小川佳奈, 池田勝久, コネキシン 26 変異による内耳ギャップ結合プラークの崩壊 - 遺伝性難聴の新規分子病態-, 第 63 回日本細胞生物学会, 2011. 6. 札幌. 若手優秀発表賞.
 - (4) 神谷和作, 池田勝久, コネキシン 26 遺伝子欠損マウスにおける蝸牛ギャップ結合プラークの解析, 第 112 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 2011. 5. 京都.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

難聴者（児）の現状理解と QOL 向上を指向した社会・教育学的取り組み

研究分担者 石原 研治 茨城大学 准教授

研究要旨

学校保健実務必携には、学校で注意すべき難聴としてヘッドホン難聴が挙げられており、「健康教育の観点から、日常的な注意喚起による予防が大切である」と記されている。ヘッドホン難聴は長時間、大音量で音楽等を聴くことにより引き起こされ、慢性的な症状になると治療することが難しいため、予防をすることが大切である。しかし、音量や使用時間はヘッドホン使用者の個人の判断にゆだねられているため、児童生徒が自分自身で聴力を守っていくためには、ヘッドホン使用に関する指導を行い、児童生徒の自己管理能力を養う必要があると思われる。

そこで、本研究は小学生および大学生のヘッドホン使用状況、ヘッドホン難聴に関する認識を調査した。

A. 研究の背景と目的

1980年代に携帯型音楽プレイヤーが登場して以来、イヤホンやヘッドホンで長時間、大音量の音楽を聴き続けると難聴になる恐れがあることが指摘されてきた。また、2009年9月に欧州連合（EU）の欧州委員会は携帯音楽プレイヤーを大音量で聴き続けた場合、聴覚障害になる恐れがあるとして、音量についての新しい基準を設けて各メーカーに義務付ける方針を明らかにした。さらに、フランスには音量を100デシベル以下にするという規制がある。一方、日本においては、労働環境における騒音の危険性が認識されている反面、余暇や娯楽に伴う音の聴力への影響についてはあまり意識されていない。齋藤らは、「特に若者は、コンサート、スポーツイベント、カラオケ、携帯用音楽機器等の利用時において、好んで大きい音に自らをさら

そうとする傾向が見られ、若者に聴力保護の大切さを啓蒙する必要がある」と述べている。影山は1992年に高校生のウォークマンおよびヘッドホンの所有率がそれぞれ59%および41%、松嶋らは1989年に中学生のヘッドホンの所有率が51%であることを報告したが、現在はさらに携帯音楽プレイヤーが普及しているため、所有率の増加と使用し始める年代層の低年齢化が認められると考えられる。しかし、小学生を対象とした調査はこれまで行われておらずその実態は不明である。

学校保健実務必携には、学校で注意すべき難聴としてヘッドホン難聴が挙げられており、「健康教育の観点から、日常的な注意喚起による予防が大切である。」と記されている。しかし、ヘッドホン難聴に関する指導の実態についての調査は行われておらずその実態は不明である。ヘッドホン難聴は長時間、大音量で音楽等を聴く

ことにより引き起こされ、慢性的な症状になると治療することが難しいため、予防をすることが大切である。しかし、音量や使用時間はヘッドホン使用者の個人の判断にゆだねられているため、個人がヘッドホン難聴に対する知識と認識を高め、自己管理能力を身に付けて、自分自身で難聴を防ぐことが必要となる。

ヘッドホン難聴に関する指導は、科目保健の領域には含まれていないものの、児童生徒が自分自身で聴力を守っていくためには、ヘッドホン使用に関する指導を行う必要があると思われる。児童生徒がヘッドホン難聴について知ることによって、自らの判断で音量や使用時間を調整していくようになることが期待できる。さらに、高校生、中学生のみならず、小学生の実態を踏まえたうえで指導内容や指導学年を検討することにより、効果的な指導を行うことができると考えられる。

そこで、本研究では、小学生のヘッドホンの使用状況やヘッドホン難聴に対する認識を調査した。また、様々な地域や学校から進学してきている大学生を対象に調査を行うことで、ヘッドホン難聴に関する指導の実態を広く調査することができると考え、大学生のヘッドホンの使用状況やヘッドホン難聴に対する認識を調査した。

B. 研究方法

B.1. 質問紙調査

本調査は、小学生および大学生を対象にヘッドホン使用に関する実態を調査することを目的とした。

B.1.1. 調査対象

A 小学校の児童 357 名 (3 年生～6 年生),

および B 大学の学生 357 名。

B.1.2. 調査内容

小学生対象：ヘッドホン使用状況、ヘッドホン使用に関する意識など。

大学生対象：ヘッドホン使用状況、ヘッドホン使用に関する意識、ヘッドホン難聴に関する指導についてなど。

C. 研究結果

C.1. 小学生への質問紙調査

C.1.1. 調査対象

アンケート調査の対象者である A 小学校の児童 (全 357 名) の学年は以下の通りであった (表 1)。

表 1

学年	人数	%
3 年生	101	28.3
4 年生	93	26.1
5 年生	79	22.1
6 年生	84	23.5
計	357	100.0

C.1.2. 結果

質問 1 ヘッドホンやイヤホンを使ったことがありますか...

「ある」と回答した者は 80.1% (286 名), 「ない」と回答した者は 19.9% (71 名) であり、約 8 割の児童がヘッドホンを使用した経験があるということが明らかになった (図 1)。