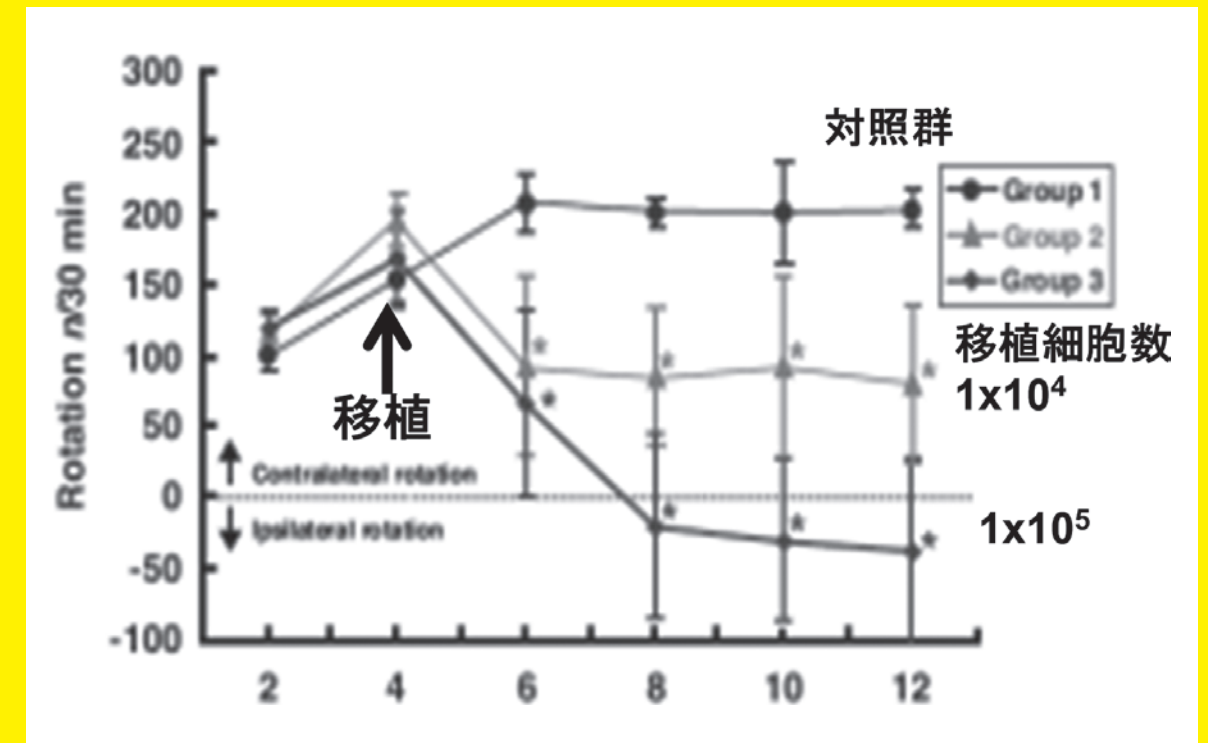


耳鼻咽喉科ニューロサイエンス

Vol. 33



耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会会則

- 1) 本会を耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会と称し、耳鼻咽喉・頭頸部ならびに関連する領域の神経組織・生理・薬理・生化学・免疫・分子生物・遺伝など生体のホメオスターシス維持に関する機構の、基礎的、臨床的研究の推進と若手研究者の育成を図り、会員相互の交流親睦を促進することを目的とする。
- 2) 本会の事務連絡所を関西医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科教室（大阪府枚方市新町二丁目五番一号）におく。
- 3) 本会の目的を遂行するために次の事業を行う。
 - 1 年1回の研究会を開催する。
 - 2 会誌を発行する。
 - 3 その他。
- 4) 会員は所定の手続きを経て入会し、本会の事業に参加する。他に賛助会員をおくことができる。
- 5) 本会には世話人代表1名、世話人および幹事若干名、年次会長1名をおく。（任期は年次会長は1年、他は3年とする）
世話人会は会の運営に当たり、幹事は世話人を補佐し、年次会長は年次研究会を主催する。
- 6) 本会の会費
本会の経費は会費およびその他の収入をもってあてる。
本会の会計年度は4月1日より翌年3月末とする。
- 7) 本会則は平成28年8月27日より適用する。

以上

耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会

世話人代表・・・岩井 大（関西医大）

世話人・・・高野 賢一（札幌医大）	松原 篤（弘前大）	山田武千代（秋田大）
欠畑 誠治（山形大）	香取 幸夫（東北大）	太田 伸男（東北医薬大）
室野 重之（福島医大）	西野 宏（自治医大）	塩谷 彰浩（防衛医大）
岡本 美孝（千葉大）	大久保公裕（日本医大）	山嵜 達也（東京大）
池田 勝久（順天堂大）	小林 一女（昭和 大）	肥塚 泉（聖マリ医大）
山下 拓（北里大）	増山 敬祐（山梨大）	宇佐美真一（信州大）
堀井 新（新潟大）	將積日出夫（富山大）	吉崎 智一（金沢大）
三輪 高喜（金沢医大）	藤枝 重治（福井大）	曾根三千彦（名古屋大）
村上 信五（名市大）	中田 誠一（保健衛生大）	竹内 万彦（三重大）
北原 紘（奈良医大）	清水 猛史（滋賀医大）	大森 孝一（京都大）
平野 滋（京府医大）	猪原 秀典（大阪大）	土井 勝美（近畿大）
保富 宗城（和医大）	丹生 健一（神戸大）	阪上 雅史（兵庫医大）
武田 憲昭（徳島大）	羽藤 直人（愛媛大）	星川 広史（香川大）
兵頭 政光（高知大）	平川 勝洋（広島大）	竹内 裕美（鳥取大）
西崎 和則（岡山大）	原 浩貴（川崎医大）	川内 秀之（島根大）
山下 裕司（山口大）	中川 尚志（九州大）	坂田 俊文（福岡大）
倉富勇一郎（佐賀大）	高橋 晴雄（長崎大）	鈴木 正志（大分大）
折田 頼尚（熊本大）	東野 哲也（宮崎大）	黒野 祐一（鹿児島大）
鈴木 幹男（琉球大）	野中 学（東女医大）	

順不同

幹事・・・・・・・・・・北尻 雅則（関西医大） 八木正夫（関西医大）

事務局・・・・・・・・・・関西医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科教室内

〒573-1010大阪府枚方市新町2-5-1

TEL 072 - 804 - 0101

注）表紙の図は、吉川正英先生の本誌掲載の図を使用しました。

第36回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会を終えて

第36回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会会長
奈良県立医科大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科学
北 原 紉



平成30年の第36回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会を、例年通り8月最終週土曜日の大阪で、奈良県立医科大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科学教室の担当にて開催させていただきました。

本研究会は、耳鼻咽喉科領域の基礎および臨床研究を通じて、耳鼻咽喉科学の進歩向上に貢献することを目的とし、昭和58年に設立された歴史ある研究会です。設立当時の「頭頸部自律神経懇話会」という名称は、昭和から平成への時代の移り変わりとともに現在の「耳鼻咽喉科ニューロサイエンス」となりましたが、1日、1会場、大阪開催という形式は現在もそのまま踏襲されています。はからずも当大学が平成30年、平成最後の本研究会を担当させていただくことになりましたが、一般演題23題、参加者110名と例年より多くの先生方にご参集いただき、新しい時代に向けて活気あふれる会になりました。ご参加いただいた皆様、関係者の先生方に厚く御礼申し上げます。

一般演題ではまず、めまいの臨床検査と基礎研究の群で幕が開け、難聴、嗅覚、そして頭頸部腫瘍分野と、充実した内容の演題で構成された6群が、各群座長により手際よく進行されました。とくに、嗅覚の群は海外からの留学生による英語発表2演題を含んでおり、今後English Sessionの群を設ける企画が必要になるかも知れません。

ランチョンセミナーおよび特別講演には本研究会にふさわしい内容のものと考えまして、奈良医大・病原体・感染防御医学・教授 吉川正英先生に「ここまで進んだ再生医学～多能性幹細胞から内耳有毛細胞への分化誘導法も含めて～」として内耳を含めた再生医学の歴史と展望を、同じく奈良医大・微生物感染症学・教授 矢野寿一先生に「抗菌薬を大事に使おう～耐性菌の検査からその対策まで～」として耳鼻科領域を含めた耐性菌の問題を、ご講演いただきました。お二方とも基礎医学の先生方ですが、耳鼻科領域に造詣の深い先生方ですので、本文をご参考にしてください。

平成30年のノーベル生理学医学賞に、京都大学特別教授の本庶 佑先生ら2名が「免疫チェックポイント阻害因子の発見とがん治療への応用」で受賞されました。本研究会が耳鼻咽喉科ニューロサイエンス分野の研究レベルの底上げに寄与し、実臨床に直結する素晴らしい研究成果を生み出す礎になることを祈念しています。

		開 催 日	会 長
第 1 回	頭 頸 部 自 律 神 経 懇 話 会	昭和 58 年 8 月 27 日	
第 2 回	〃	昭和 59 年 8 月 18 日	
第 3 回	〃	昭和 60 年 8 月 24 日	
第 4 回	〃	昭和 61 年 8 月 23 日	
第 5 回	頭 頸 部 自 律 神 経 研 究 会	昭和 62 年 9 月 5 日	熊澤 忠躬 (関西医大)
第 6 回	〃	昭和 63 年 8 月 27 日	松永 亨 (大阪大学)
第 7 回	〃	平成 1 年 8 月 26 日	戸川 清 (秋田大学)
第 8 回	〃	平成 2 年 8 月 25 日	石井 哲夫 (東女医大)
第 9 回	〃	平成 3 年 8 月 24 日	進 武幹 (佐賀医大)
第 10 回	〃	平成 4 年 8 月 22 日	熊澤 忠躬 (関西医大)
第 11 回	〃	平成 5 年 8 月 28 日	高坂 知節 (東北大学)
第 12 回	〃	平成 6 年 8 月 27 日	西村 忠郎 (保健衛生大)
第 13 回	〃	平成 7 年 8 月 19 日	坂倉 康夫 (三重大学)
第 14 回	〃	平成 8 年 8 月 31 日	大山 勝 (鹿児島大)
第 15 回	〃	平成 9 年 8 月 30 日	小宮山莊太郎 (九州大学)
第 16 回	〃	平成 10 年 8 月 22 日	中井 義明 (大阪市大)
第 17 回	〃	平成 11 年 8 月 21 日	齋藤 等 (福井医大)
第 18 回	〃	平成 12 年 8 月 26 日	山下 敏夫 (関西医大)
第 19 回	〃	平成 13 年 8 月 25 日	久保 武 (大阪大学)
第 20 回	〃	平成 14 年 8 月 24 日	洲崎 春海 (昭和大学)
第 21 回	〃	平成 15 年 8 月 23 日	阪上 雅史 (兵庫医大)
第 22 回	〃	平成 16 年 8 月 28 日	山下 裕司 (山口大学)
第 23 回	〃	平成 17 年 8 月 27 日	細井 裕司 (奈良医大)
第 24 回	〃	平成 18 年 8 月 26 日	武田 憲昭 (徳島大学)
第 25 回	〃	平成 19 年 8 月 25 日	湯本 英二 (熊本大学)
第 26 回	〃	平成 20 年 8 月 23 日	山根 英雄 (大阪市大)
第 27 回	〃	平成 21 年 8 月 29 日	友田 幸一 (関西医大)
第 28 回	〃	平成 22 年 9 月 11 日	大森 孝一 (福島医大)
第 29 回	〃	平成 23 年 8 月 27 日	暁 清文 (愛媛大学)
第 30 回	耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会	平成 24 年 8 月 25 日	森 望 (香川大学)
第 31 回	〃	平成 25 年 8 月 24 日	池田 勝久 (順天堂大学)
第 32 回	〃	平成 26 年 8 月 30 日	石川 和夫 (秋田大学)
第 33 回	〃	平成 27 年 8 月 29 日	丹生 健一 (神戸大学)
第 34 回	〃	平成 28 年 8 月 27 日	三輪 高喜 (金沢医大)
第 35 回	〃	平成 29 年 8 月 26 日	岩井 大 (関西医大)
第 36 回	〃	平成 30 年 8 月 25 日	北原 紬 (奈良医大)

目 次

第 36 回 研究会

ランチョンセミナー [司会：北原 紉 (奈良医大)]

ここまで進んだ再生医学

—多能性幹細胞から内耳有毛細胞への分化誘導法も含めて—

吉川正英…………… 1

特別講演 [司会：香取幸夫 (東北大学)]

抗菌薬を大事に使おう～耐性菌の検査からその対策まで～

矢野寿一…………… 6

第 1 群 [座長：將積日出夫 (富山大学)]

1. フレンツェル眼鏡用小型赤外線眼振撮影システムの開発

伊東伸祐、Nguyen Nghia Trong、將積日出夫、赤荻勝一、中里 瑛、牛島良介、

田里 博、芦澤雄三…………… 10

2. 偏中心回転による球形囊刺激時の眼球運動三次元解析

秋田佳名子、今井貴夫、Xiuwen Jiang、奥村朋子、大崎康宏、太田有美、

佐藤 崇、猪原秀典
…………… 13

3. 動物モデルを用いた免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法

松田和徳、北原 紉、伊藤妙子、佐藤 豪、福田潤弥、武田憲昭…………… 16

4. 前庭神経炎の障害神経部位診断 —前半規管膨大部神経炎症例をもとに—

肥塚 泉、宮本康裕、三上公志、鈴木 香、望月文博、四戸達也、大原章裕、
笹野恭之…………… 20

第 2 群 [座長：岩井 大 (関西医科大学)]

5. 老人性難聴モデルマウスにおける CD4+T リンパ球分画移入による難聴予防

岩井 大、Van DB、鈴木健介、小林良樹、尹 泰貴、高田洋平、福井英人、

神田 晃、稲葉宗夫…………… 25

6. LOXHD1b 遺伝子 knockout ゼブラフィッシュの作成について	
樽本俊介、浅岡洋一、菅原一真、広瀬敬信、竹本洋介、清木 誠、山下裕司	29
7. マウス音響障害モデルに対する Adalimumab 投与における内耳保護効果の検討	
山本陽平、菅原一真、山下裕司	32
8. 新規内耳特異的発現抑制モデルマウスを用いた Dach1 遺伝子の機能解析	
三輪 徹、蓑田涼生、折田頼尚	34
9. <i>Ndufs4</i> 欠損マウスにおける顎下腺・副腎の形態異常とステロイド合成障害	
小林祐太、本藏陽平、阿部高明、大和田祐二、香取幸夫	38

第3群 [座長：小林正佳（三重大学）]

10. 日常のにおいアンケート、VAS、カード式嗅覚検査、基準嗅力検査の結果と相互関係	
岡崎 健、都築建三、橋本健吾、阪上雅史	42
11. 鼻呼気凝集液の臨床的意義	
三輪正人、酒主敦子、大久保公裕、飯島史朗、池田勝久、奥村 康	00
12. 血清 Nerve growth factor (NGF) と長期スギ舌下免疫療法の効果	
山田武千代、登米 慧、椎名和弘、斎藤秀和	00
13. 抗 HMGB1 抗体を用いた局所炎症制御による外傷性嗅覚障害後の嗅覚機能回復促進	
小林正佳、玉利健悟、Mohammed Omar Al Salihi、西田幸平、竹内万彦	00
14. Acetylcholine-induced ciliary beat of the human nasal mucosa is regulated by the pannexin-1 channel and purinergic P2X receptor	
Do Ba Hung、大淵豊明、若杉哲郎、小泉弘樹、横山 満、鈴木秀明	00
15. Neural inflammation by nAChR expressed eosinophil in the eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) with asthma	
Dan Van Bui、Akira Kanda、Yoshiki Kobayashi、Yasutaka Yun、Kensuke Suzuki、Shunsuke Sawada、Hiroshi Iwai	00

第4群 [座長：鈴木秀明（産業医科大学）]

16. ダイレクトリプログラミングによる蝸牛神経の再生

西村幸司、野田哲平、大森孝一……………00

17. 急性音響外傷における ERK シグナルのリン酸化とその機能的役割

松延 毅、栗岡隆臣、佐藤泰司、藤岡正人、塩谷彰浩……………00

18. Ca^{2+} -ATPase 変異による進行性聴力障害について

美野輪治、神谷和作、大保貴嗣、山崎和生、鈴木 裕、吉木 淳、城石俊彦、野田哲生、岡崎康司、池田勝久……………00

第5群 [座長：山田武千代（秋田大学）]

19. 側頸嚢胞におけるハイリスク型・ヒトパピローマウイルス -16 の感染

池上太郎、上原貴行、平川 仁、真栄田裕行、我那覇章、鈴木幹男……………00

20. 頭頸部扁平上皮癌における CXCR4 の役割

登米 慧、鈴木真輔、山田武千代……………00

21. 頭頸部扁平上皮がんリンパ節転移に際して発現亢進する分泌性因子の診断・治療標的としての可能性

真田朋昌、三谷壮平、上田哲平、鵜久森徹、羽藤直人……………00

第6群 [座長：鈴木幹男（琉球大学）]

22. 16S ribosomal RNA 遺伝子解析が有用であった non-typeable *Haemophilus influenzae* による髄膜炎症例

角田梨紗子、野口直哉、鈴木貴博、東海林史、栗田口敏一、太田伸男、樋口じゅん、八田益充、賀来満夫、香取幸夫……………00

23. ヒトの咽頭における味覚認知

西井智子、任 智美、阪上雅史……………00

ここまで進んだ再生医学

—多能性幹細胞から内耳有毛細胞への分化誘導法も含めて—

吉川 正英

奈良県立医科大学 病原体・感染防御医学

このたびは、耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会にて講演の機会をいただいたので、表記のような身の程知らずの大それたタイトルで話をさせていただいた。ここに要旨を述べさせていただく。

幹細胞とは、自身と同じ細胞を作る能力 (self-renewal) と少なくとも 1 種類以上の自身と異なる細胞を作る能力を併せ持つ細胞である。幹細胞には、全能性から多能性幹細胞、さらに分化領域幅は狭くなるが原則として組織関連細胞に分化し得る組織幹細胞に分類できる。私は、消化器内科医として歩んできたが、平成 10 年 (1998 年) の異動を機に、新たに ES 細胞という幹細胞に興味を持った。当時は ES 細胞という語は一般の人々だけでなく医療者にもなじみはなかった。実際には万能 (全能) ではなく多能性幹細胞であるが、たまにニュースで流れる際には万能細胞と呼ばれていた。

ES 細胞は発生受精卵の内部細胞塊より樹立された細胞で、マウスでは 1981 年に樹立された¹⁾。この ES 細胞は、これを胚盤胞に注入すると、胚の発生に寄与して生殖細胞系列をも含んでキメラマウスが形成される。このキメラ形成能と相同遺伝子組み換え技術を用いて、いわゆるノックアウトマウス作成に使われてきた。1998 年には、米国でヒト ES 細胞が樹立²⁾、日本でも 5 年遅れて 2003 年に京都大学再生医学研究所の中辻憲夫氏らにより作成され、新たな期待が医療現場に生まれてきていた。当時の雑誌 (実験医学 21 巻 (8) 編集: 中辻憲夫、岡野栄之) をみると、「再生医療へと動き始めた幹細胞研究の最先端」とのタイトルが付されている。

ES 細胞は、胚盤胞に注入すると生殖細胞も含めた全種類の細胞種への分化が可能である。しかし、実際に in vitro ではどうであったかと、新ミレニウム以前の当時の報告をみると、神経細胞・色素細胞・ケラチノサイト・脂肪細胞・筋細胞・血液系細胞への分化誘導に成功したというもので、すなわち、すべてが外胚葉あるいは中胚葉系細胞への分化報告であった。胚体内胚葉系細胞種への分化は明確には確認されていなかった。当時、消化器官などの胚体内胚葉系細胞種への分化が簡単ではなかったのは次のような理由によると考えられる。消化器官は内胚葉性上皮と臓側中胚葉に由来する間充織より主に構成され、肝臓や膵臓などの消化器関連臓器も、原始の腸管内胚葉のそれらの臓器への予定領域を原基として、間充織との相互作用で形づくられていく。この過程に、さらに神経冠細胞などの migration も加わり、内・中・外の全胚葉成分を構成要素とする機能体 (臓器) が完成する、というすこし複雑な設計図が必要であったからではないかと思われる。

私たちも、マウス ES 細胞を用いてドーパミン産生神経細胞への分化に成功し³⁾、マウスのパーキンソンモデルでその有用性を報告した (図 1 最初) が、次のテーマとして、消化器内胚葉系細胞への in vitro 分化誘導を試みることにした。未分化 ES 細胞を 2 次元で培養する方法が主流であったが、丹羽仁史先生 (現在、熊本大学発生医学研究所、教授) の助言をいただき、培養皿の蓋に ES 細胞を含む培養液滴を付着させ (hanging drop)、3 次元的で in vivo 分化に近い状態を再現する方法を導入した。培養 5 日後には、培養液滴の底に発

生6日胚であるマウスの円筒胚に酷似した形態を示す細胞凝集塊ができる。このような細胞塊は胚様体 (EB: embryoid body) とよばれ、内外2層の細胞層からなる中空細胞塊で、外層は臓側内胚葉、内層は原始外胚様に相当する。胚様体からは、これ以上の形態形成は起こらないが、少なくとも初期胚発生を真似ることができる。このEB形成法を使用したところ、肝細胞様細胞⁴⁾、数mm程度と微小ながら上皮や筋層とともに筋層間神経細胞を備えた腸管様構造体⁵⁾、インスリン産生細胞⁶⁾等の分化誘導に成功した。(図1)

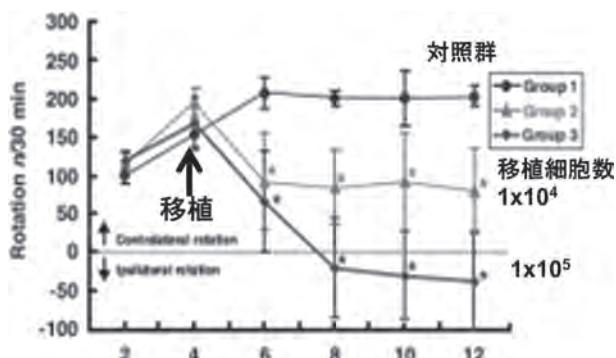


図1. ドーパミン産生細胞誘導とパーキンソンモデルマウスへの移植による行動改善

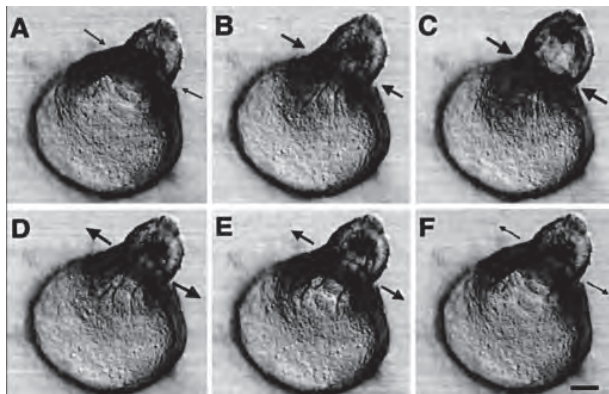


図1. 蠕動様運動をする腸管様の組織

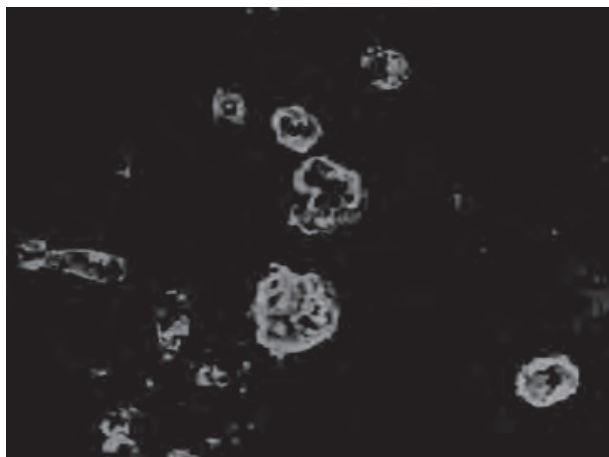


図1. 膵島様構築とインスリン産生細胞

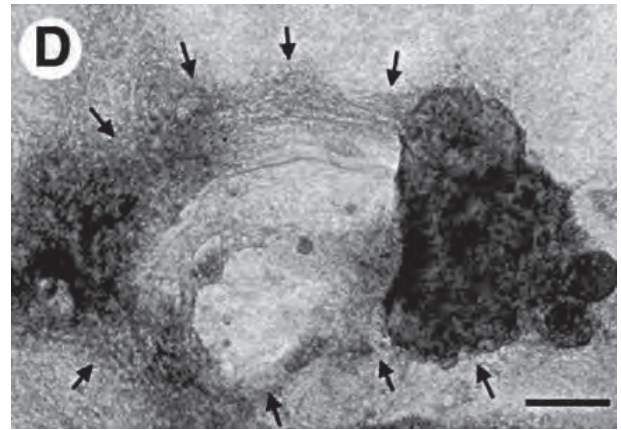


図1. 心筋細胞 (矢印) の近傍の肝細胞様細胞塊

ES細胞の分化研究が進む一方で、初期化 (reprogramming) の研究も進んできていた。オタマジャクシの体細胞核をカエルの除核受精卵に移植したところ、正常なカエル成体に発生しうることを証明した Gurdon 氏の 1962 年の報告⁷⁾ から 30 数年を経て、大型哺乳動物にも研究は進み、1996 年 7 月には英国 Roslin 研究所では Wilmut 氏によりクローン羊 Dolly が誕生した⁸⁾。大型哺乳動物でもクローン動物が作成され得たことは、科学的側面のみならず多方面の関心を大いに集めることとなった。山中伸也先生による iPS 細胞が発表されるまでの 10 年間は、受精卵を使用するという倫理的問題が残るもののヒトクローン胚を使った再生医療が模索される時期であった。

このような中で iPS 細胞が誕生した。2006 年にマウスで⁹⁾、そして翌年にはヒトで¹⁰⁾ iPS 細胞作製が報告された。24 の候補転写因子の中から、巧妙にも 4 つの遺伝子が決定され、それらが幸運にもマウスでもヒトでも同じ結果であった。この iPS 細胞の誕生が、いかほどの大きな意義を有するか周知のことであろう。この偉業に引っ張られる格好で国も協力体制を整えてきたのが現在である。

ヒトに初めて使われたのは神戸理研・高橋政代氏らによる加齢黄斑変性に対する自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植である¹¹⁾。懸念された腫瘍形成なども無く安全であることが報告されている。さらに、サルへのヒト ES 細胞由来網膜組織を移植研究もなされており、この先にはヒトへの iPS 由来網膜組織の使用も考えられる。また、京都大学・高橋淳氏らは、パーキンソンモデルのサルの被殻へのヒト iPS 由来ドーパミン産生細胞の

移植研究¹²⁾を経て、本年（平成30年）7月には、ヒトに対するiPS細胞を用いたパーキンソン病に対する医師主導治験の年内開始を報道発表した。さらに、8月には同大・江藤浩之氏も再生不良性貧血患者を対象とするiPS細胞由来血小板の自己輸血に関する臨床研究の審査申請を公表した。

2015年に発足した国立研究開発法人・日本医療研究開発機構（AMED）¹³⁾では、iPS細胞研究所（所長 山中伸弥）を中核拠点とし、AおよびB拠点を構成して、再生医療実現拠点ネットワークプログラムが進行中である。A拠点は、脊髄損傷・脳梗塞の再生医療（慶應義塾大学・岡野栄之）、パーキンソン病・脳血管障害機能再生（京都大学・高橋淳）、視機能再生（理化学研究所・高橋政代）、心筋再生治療（大阪大学・澤芳樹）である。また、B拠点は、培養腸上皮幹細胞を用いた炎症性腸疾患に対する粘膜再生（東京医科歯科大学・渡辺守）、代謝性臓器の創出技術開発（横浜市立大学・谷口英樹）、NKT細胞再生によるがん免疫治療技術開発（理化学研究所・古閑明彦）、軟骨疾患再生治療法の開発（京都大学・妻木範行）、次世代型膵島移植療法の開発（東京大学・宮島篤）である。

ところで、若い研究者たちの躍進も顕著である。機能的臓器には血管構築は不可欠であるが、血管内皮細胞や間葉系幹細胞の使用を経て、iPS由来細胞のみから臓器芽組織を形成する試み（横浜市大、武部氏）¹⁴⁾や消化管幹細胞の同定から癌幹細胞あるいは癌進展機構の解明（慶応大・佐藤氏）^{15, 16)}など目を見張るものがある。iPS細胞は、学問上の大きなbreakthroughではあるが、それに加えてさらに、3次元培養技術の進歩、CRISPR-Casによる遺伝子編集技術の開発、組織幹細胞科学の進歩が、相乗して再生医学および再生医療の推進力となっている。

最後に、内耳に関する最近の話題について述べる。大島氏によるESおよびiPS細胞から内耳有毛細胞様細胞の誘導が報告¹⁷⁾されたのは記憶に新しい。神戸理研の笹井氏は、多能性幹細胞から網膜様組織¹⁸⁾や脳様組織¹⁹⁾などが構築されることを報告するなかで、分化して将来にはある組織を構築しようとする分化過程の細胞たちに内在する組織構築力を引き出すのに3次元培養が有用であ

ることを明らかにした²⁰⁾。眼胚様組織が構築されるのと同様に、内耳感覚上皮も3次元培養にてマウスおよびヒトの多能性幹細胞から誘導されることがHashino氏およびKoehler氏（図2）により報告された^{21, 22)}。in vivo発生をin vitroでは



Volume 35 Issue
6, June 2017



Eri Hashino, PhD,
and Karl R. Koehler, PhD

図2. 表紙を飾った in vitro 内耳様組織誘導と著者（Hashino氏およびKoehler氏）

あるが3次元培養を用いて上手に類似的再現をはかったものである。方法と結果の概要を図3に示す。感覚上皮層下には神経線維が密に侵入しシナ

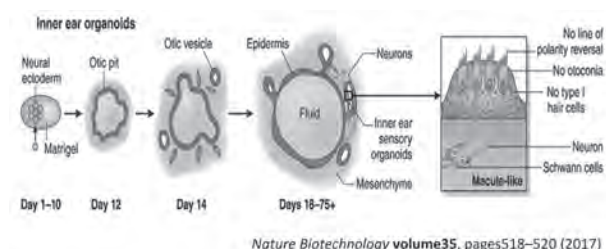


図3. 多能性幹細胞からの in vitro 内耳様組織の形成

プスも構築されている事実には驚嘆するが、コルチ器様ではなくMacula-like構造であり、I型様の有毛細胞もまだできていないようである。私の小研究室でも、マウスES細胞から、できるだけ簡単に内耳有毛細胞を誘導できないかと考え、HIST2法を開発した（図4）²³⁾。EBをST2細胞の培養上清で処理するだけの簡単な操作で約20%の細胞がmyosin7a, myosin6, Math1, Brn3cなどの有毛細胞マーカー陽性細胞に分化し得ることを発見した。さらに、Math1遺伝子発現を誘導すること²⁴⁾やHIST2と併用すること²⁵⁾で、内耳有毛細胞様細胞の誘導効率が上がることも認めている。向後も、この不思議で複雑な小組織内耳にある有毛細胞の成り立ちを解明していきたいと考えている。



図4. ST2細胞培養上清を用いた簡便かつ効率的な内耳有毛細胞誘導法 (HIST2法) と得られた内耳有毛細胞様細胞

参考文献

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156, 1981.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147, 1998.
3. Nishimura F, Yoshikawa M, Kanda S, et al. Potential use of embryonic stem cells for the treatment of mouse parkinsonian models: improved behavior by transplantation of in vitro differentiated dopaminergic neurons from embryonic stem cells. *Stem Cells* 21: 171-180, 2003.
4. Yamada T, Yoshikawa M, Kanda S In vitro differentiation of embryonic stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells* 20: 146-154, 2002.
5. Yamada T, Yoshikawa M, Takaki M, et al. In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 20: 41-9, 2002.
6. Shiroy A, Yoshikawa M, Yokota H, et al. Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithizone. *Stem Cells* 20: 284-292, 2002.
7. Gurdon JB. Adult frogs derived from the

nuclei of single somatic cells. *Dev Biol.* 4: 256-273, 1962.

8. Bulfield G, Campbell K, James R, Wilmot I. Voices from Roslin: the creators of Dolly discuss science, ethics, and social responsibility. Interview by Arlene Judith Klotzko. *Camb Q Healthc Ethics.* 7:121-140, 1998.
9. Takahashi K1, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676, 2006.
10. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872, 2007.
11. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med.* 376: 1038-1046, 2017.
12. Kikuchi T, Morizane A, Doi D, et al. Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 548: 592-596, 2017.
13. <https://www.jst.go.jp/saisei-nw/>
14. Takebe T, Sekine K, Kimura M, et al. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 21: 2661-2670, 2017.
15. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262-265, 2009.
16. Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, et al. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell* 22:454-467, 2018.
17. Oshima K, Shin K, Diensthuber M, et al. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem

- cells. *Cell* 141: 704-716, 2010.
- 18.Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472: 51-56, 2011.
 - 19.Eiraku M, Sasai Y. Mouse embryonic stem cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues. *Nat Protoc.* 7: 69-79, 2011.
 - 20.Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* 12: 520-530, 2013.
 - 21.Koehler KR, Mikosz AM, Molosh AI, Patel D, Hashino E. Generation of inner ear sensory epithelia from pluripotent stem cells in 3D culture. *Nature* 500: 217-221, 2013.
 - 22.Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E, Liu XP, Lee J, Holt JR, Hashino E. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 35: 583-589, 2017.
 - 23.Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Yoshikawa M. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells into inner ear hair cell-like cells using stromal cell conditioned medium. *Cell Death Dis.* 3: e314, 2012.
 - 24.Ouji Y, Ishizaka S, Nakamura-Uchiyama F, Wanaka A, Yoshikawa M. Induction of inner ear hair cell-like cells from Math1-transfected mouse ES cells. *Cell Death Dis.* 4:e700, 2013.
 - 25.Ouji Y, Sakagami M, Omori H, et al. Efficient induction of inner ear hair cell-like cells from mouse ES cells using combination of Math1 transfection and conditioned medium from ST2 stromal cells. *Stem Cell Res.* 23: 50-56, 2017.

抗菌薬を大事に使おう

～耐性菌の検査からその対策まで～

矢野寿一

奈良県立医科大学微生物感染症学講座

Abstract

抗菌薬の使用による薬剤耐性菌の出現は、感染症治療において避けることのできない問題であり、抗菌薬の適正使用はますます重要度が増している。本邦では、2016年に「薬剤耐性アクションプラン」が採択され、耐性菌問題は医療現場のみならず、国を挙げて取り組むべき重要課題として取り上げられた。しかし、本邦でヒトに使用される抗菌薬は約3分の1にすぎず、多くは動物用医薬品や飼料添加物が占めている。そのような経緯から、薬剤耐性菌の問題を含めたヒトの健康のためにはヒト・動物・環境を包括的に捉える「One Health」の考え方が必要不可欠になっている。農学や畜産、獣医学など様々な分野と連携した感染対策が望まれている。

1. はじめに

これまで多くの国々において、次々と臨床応用された抗菌薬による感染症治療が行なわれ効果を発揮してきた。一方で、これら抗菌薬の使用と共に、質的に変異した種々の耐性菌が出現したことも事実である。使用される抗菌薬の種類や量、医療レベルの違いから、国、地域により検出される耐性菌の種類や分離率に差はあるものの、交通機関の発達などに伴い、各種耐性菌も世界規模で急速に拡大するようになり、社会的に重大な問題となってきた。このような経緯から、本邦では、2016年に「薬剤耐性アクションプラン」が採択され、耐性菌問題は医療現場のみならず、国を挙げて取り組むべき重要課題として取り上げられた。

2. 薬剤耐性菌の問題点

薬剤耐性菌とは、抗菌薬に対して抵抗性を持った菌のことであり、抗菌薬の菌への効果がない、あるいは少なくなるという現象が生じる。現在、米国においては、薬剤耐性菌感染症による年間死亡者数は23,000人である¹⁾。本邦においては、年間10,000人が耐性菌感染症により死亡しており²⁾、米国との人口比を考えると本邦の方がむしろ深刻と言えるかもしれない。全世界では、年間70万人が耐性菌感染症により死亡しているが、このまま何も耐性菌に対し策を講じない場合、2050年には年間死亡者数は1,000万人に達すると見込まれている(図1)³⁾。なお、本邦における耐性菌感染症による年間追加コストは1,700億円という膨大な費用がかかっている²⁾。

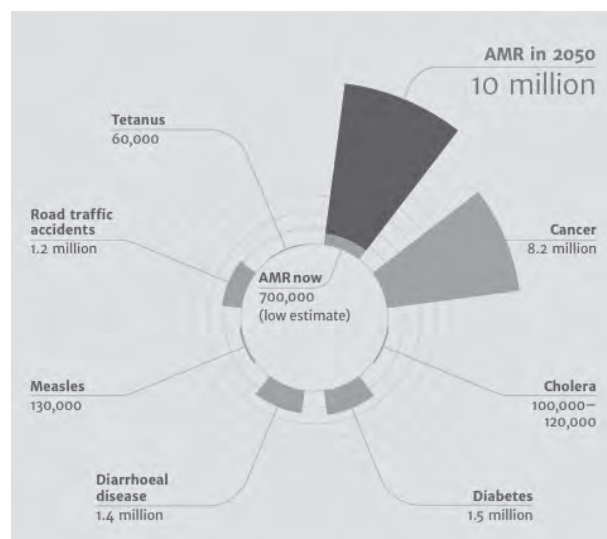


図1. 世界で広がる薬剤耐性菌。2013年現在の耐性菌による年間死亡者数は70万人であるが、このまま対策がとれないと2050年には1,000万人の死亡が予想されている。(文献3より)

3. 薬剤耐性菌の検出

薬剤耐性菌を認識するには、感染部位から検体を採取し、細菌培養検査を実施し、菌種の同定と薬剤感受性試験を行う必要がある。感受性結果から耐性菌か感性菌かの判断が可能となる。一般培養検査手順を図2に示した。

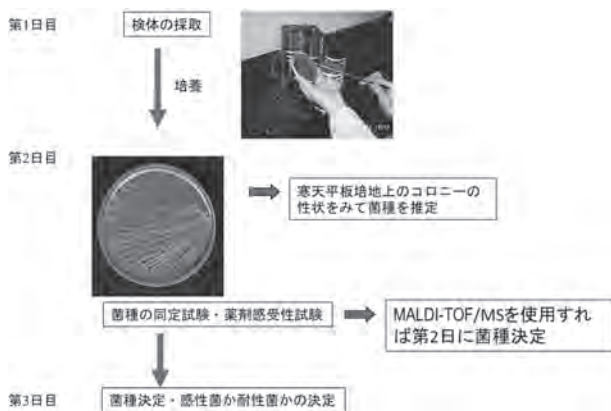


図2. 一般細菌の培養検査手順

細菌培養検査をすると、第3日目には耐性菌か否かが判明することになる。培養検査の時間的流れを理解しておけば、得られるべき情報が未着の場合でも、検査室に問い合わせる等により、情報を得ることができる。また、培養翌日の寒天培地に発育したコロニーの特徴から菌種の推定が可能であり、その報告を受けることで投与中の抗菌薬が適切なものか判断材料となる。

第2日目から約24時間かけて行われる菌種同定検査であるが、近年は質量分析装置(Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry; MALDI-TOF/MS)が普及し、細菌の一部分の質量を計測することで菌種同定が可能となっており、約15分で菌種が決定される。この場合、抗菌薬の選択に有用な情報を1日早く得ることが出来る。

4. 本邦で問題となっている耐性菌

本邦では近年、カルバペネム耐性腸内細菌科(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae; CRE)などの薬剤耐性菌の分離頻度上昇や医療関連感染によるアウトブレイク事例が問題となっている。CREのカルバペネム耐性メカニズムは主に2つあり、¹⁾カルバペネマーゼの産生、²⁾基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ(extended-spectrum

β -lactamase; ESBL)あるいはセファロスポリナーゼ(AmpC)過剰産生と外膜透過性低下との組み合わせである。

カルバペネマーゼとは、イミペネム、メロペネム、ドリペネムなどのカルバペネム系薬を加水分解する β -ラクタマーゼの一種である。カルバペネム系薬は外膜透過性が良好で、強力な殺菌力を主体とした抗菌作用を示すことから感染症治療に重用されてきた。しかしながら、カルバペネマーゼ産生菌にはカルバペネム系薬が無効であることから、本菌による感染症は治療において脅威となる。さらに、この耐性菌は多剤耐性化傾向にあり、 β -ラクタム系薬以外の抗菌薬、すなわちアミノ配糖体やフルオロキノロンなどにも耐性を示す株も多く、抗菌薬療法において選択できる薬剤が全くないというケースもみられる。2014年9月に感染症法施行規則が改正され、CREによる感染症は5類全数報告疾患として医師からの報告が義務付けられている。

5. 薬剤耐性菌を減らすために

薬剤耐性菌が増加した理由のひとつに抗菌薬の不適切使用があげられる。この問題を解決するために、2016年に採択された「薬剤耐性アクションプラン」では、アクションプラン目標値を定めている(表1)。賛否両論ある目標値ではあるが、「経口セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライドの人口千人あたりの一日使用量を2013年の水準から50%削減」という目標値については、我々として実行しやすい状況にある。本邦で処方される抗菌薬のうち、経口抗菌薬の割合は92.4%と非常に高く、経口抗菌薬の使用量を減少させることが早道と考えられる。

2017年7月、厚生労働省より抗微生物薬適正使用の手引きが発刊された⁴⁾。この中には、感冒の治療方法として、「感冒に対しては、抗菌薬投与を行わないことを推奨する」と明記された(急性中耳炎の多い乳幼児は本手引きの対象外)。感冒に対する抗菌薬処方を減らすことが出来れば、50%削減の目標値に近づけると思われるが、患者サイドからの要求で、多くの臨床医が感冒に抗菌薬を処方していると思われる。この手引きを示すことで、

患者に説明しやすくなると思われる。なお、「せき、はな、のどの3症状が、急性にほぼ同時に同程度で出現した場合、発熱の有無にかかわらず、初診時にかぜと診断して良い」と手引きには記載されているが、一方で、咽頭痛を訴える患者では、急性喉頭蓋炎、深頸部膿瘍（扁桃周囲膿瘍、咽後膿瘍、Ludwig アンギーナ等）、Lemierre 症候群等の命に関わる疾病が原因である可能性について注意を促している。耳鼻咽喉科医は、これらの疾患の診断に長けており、むしろ他科医師より率先して感冒への抗菌薬非投与を進められる診療科といえる。

感冒に抗菌薬投与するもう一つの理由として、肺炎への進展の予防を考慮している場合があると思われる。しかし、あるコホートスタディで、感冒患者に1万2,255回抗菌薬を処方すれば入院を要する肺炎を1回防げると報告されている⁵⁾。1万例に1例であれば、アナフィラキシーショックも同様の確率で生じるので、むしろ処方による不利益の方が大きいとも言える。

表1. アクションプランの目標値

2020年の
- 肺炎球菌のペニシリン耐性率を15%以下に - 黄色ブドウ球菌のメチシリン耐性率を20%以下に大腸菌のフルオロキノロン耐性率を25%以下に - 緑膿菌のカルバペネム（イミペネム）耐性率を10%以下に - 大腸菌および肺炎桿菌のカルバペネム耐性0.2%以下を維持 - 人口千人あたりの一日抗菌薬使用量を2013年の水準の2/3に - 経口セファロスポリン、フルオロキノロン、マクロライドの人口千人あたりの一日使用量を2013年の水準から50%削減 - 人口千人あたりの一日静注抗菌薬使用量を2013年の水準から20%削減

表1. アクションプランの目標値

6. One Health の概念

アクションプランの目標となっている抗菌薬使用量の削減であるが、実は我々医療従事者だけの対応ではどうにもならない現実がある。図3に示したが、日本全体の抗菌薬販売量のうち、ヒト用医薬品は3分の1に過ぎず、動物用医薬品や飼料添加物などで占められている。さらに、国別に家畜に対する抗菌薬投与量をみてみると、本邦では全体の1.7%にすぎず、本邦の医療従事者のみで減らせる抗菌薬量はごく僅かということになる⁶⁾。また、環境における耐性菌問題も深刻で、例えばインドの首都ニューデリーの上水道からカルバペ

ネム耐性腸内細菌科が分離されることが報告されている⁷⁾。このようなことから、耐性菌に対する取り組みは世界全体で取り組むべき重要課題と認識され、「ヒト、動物、環境は相互に関連し、それらを全て良い状態にすることで真の健康が得られる」という One Health の概念が2004年に米国野生生物保護学会から提唱された。近年、AMR 問題が認識されるにつれ、この概念が浸透しつつあり、我々医療従事者のみならず、獣医学や畜産学、農学、環境学など、広い視点から様々な分野と連携した耐性菌対策が望まれている。

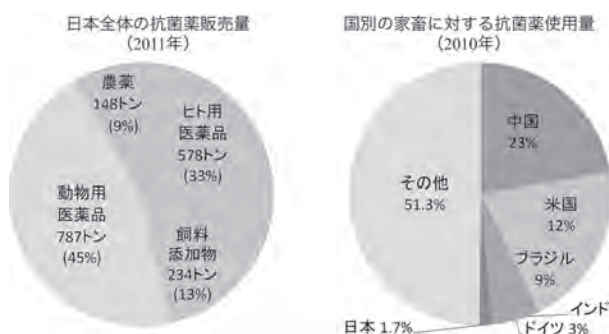


図3. 日本および国別抗菌薬使用量（文献6より）

おわりに

薬剤耐性菌の現状と問題点を中心に紹介した。本邦で問題となっている CRE は耳鼻咽喉科領域に無関係ではない。術後感染症の原因菌となることや、病棟内で蔓延する事例もあり、決して対岸の火事ではないことを心に留めておいていただきたい。

文献

- (1) CDC, ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013
- (2) 厚生労働省：院内感染対策サーベイランス事業 (JANIS) 2016
- (3) Jim O' Neill: Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. 2014 (https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20natinat_1.pdf)

(4) 厚生労働省健康局結核感染症課：抗微生物薬適正使用の手引き 2017

<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000166612.pdf>

(5) Meropol SB, Localio AR, Metlay JP: Risks and benefits associated with antibiotic use for acute respiratory infections: a cohort study. Ann Fam Med 11: 165-72, 2013

(6) 厚生労働省：厚生労働省における AMR の取組

<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000189799.pdf>

(7) Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA: Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect Dis 11:355-62, 2011

フレンツェル眼鏡用小型赤外線眼振撮影システムの開発

伊東伸祐¹⁾、Nguyen Nghia Trong¹⁾、將積日出夫¹⁾、赤荻勝一²⁾、
中里 瑛²⁾、牛島良介³⁾、田里 博⁴⁾、芦澤雄三⁴⁾

- 1) 富山大学耳鼻咽喉科
- 2) 富山赤十字病院耳鼻いんこう科
- 3) ニューロビジネス・アドバイザー
- 4) ユニメック

はじめに

めまい診療において眼振、眼球運動の解析は不可欠であり、電気眼振図 (Electronystagmograph: ENG) による記録が普及し、めまい平衡医学の発展に大いに貢献してきた。また患者診察時の直接的な眼振の観察としては古くからフレンツェル眼鏡が用いられ、近年では赤外線 CCD フレンツェル眼鏡が普及してきている。赤外線 CCD フレンツェル眼鏡は赤外線の眼球による反射を感知し、暗視野下で眼球運動を観察、記録することができ、臨床的意義は極めて高い¹⁾。しかし眼鏡部の他に記録装置や外部モニターを要する様式の製品が多いため持ち運びに向かず、フレンツェル眼鏡に比べ機器が高額であることもあり、救急外来や病棟などの往診先、耳鼻科常勤医が不在の病院の外来などでは導入が十分に進んでいないのが現状である。

また急性めまいの発作時には高度の眼振が出現するが、70%程度の症例では比較的短期間 (3日以内程度) でめまいは軽快し眼振も減弱、消失するとされ¹⁾、大西らは眼振の頻度および緩徐相速度は日数経過に伴い明らかな減少を来すと報告している²⁾。実際のめまい診療の現場においても、往診先や出先の外来にてフレンツェル眼鏡下で眼振を観察するもその場では記録ができず、後日 ENG や赤外線 CCD フレンツェル眼鏡で記録を試みる頃にはすでに眼振が消失してしまっているといったこともよく経験するところである。

そこで我々は、すでにあるフレンツェル眼鏡に取り付け可能な眼振記録装置の開発を行ってきた。これまでに CMOS カメラモジュールを用いたフレンツェル眼鏡取り付け型の超小型眼振撮影装置の試作を行い³⁾、フレンツェル眼鏡の豆電球の照明下での眼振の観察・記録を実現し、フレンツェル眼鏡用眼振撮影装置として特許 (特許第 5578687 号) を取得した。

しかし末梢性めまいにおいて眼振は視覚性に抑制されることが知られており、暗所開眼で眼振の観察が可能な赤外線 CCD フレンツェル眼鏡の眼振検出率はフレンツェル眼鏡の 13.2 倍とする報告⁴⁾もある。我々のフレンツェル眼鏡用眼振撮影装置に関しても赤外線光の導入を検討してきたが、重量などの技術的な面で実現できていなかった。しかし、近年 CMOS カメラモジュールや赤外線発光器などの機器の小型化、軽量化が進んできた。そこで特許を取得したフレンツェル眼鏡用眼振撮影装置を基に、赤外線光を用いた新たなフレンツェル眼鏡用小型赤外線眼振撮影システムの試作を行うに至った。

方法

フレンツェル眼鏡用小型赤外線眼振撮影システムの試作にあたり、(1) フレンツェル眼鏡の片眼に着脱を可能とする、(2) 装着時に片手での操作を可能とする (軽量・小型化)、(3) 本体に赤外線

発光器を装備する、(4) 画像のリアルタイムでの観察を可能とする、(5) 充電電池を内蔵する、(6) 録画データのパソコンへの取り込みを可能とする、以上6つの開発コンセプトを立てた。

まず特許を取得した装置と同様に CMOS カメラモジュールを内蔵することとし、赤外線発光器としては軽量で消費電力が少ない赤外線 LED (940nm) を採用した。また軽量化を図るため撮影装置にモニターは搭載せず、無線 LAN 機能によって外部のパソコンやスマートフォンに映像表示する方式をとった。さらに電源として充電電池 (リチウムイオン二次電池) を用いることで、コードレス化するとともに約 60 分間の連続撮影を可能とした。装置の制作にあたっては株式会社ユニメックの協力を得た。

結果

完成した眼振撮影装置は箱型の本体部分と円柱形のレンズ部分から構成される (図 1)。大きさは本体部分が横 75mm、横 48mm、奥行 30mm、レンズ部分は直径 42mm、長さ 20mm と手のひらに収まるほど小型であり、重量も 87g と軽量である。カメラのフォーカス調整やレンズ位置の調整が行えるつまみも実装した。

開発コンセプトの通り、市販されているフレンツェル眼鏡の片眼への着脱が可能であり (図 2)、対側のレンズを遮蔽することで暗所、赤外線光下での撮影を行うことができた。撮影された映像は虹彩紋理を観察できる程度に鮮明であり (図 3)、無線 LAN でパソコンに接続した状態で 640px × 480px、30fps の AVI ファイル形式として動画の保存が可能であった。

また、装置が軽量かつコードレス化されたシステムであるため、フレンツェル眼鏡に装着した状態での片手操作が可能であり、頭位眼振検査、頭位変換眼振検査を行っても頭部運動の支障になることはなかった (図 4)。さらに頭振り眼振検査などの比較的早い頭位変化時にも装置が脱落することはなく、装用者の使用感も通常のフレンツェル眼鏡使用時とほとんど変化はなかった。

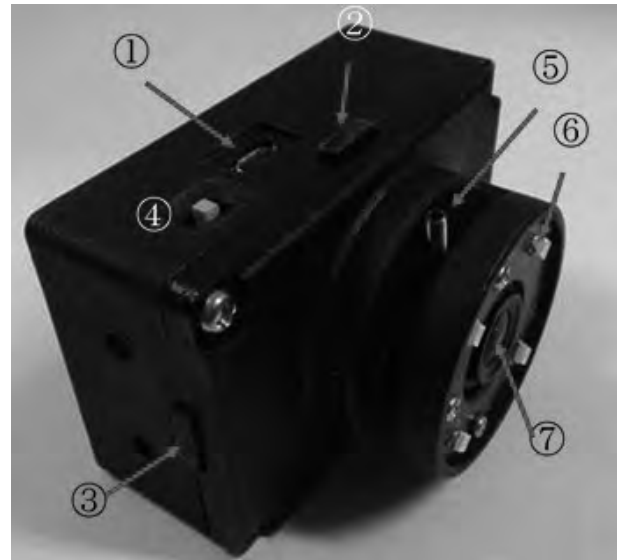


図1. フレンツェル眼鏡用小型赤外線眼振撮影装置(各部位の名称)
①電源用コネクタ, ②レンズ位置調整用つまみ (縦軸), ③レンズ位置調整用つまみ (横軸), ④電源スイッチ, ⑤フォーカス調整用つまみ, ⑥赤外線LEDライト (4個), ⑦レンズ



図2. フレンツェル眼鏡への装着

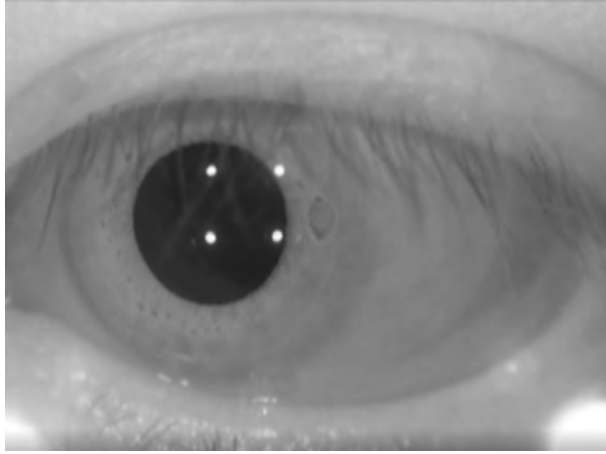


図3. 本システムで記録された眼球画像



図4. 眼振検査で使用している様子

考察

フレンツェル眼鏡用赤外線眼振撮影システムの試作を行い、6つの開発コンセプトを実現することができた。赤外線LEDを用いることで、暗所での眼振の記録が可能になると同時に、小型化、軽量化およびコードレス化することによって、操作性、装着者の使用感ともに実臨床での使用に耐えうるシステムとなった。携帯、運搬が簡便なため、往診先や出先の外来などにおいてもその場で眼振所見を動画として記録することが可能であり、有効な診療補助装置になると考える。

またパソコンやスマートフォンの画面にリアルタイムに映像を表示できるため同時に複数人での観

察が可能であり、医学教育の場面でも活用が期待できる。プロジェクターを用いてスクリーンに投影することで多人数の場面への応用もでき、学生への講義などで頭部運動時の前庭動眼反射を実演するといった利用法も考えられる。

今回開発したシステムでは、パソコンやスマートフォンでの観察には一般的な動画再生ソフトを用いた。しかし、眼振の映像表示や記録はもちろんだが、眼球運動の自動解析が可能な専用ソフトの開発が今後の課題である。

まとめ

一般的なフレンツェル眼鏡に装着して使用する、新たなフレンツェル眼鏡用赤外線眼振撮影システムの開発を行った。臨床診療や医学教育での活用が期待され、今後もさらなる改良を継続していく。

参考文献

- 1) 日本めまい平衡医学会 診断基準化委員会：赤外線 CCD/C-MOS カメラによる頭位および頭位変換眼振検査マニュアル. Equilibrium Res 71：284-286, 2012.
- 2) 大西正樹, 他：ENG 検査日の違いによる眼振の変化について 第二報 眼振頻度および緩徐相速度からの検討. 耳鼻臨床 76：2077-2081, 1987.
- 3) 將積日出夫, 他：フレンツェル眼鏡用超小型眼振撮影装置の試作. Equilibrium Res 70：377, 2011.
- 4) 遠藤まゆみ, 他：フレンツェル眼鏡, 赤外線 CCD フレンツェル眼鏡カメラと ENG) における眼振検出率の比較. Equilibrium Res 54：236-241, 1995.

偏中心回転による球形囊刺激時の眼球運動三次元解析

秋田佳名子¹⁾、今井貴夫¹⁾、Xiuwen Jiang²⁾、奥村朋子¹⁾、
大崎康宏¹⁾、太田有美¹⁾、佐藤 崇¹⁾、猪原秀典¹⁾

1) 大阪大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

2) Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Medical College of Zhejiang University, China

はじめに

ヒトの動作時、景色は相対的に動くので、網膜に写る景色の像のブレを防ぐために反射性眼球運動が解発され、空間内で視線を一定に保つことにより視力を維持する。反射性眼球運動には前庭動眼反射 (vestibule-ocular reflex、以下 VOR) と視運動性眼球運動と呼ばれる二種類の眼球運動が存在する。水平方向の頭部回転により誘発される VOR や視運動性眼球運動刺激により誘発される視運動性眼球運動には左右方向の非対称は存在しないが、垂直方向の頭部回転や視運動性眼球運動刺激により誘発される眼球運動には上下方向の非対称が存在する¹⁾⁻³⁾。我々は中心から離れた位置に被験者を座らせ回転させる偏中心回転刺激により、法線方向、接線方向の直線加速度を被験者に負荷し、その時に誘発される耳石動眼反射を解析してきた⁴⁾⁵⁾。今回我々は偏中心回転による直線加速度にて球形囊を刺激した際に解発される垂直性眼球運動に非対称が存在するか否かを検討した。

方法

被験者はめまいや難聴の既往のない健康成人 10 名 (男性 8 名、女性 2 名、22-47 歳、中央値 33.5 歳) である。被験者は右耳下頭位で回転椅子に座り、回転椅子の位置は、回転中心上 (図 1A)、回転軸から 90cm 後方の位置 (図 1B)、回転軸から 90cm 前方の位置 (図 1C) の三通りとした⁶⁾。図 1B、C に示した椅子の位置での回転時には接線加

速度による直線加速度は頭頂一尾側方向に作用するので球形囊を刺激し、解発される耳石動眼反射は垂直性眼球運動になる。回転椅子の回転周波数は 0.5Hz とし、最大角速度は 50° / 秒とした。この時、最大法線加速度は 0.07G、最大接線加速度は 0.252G になる。被験者に赤外線フィレンツェル (RealEyes; Micromedical Technologies, USA) を装着し、回転中の眼球運動を記録した。眼球運動は我々が開発した三次元眼球運動解析システムにて解析し、axis angle を求めた⁷⁾。axis angle の X 成分は回旋成分を、Y 成分は垂直成分を、Z 成分は水平成分を反映する⁸⁾。当研究は大阪大学医学部附属病院の倫理委員会により承認されており (No. 12095)、被験者から当研究への参加の同意を書面で得た。

結果

10 名中、2 名の被験者にて、図 1 に示したいずれの椅子の位置での回転時にも、眼球運動の垂直成分に非対称を認めた。図 2 に 39 歳男性を図 1C の椅子の位置で回転させた時に得られた眼球運動の axis angle の Y 成分を示す。下眼瞼向き眼振は認めしたが、上眼瞼向き眼振は認めなかった。上眼瞼向きの最大緩徐相速度は 32.1° / 秒であり、下眼瞼向きの最大緩徐相速度は 19.1° / 秒であり、非対称を認めた。他の 8 名では図 1 に示したいずれの椅子の位置でも上眼瞼向き眼振、下眼瞼向き眼振の両者を認め、上眼瞼向き、下眼瞼向きの最大緩

徐相速度はほぼ同じ値であり、非対称を認めなかった。

考察

垂直性の視運動性眼球運動、および、回転刺激により誘発される垂直性 VOR には非対称が存在することはすでに方向されている¹⁾⁻³⁾。今回、我々は偏中心回転刺激に誘発される耳石動眼反射の垂直成分に非対称が存在するかどうかを検討した。10 名の被験者中、2 名と頻度は低い、明らかな非対称を認めた。図 2 に示すように上眼瞼向きの緩徐相速度の方が下眼瞼向きの緩徐相速度に比べ速かった。上眼瞼向きの緩徐相速度の方が速いため、上下方向の非対称が存在するのは視運動性眼球運動や回転刺激に対する垂直性の VOR と同じ結果であった¹⁾⁻³⁾。

是永らは垂直性の視運動性後眼振を計測することにより上眼瞼向き緩徐相、および下眼瞼向き緩徐相に対する速度蓄積機構の働きを検討し、下眼瞼向き緩徐相に対し速度蓄積機構は働いておらず、上眼瞼向き緩徐相に対し速度蓄積機構は働いてはいるが個人差が大きいことを報告している⁹⁾。垂直性の視運動性眼球運動や VOR にて上眼瞼向きの緩徐相速度の方が速いため生ずる上下方向の非対称は上眼瞼向き緩徐相に対してのみ速度蓄積機構が働いているためであると考えられる。今回の我々の研究で 2 名にて偏中心回転刺激時に誘発される耳石動眼反射の垂直成分に非対称が存在したのは垂直性の視運動性眼球運動や VOR と同様に上眼瞼向きの緩徐相に対し、速度蓄積機構が働くことにより、緩徐相速度が大きくなったためであると考えられる。10 名中、2 名にしか非対称を認めなかったのは是永らの報告にあるように上眼瞼向きの緩徐相に対する速度蓄積機構には個人差が存在するためであると考えられる。

図説

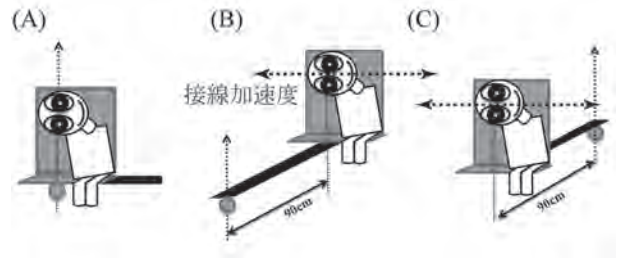


図 1. 当研究での被験者の頭および回転椅子の位置

被験者は右耳を下にする頭位で回転椅子に座った。

(A) 回転椅子は回転中心上に存在

被験者には回転刺激のみが負荷される。

(B) 回転椅子は回転中心から 90cm 後方に存在

被験者には回転刺激に加え直線加速度刺激が負荷され、半規管動眼反射による眼球運動と接線加速度により誘発された耳石動眼反射による眼球運動の向きは正反対である。

(C) 回転椅子は回転中心から 90cm 前方に存在

被験者には回転刺激に加え直線加速度刺激が負荷され、半規管動眼反射による眼球運動と接線加速度により誘発された耳石動眼反射による眼球運動の向きは同じである。

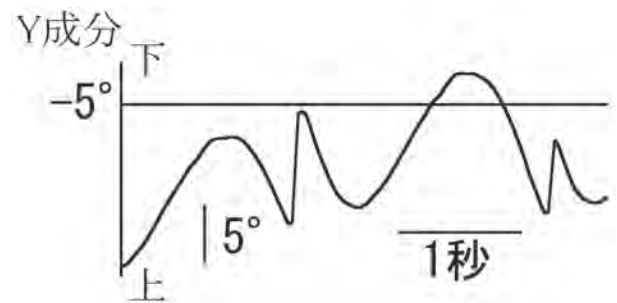


図 2. 図 1C の回転椅子の位置での偏中心回転により解発された眼球運動

Y 成分（垂直成分）を示す。下眼瞼向きの眼振は認めるが、上眼瞼向きの眼振は認めない。

注：眼振は axis angle 表記なので、正の方向が下、負の方向が上である。

参考文献

1. 石田正幸, 渡辺行雄, 川崎匡: ネコの水平・垂直性視運動性眼振と視運動性後眼振の解析. 日本耳鼻咽喉科学会会報 107: 179-87, 2004
2. Clément G: A review of the effects of space flight on the asymmetry of vertical optokinetic and vestibulo-ocular reflexes. J Vestib Res 13: 255-63, 2003
3. Akao T, Kumakura Y, Kurkin S, Fukushima J, Fukushima K: Directional asymmetry in vertical smooth-pursuit and cancellation of the vertical vestibule-ocular reflex in juvenile monkeys. Exp Brain Res 182: 469-78, 2007
4. Takimoto Y, Imai T, Okumura T, Takeda N, Inohara H: Three-dimensional analysis of otolith-ocular reflex during eccentric rotation in humans. Neurosci Res 111: 34-40, 2016
5. Okumura T, Imai T, Takimoto Y, Takeda N, Kitahara T, Uno A, Kamakura T, Osaki Y, Watanabe Y, Inohara H: Assessment of endolymphatic hydrops and otolith function in patients with Ménière's disease. Eur Arch Otorhinolaryngol 274: 1413-2, 2017
6. Jiang X, Imai T, Okumura T, Ohta Y, Osaki Y, Sato T, Inohara H: Three-dimensional analysis of the vestibulo-ocular reflex and the ability to distinguish the direction of centripetal acceleration in humans during eccentric rotation with the right ear facing downwards. Neurosci Res 2018 in press
7. Imai T, Takeda N, Morita M, Koizuka I, Kubo T, Miura K, Nakamae K, Fujioka H: Rotation vector analysis of eye movement in three dimensions with an infrared CCD camera. Acta Otolaryngol 119: 24-8, 1999
8. 今井貴夫: Video-oculography(VOG) - 眼球運動の三次元解析-. Equilibrium Res 62: 61-74, 2003
9. 是永克実, 牧嶋和見, 吉田雅文, 工藤香児, 樋口哲: 垂直性 OKN と OKAN の方向非対称性に関する実験的研究. 日本耳鼻咽喉科学会会報 99: 1085-94, 1996

動物モデルを用いた免疫組織化学的手法による 前庭代償の新しい評価法

松田和徳¹⁾、北原 紉²⁾、伊藤妙子²⁾、佐藤 豪¹⁾、福田潤弥¹⁾、武田憲昭¹⁾

1) 徳島大学医学部 耳鼻咽喉科

2) 奈良県立医科大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科

はじめに

メニエール病や前庭神経炎、めまいを伴う突発性難聴などの疾患により一側の末梢前庭機能が低下すると、めまいが発症し、著しい眼振や平衡障害が生じる。しかし、このような眼振や平衡障害は、末梢前庭機能が回復しなくても、中枢前庭系の機能代償により次第に軽減していく。中枢前庭系の神経可塑性に基づく末梢前庭障害の機能代償を、前庭代償 vestibular compensation と呼ばれている¹⁾²⁾

前庭代償は、前期過程と後期過程に分けられる。前庭代償の前期過程では小脳を介して健側前庭神経核ニューロンの自発発火が抑制されることにより、左右の前庭神経核ニューロンの活動性の不均衡が是正される³⁾。次の段階である前庭代償の後期過程では、低下していた患側前庭神経核ニューロンの自発発火が回復してくる⁴⁾。これにより前庭代償が完成する⁵⁾ (図1)

前庭代償の完成には、患側前庭神経核ニューロンの活動性の回復し、両側前庭神経核ニューロンの均等な活動性の回復が必要であるが、これまでに一側前庭障害後の患側前庭神経核ニューロンの活動性の回復の程度を評価する免疫組織化学的手法がなかった。われわれは、以前に一側内耳破壊術後のラットにNMDA 受容体拮抗薬であるMK801 を投与すると、健側向き眼振が最出現する脱代償が誘発され、健側前庭神経核にFos 陽性ニューロンが出現することを見だし、前庭代償における小脳を介して抑制されていた健側前庭神経核のニューロンを可視化できることを明らかにした⁶⁾。

本研究において、一側内耳破壊術ラットを前庭代償モデル動物として用い、免疫組織化学的手法により前庭代償後期過程である患側前庭神経核ニューロンの活動性の回復の程度を評価する新しい評価方法を開発する。

前庭代償の進行状況

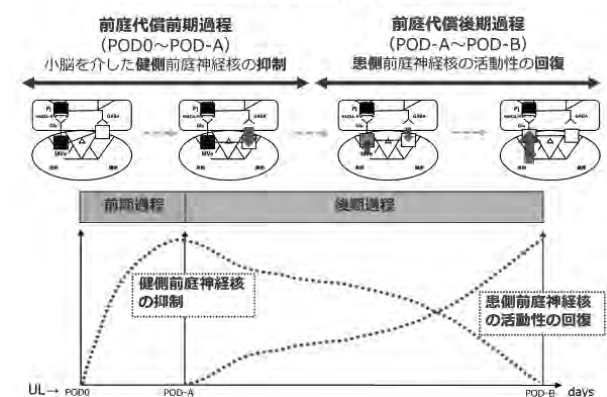


図1

方法

Wistar 種系ラット (7 週齢 150 ~ 200g) を使用した。本研究の計画および実施においては、法令を遵守し、徳島大学動物実験管理規則に基づき、徳島大学 大学院医歯薬研究部 総合研究支援センター 動物資源研究部 動物実験委員会において承認を受けている。

小動物用吸入麻酔器を用いてイソフルラン吸入麻酔下にすべての外科的処置を行った。右耳後部切開後に、経外耳道的に鼓膜を確認後に穿破し、

耳小骨を確認した。ツチ骨、キヌタ骨およびアブミ骨を除去し、卵円窓を確認し、卵円窓經由で27G針やドリルで小孔を開け、リンパ液の流出を確認後に、開放部位より99.5%エタノールを注入し、吸引を数回繰り返した。Sham手術群は、耳介後部切開のみを行った。

内耳破壊術後6、12時間、1日、2日、3日、5日、7日、12日、14日において、生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行った。また、内耳破壊術後6、12時間、1日、2日、3日、5日、7日、12日、14日において、それぞれのラットにMK801を腹腔内に投与し、投与2時間後に生理食塩水および4%パラホルムアルデヒドを用いて還流固定を行った

本研究では、前庭代償の動物行動学的指標として眼振数を用いた。ズームレンズ付きSONY製ビデオカメラで眼振数を記録し、それぞれのラットにおいて15秒間の眼振数を3回測定した。眼振は、内耳破壊術後30分、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間、24時間、30時間、36時間、42時間の時点で測定した。

前庭神経核を含む脳幹を凍結後に30 μ mの切片を作成した。1次抗体にanti-Fos antibody (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)を、2次抗体にanti-rabbit IgG (Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., Nagoya, Japan)を用い、発色にはDABを用いた。

結果

内耳破壊後、健側向きへの自発眼振が出現した。内耳破壊術後30分で25-35 (平均30.08 $\pm$ 5.04) 回/15秒と最大値となり、その後徐々に減少し、術後42時間で消失した。一方、一側内耳破壊術後ラットに生理食塩水を投与しても眼振は出現せず (n = 4, data not shown)、sham手術後ラットにMK801を投与しても眼振は出現しなかった (n = 4, data not shown)。

正常コントロールラット、sham手術実施ラットおよび生理食塩水を投与されたラットのいずれにおいてもFos陽性ニューロンは前庭神経核にはほとんど出現しなかった。内耳破壊術6時間後に、Fos陽性ニューロンは患側前庭神経核に出現し、

健側前庭神経核には出現しなかった。健側前庭神経核に出現したFos陽性ニューロン数は内耳破壊術6時間後に最大となり、その後徐々に減少し、内耳破壊術5日後には消失した。健側前庭神経核においては、内耳破壊術6時間後、12時間後、1日後、2日後、3日後、5日後、7日後、10日後、12日後および14日後のいずれの時期においてもFos陽性ニューロンは出現しなかった。一方、脱代償時におけるFos陽性ニューロンの発現状況について、内耳破壊術6時間後、12時間後、1日後、2日後、3日後、5日後、7日後、10日後、12日後および14日後におけるMK801投与で誘導される健側前庭神経核のFos陽性ニューロン数の経時的变化を検討した。内耳破壊術後にMK801を投与後の脱代償にて誘導される健側前庭神経核のFos陽性ニューロン数は、内耳破壊術1日後に最大値となり、その後徐々に減少し、内耳破壊術14日後において、MK801投与2時間後には健側前庭神経核におけるFos陽性ニューロン数は正常コントロールラットおよびsham手術実施ラットとほぼ同程度となった。

考察

前庭神経核ニューロンは内在的なペースメーカー活性を持っており、これに加えて前庭神経などからの興奮性入力により自然発火が維持されている。一側内耳の前庭が障害を受けると、末梢前庭器からの入力情報が欠如し、障害側の前庭神経核ニューロンの自然発火は著しく低下する。それと同時に障害側前庭神経核ニューロンによる健側前庭神経核ニューロンに対する両側前庭神経核間の交連線維連絡を介した抑制が消失するために、健側前庭神経核ニューロンの自然発火が亢進する。このように左右の前庭神経核ニューロンの活動性の不均衡により、眼振や平衡障害が生じ、中枢前庭系による前庭代償機構が誘導される⁴⁾。

前庭代償は、前期過程と後期過程に分けられる。前庭代償の前期過程では、亢進した健側前庭神経核ニューロンの自然発火が、前庭小脳—前庭神経核抑制系により抑制され、左右の前庭神経核ニューロンの活動性の不均衡が是正される³⁾。次の段階である前庭代償の後期過程では、低下していた障

害側前庭神経核ニューロンの自発発火が細胞膜特性の変化により回復し⁴⁾、前庭代償前期過程で生じた健側前庭神経核への抑制がなくても左右の前庭神経核ニューロン間の活動性の左右差が是正され、前庭代償が完成する⁵⁾。内耳破壊術直後より生じる左右の前庭神経核ニューロンの活動性の不均衡により、眼振が生じ、前庭代償の前期過程のメカニズムである前庭小脳—前庭神経核抑制系により健側前庭神経核の活動性が抑制され、左右の前庭神経核ニューロンの活動性の不均衡が是正されることにより、眼振は消失する。したがって、前庭代償の前期過程である、健側前庭神経核の活動性の抑制は、眼振数の経時的变化で評価することが可能である（図2）。

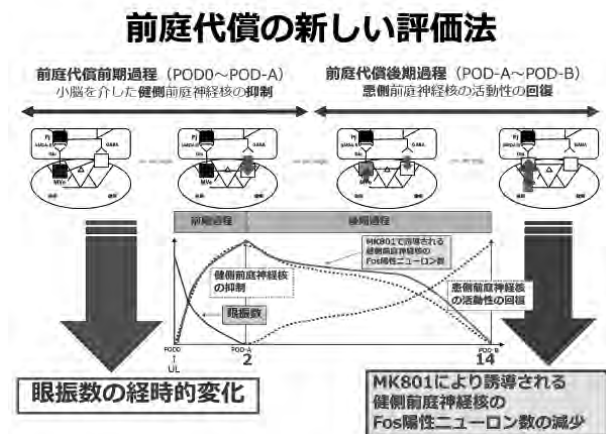


図2

本研究において、最初期遺伝子である c-fos の産物である Fos 蛋白を神経活性化のマーカーとして免疫組織化学的手法を行った。われわれは、以前に一側内耳破壊術後のラットに NMDA 受容体拮抗薬である MK801 を投与すると、健側向き眼振が再出現する脱代償が誘発され、健側前庭神経核に Fos 陽性ニューロンが出現することを見だし、前庭代償における小脳を介して抑制されていた健側前庭神経核のニューロンを可視化できることを明らかにした⁶⁾。前庭代償の後期過程では、低下していた患側前庭神経核ニューロンの自発発火が細胞膜特性の変化により回復し⁴⁾、前庭代償の前期過程で生じた健側前庭神経核への抑制がなくても左右の前庭神経核ニューロン間の活動性の左右差が是正され、前庭代償が完成する⁵⁾。つまり、

前庭代償の後期過程は、低下していた患側前庭神経核ニューロンの自発発火の回復が不可欠である。前庭代償の前期過程が終了した後に、患側前庭神経核ニューロンの活動性は次第に回復し、それと同時に健側前庭神経核ニューロンの活動性の抑制は減弱してくる。NMDA 受容体を介した前庭小脳—前庭神経核抑制系により抑制されていた健側前庭神経核ニューロンは、前庭代償の後期過程が終了前には、NMDA 受容体拮抗薬である MK801 投与による脱代償で誘発される Fos 陽性ニューロンとして出現する。したがって、前庭代償の後期過程である、患側健側前庭神経核の活動性の抑制は、MK801 投与により誘導される健側前庭神経核における Fos 陽性ニューロン数の減少の経時的变化で評価することが可能である（図2）。

まとめ

本研究で、前庭代償動物モデルを用いた免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法を開発した。

前庭代償の後期過程、すなわち患側前庭神経核の活動性の回復を、内耳破壊術後の MK801 により誘導される健側前庭神経核の Fos 陽性ニューロン数の減少で評価できることを明らかにした。

今後、本研究で証明した前庭代償の新しい評価方法を用いて、様々な薬剤やリハビリなどの前庭代償の促進効果を検討していきたい。

- 1) Precht, W. and Dieringer, N., Neuronal events paralleling functional recovery (compensation) following peripheral vestibular lesions. In A. Berthoz and G. Melvill Jones (Eds.), Adaptive Mechanism in Gaze Control, Facts and Theories, Elsevier, Amsterdam, 1985, pp.251-268.
- 2) Smith, P.F. and Curthoys, I.S., Mechanism of recovery following unilateral labyrinthectomy : a review, Brain Res. Rev., 14 (1989)155-180.
- 3) 武田憲昭、北原 紘：前庭代償のメカニズム . JOHNS 17 : 831 - 834, 2001

- 4) 北原 紘：前庭代償． *Equilibrium Res* 59:103-111,2000
- 5) Vibert N, Bantikyan A, Babalian A, Serafin M, Mühlethaler M, Vidal PP.: Post-lesional plasticity in the central nervous system of the guinea-pig: a "top-down" adaptation process?. *Neuroscience*. 1999;94(1):1-5.
- 6) Kitahara T, Takeda N, Saika T, Kubo T, Kiyama H.. Effects of MK801 on Fos expression in the rat brainstem after unilateral labyrinthectomy, *Brain Res* 700(1995):182-190

前庭神経炎の障害神経部位診断

—前半規管膨大部神経炎症例をもとに—

肥塚 泉、宮本康裕、三上公志、鈴木 香
望月文博、四戸達也、大原章裕、笹野恭之

聖マリアンナ医科大学耳鼻咽喉科

はじめに

前庭神経炎は、聴覚症状を伴わない単発性の突発性回転性めまいを主症状とする疾患である¹⁾。急性期を脱すると、回転性めまいは軽快するものの浮動感や平衡障害が長期にわたって持続し、ADL (Activity of Daily Life) の低下を来すこともある。男性にやや多く、発症年齢は50歳代に多いとされている。前庭神経炎の英語表記には、前庭神経の障害を意味する vestibular neuritis と前庭神経節ニューロンの障害を意味する vestibular neuronitis があるが、同義語として扱われている。前庭神経炎を急性の側性末梢性前庭障害 (acute unilateral peripheral vestibulopathy) とする考え方もある²⁾。今回我々は、前半規管膨大部神経炎が疑われた1症例を経験したので、本症例を元に、今現在用いられている前庭神経炎の診断基準の問題点について考察を加える。

症例と方法

症例：40歳代の男性

主訴：めまい、歩行障害

現病歴：20XX年YY月ZZ日、めまい、歩行障害が出現、軽快するも持続するので2週後当科受診となった。発症11日前に感冒様症状があった。

既往歴：5年前から左耳鳴、今回のめまいに伴って増強等はなかった。

家族歴：特記すべき事項はない。

方法

温度刺激検査は両側外耳道に20℃の冷水50 mlを、20秒間かけて注入して行った。解発された眼

振の最大緩徐相速度から以下の計算式によりCP (%)を算出した。

$$CP (\%) = (| \text{右耳反応} - \text{左耳反応} | / (\text{右耳反応} + \text{左耳反応}) | \times 100$$

CP (%) ≥ 20%を半規管麻痺とした。

cervical vestibular evoked myogenic potentials (cVEMP) の測定は国際ガイドライン³⁾に従って行った。誘発電位検査装置 (ニューロパック®、日本光電) を用いて測定した。記録電極には皿電極を使用し、関電極を胸鎖乳突筋の筋腹中央、不関電極を胸骨上縁外側縁に貼付した。低域遮断フィルターは20 Hz、高域遮断フィルターは2000 Hzとした。500 Hzのショートトーンバースト (rise/fall time 1 msec, plateau time 2 msec) を105dB SPL、5 Hzの頻度でヘッドホンより与えて刺激とした。加算回数は50回とした。刺激開始前20 msecから刺激開始時までの波形下面積の積分値 (背景積分筋電図値) を用いて、以下の計算式より補正振幅値を求めた。

$$\text{補正振幅値} = (\text{得られた振幅}) / (\text{背景積分筋電図値})$$

左右2回ずつ測定を行って再現性を確認した。補正振幅値が対側の50%以下、あるいは反応なしのものを異常と判定した。

ocular vestibular evoked myogenic potentials (oVEMP) は、記録電極には皿電極を使用し、関電極を下眼瞼の直下、不関電極をその約2 cm下方に貼付した。被験者を仰臥位にした後、上方を注視させ、眼球を上転させた状態で記録した。その他の条件はcVEMPと同様である。補正振幅

が対側の 50%以下、あるいは反応なしのものを異常と判定した。なお、すべての平衡機能検査の実施は初診日から 3 週間後であった。

video head impulse test(vHIT) の測定には、EyeSeeCam[®] (Interacoustics, Denmark) を用いた。前庭動眼反射 (vestibulo ocular reflex: VOR) の利得 ≤ 0.8 (垂直半規管系の利得は ≤ 0.7) かつ catch up saccade (CUS) が出現した場合を異常 (機能低下) と判定した。

結果

初診時の所見

初診時の眼振検査では、回旋成分を有する下眼瞼向きの自発・頭位・頭振後眼振を認めた (図 1)。眼振の垂直成分ならびに回旋成分の方向から、左前半規管の麻痺性眼振と判定した。visual suppression は正常であった。注視時眼球運動検査では、眼球運動はスムーズ、注視眼振は認めなかった。

平衡機能検査 (初診から 6 週間後に実施)

温度刺激検査では、左 cp% は 20.3% であった。cVEMP と oVEMP の結果を図 2 に示す。いずれの検査にも異常を認めなかった。vHIT の結果を図 3 に示す。左前半規管の利得の低下および CUS、covert saccade の出現を認めた (mixed)。平衡機能検査の結果のまとめを表 1 に示す。MRI 検査 (拡散強調画像: DWI、T1 強調画像: T1W) では異常所見を認めなかった (図 4)

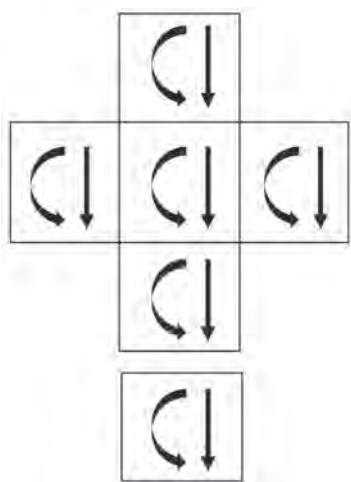


図 1. 初診時の眼振所見

cVEMP



oVEMP

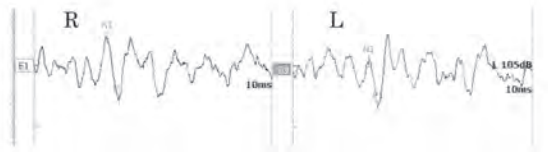


図 2. cVEMP と oVEMP の結果

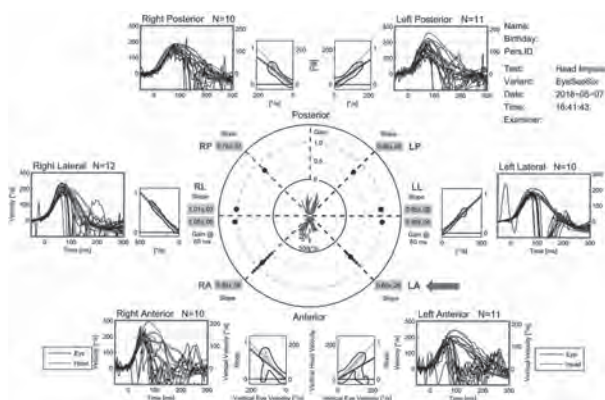


図 3. vHIT の結果

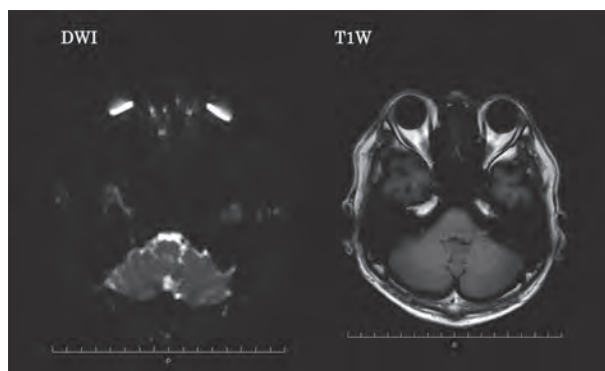


図 4. MRI (拡散強調画像: DWI、T1 強調画像: T1W)

考察

今回我々が経験した症例においては、初診時は、回旋成分を有する下眼瞼向き自発・頭位・頭振後眼振を認め、前半規管に病変が局限していると考えた。初診から 6 週間後に施行した平衡機能検査では、温度刺激検査では左 cp% は 20.3%、vHIT では左前半規管においては、利得の低下および、CUS と covert saccade の両者を認める、「mixed」

という結果であった。以上より、本症例において病初期は、前半規管の膨大部神経に病変が局限していたため、回旋成分を有する下眼瞼向き眼振を認め、その後、上前庭神経全体に病変が広がっていったと考えられる。温度刺激検査では左 cp% は 20.3% と外側半規管の機能低下を認めたが、左外側半規管 vHIT では、利得は 0.99 / CUS(-) と、正常所見を示した。つまり、上前庭神経の病変についても神経全体ではなく、部分障害であった可能性が示唆される。前庭神経炎 (vestibular neuritis) 診断基準 (2017) ⁴⁾ を表 2 に示す。本症例は、B. 検査所見の 2. 「回転性めまい発作時に自発および頭位眼振検査で方向固定性の水平性または水平回旋混合性眼振を認める。」が合致せず、前庭神経炎疑い例 (Probable vestibular neuritis) という診断になる。従来、前庭神経炎の障害部位については、上前庭神経が主体であると考えられてきた ^{5) 6)}。Fetter ら ⁵⁾ は前半規管、外側半規管、後半規管の機能を個別に評価することを目的に、サーチコイルを用いて、自発眼振の解析および回転椅子で頭部に roll、pitch、yaw の、3つの回転面で振子様刺激を加えた際の、各回転面での前庭動眼反射の利得を計測した。前庭神経炎症例では後半規管の機能低下は認めず、外側半規管、または外側半規管と前半規管の求心路を含む前庭神経上部に障害を認めると報告した。Brodsky JR ら ⁷⁾ は、19 歳以下の前庭神経症例 (11 症例) に対して、振子様回転検査、温度刺激検査、video Head Impulse Test (vHIT)、subjective visual vertical (SVV)、cervical Vestibular Evoked Myogenic Potentials (cVEMP) を用いて、後ろ向きに検討を加えている。その結果、全症例が上前庭神経炎であったと報告している。解剖学的にも、上前庭神経が通る骨管は単神経の骨管よりも長く、また、上前庭神経と栄養血管の通路は単神経の通路よりも狭いので、障害を受けやすいと報告されている ^{8) 9)}。しかし、前庭神経炎患者の中に下前庭神経の機能を反映する cVEMP の異常を示す症例が存在し、病変が上前庭神経のみならず、下前庭神経にもおよんでいる症例も存在する可能性が示されるようになった ¹⁰⁾。また、上前庭神経の機能を反映する温度刺激検査は正常で

あるが、cVEMP で異常を示す症例 (下前庭神経炎) が存在することが報告されている ¹¹⁾。Halmagyi ら ¹²⁾ は、外側半規管の Head Impulse Test (HIT) および温度刺激眼振検査は正常で、後半規管の HIT および cVEMP で機能低下を認める症例を下前庭神経炎と提唱している。下前庭神経炎を臨床的に認識しにくい理由として、急性期の自発眼振の振幅は小さく、温度刺激検査の結果は正常であるため、これまでは中枢性前庭障害と診断されていた可能性がある指摘している。Aw ら ¹³⁾ は、前庭神経炎における上前庭神経と下前庭神経の障害について、個別の半規管を HIT で評価し、前庭神経炎は上・下前庭神経の両方または上前庭神経を選択的に障害し得ると報告している。Taylor ら ¹⁴⁾ は、発症 10 日以内の前庭神経炎 (45 症例) に対して、cVEMP、ocular Vestibular Evoked Myogenic Potentials (oVEMP)、vHIT を用いて、前向きに検討を加えている。その結果、外側半規管の機能低下を認めたものが 97.7%、前半規管の機能低下を認めたものが 90.7%、卵形囊の機能低下を認めたものが 72.1% で、これらは、後半規管の機能低下 (39.5%)、球形囊の機能低下 (72.1%) よりも有意にその頻度が高かったと報告している。上・下前庭神経の両方に機能低下を認めたものは 55.8%、上前庭神経に機能低下を認めたものは 41.9%、下前庭神経に機能低下を認めたものは 2.3% であった。これら以外にも、膨大部神経炎といった限局的な障害を起こす症例 ^{12) 15)} や、前庭神経炎の診断基準に合致するものの、前庭神経が障害されたのではなく、内耳に病変が存在する内耳障害型が存在することも報告されている ^{12) 16) - 18)}。今後は、本症例のような、前庭神経や三半規管の部分的障害症例も考慮した診断基準の作成が必要と考える。

参考文献

1. 水田啓介、青木広光、出原啓一：前庭神経炎．*Equilibrium Res* 72: 135-44、2013
2. 武田憲昭：前庭神経炎の診断と治療．*日耳鼻* 119: 220-1、2016
3. Papathanasiou ES, Murofushi T, Akin FW, et al.: International guidelines for the

- clinical application of cervical vestibular evoked myogenic potentials. An expert consensus report. Clin Neurophysiol 125: 658–666, 2014
4. めまいの診断基準化のための資料. 診断基準 2017 年改定 Equilibrium Res 76: 233-241, 2017
 5. Fetter MI, Dichgans J: Vestibular neuritis spares the inferior division of the vestibular nerve. Brain 119: 755-63, 1996
 6. Strupp M, Brandt T: Vestibular neuritis. Semin Neurol 29: 509-19, 2009
 7. Brodsky JR, Cusick BA, Zhou G: Vestibular neuritis in children and adolescents: Clinical features and recovery. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 83: 104-8, 2016
 8. Goebel J, O' Mara W, Gianoli G: Anatomic considerations in vestibular neuritis. Otol Nerotol 22: 512-18, 2001
 9. Gianoli G, Goebel J, Mowry S, et al: Anatomic differences in the lateral vestibular nerve channels and their implications in vestibular neuritis. Otol Neurotol 36: 489-94, 2005
 10. Kim HA, Hong JH, Lee H, et al: Otolith dysfunction in vestibular neuritis: recovery pattern and a predictor of symptom recovery. Neurology 70: 449-53, 2008
 11. Murofushi T, Halmagyi GM, Yavor RA, et al: Absent vestibular evoked myogenic potentials in vestibular neurolabyrinthitis. An indicator of inferior vestibular nerve involvement? Arch Otolaryngol Head Neck Surg 122: 845-48, 1996
 12. Halmagyi GM, Aw ST, Karlberg M, et al: Inferior vestibular neuritis. Ann N Y Acad Sci 956: 306-13, 2002
 13. Aw ST, Fetter M, Cremer PD, et al: Individual semicircular canal function in superior and inferior vestibular neuritis. Neurology 57: 768-74, 2001
 14. Taylor RL, McGarvie LA, Reid N, et al:

Vestibular neuritis affects both superior and inferior vestibular nerves. Neurology 87:1704-12,2016

15. Magliulo G, Gagliardi S, Ciniglio AM, et al: Vestibular neuro-labyrinthitis: a follow-up study with cervical and ocular vestibular evoked myogenic potentials and the video head impulse test. Ann Otol Rhinol Laryngol 123: 162-73, 2014
16. Murofushi T, Takegoshi H, Ohki M, et al: Galvanic-evoked myogenic responses in patients with an absence of click-evoked vestibulo-collic reflexes. Clin Neurophysiol 113: 305-9, 2002
17. Murofushi T, Monobe H, Ochiai A, et al: The site of lesion in “vestibular neuritis” : study by galvanic VEMP. Neurology 61: 417-18, 2003
18. 阿久津征利, 北島明美, 三上公志, 他: video Head Impulse Test, 温度刺激検査, VEMP を用いた前庭神経炎の障害部位の検討. Equilibrium Res 74: 534-40, 2015

表 1. 平衡機能検査結果のまとめ

温度刺激検査 左 CP%	vHIT (左) 利得/CUS		oVEMP (左)	vHIT (左) 利得/CUS	oVEMP (左)
	外側半規管	前半規管	卵形嚢	後半規管	球形嚢
20.31 %	0.99 / (-)	0.60 / mixed	65.9 %	0.69 (-)	97.9 %
上前庭神経				下前庭神経	

 = 異常値

CP : canal paresis, CUS: catch up saccade, mixed: catch up saccade + covert saccade

表 2 前庭神経炎 (vestibular neuritis) 診断基準 (文献 4 より引用)

A. 症状

1. 突発的な回転性めまい発作で発症する。回転性めまい発作は 1 回のことが多い。
2. 回転性めまい発作の後, 体動時あるいは歩行時のふらつき感が持続する。

3. めまいに随伴する難聴，耳鳴，耳閉塞感などの聴覚症状を認めない。
4. 第Ⅷ脳神経以外の神経症状がない。

B. 検査所見

1. 温度刺激検査により一側または両側の末梢前庭機能障害（半規管機能低下）を認める。
2. 回転性めまい発作時に自発および頭位眼振検査で方向固定性の水平性または水平回旋混合性眼振を認める。
3. 聴力検査で正常聴力またはめまいと関連しない難聴を示す。

4. 前庭神経炎と類似のめまい症状を呈する内耳・後迷路性疾患，小脳，脳幹を中心とした中枢性疾患など，原因既知の疾患を除外できる。

診断

前庭神経炎確実例（Definite vestibular neuritis）

A. 症状の4項目を満たし，B. 検査所見の4項目を満たしたものの。

前庭神経炎疑い例（Probable vestibular neuritis）

A. 症状の4項目を満たしたものの。

老人性難聴モデルマウスにおける CD4⁺T リンパ球分画移入による難聴予防

岩井 大¹⁾、Van DB¹⁾、鈴木健介¹⁾、小林良樹¹⁾、尹 泰貴¹⁾、
高田洋平¹⁾、福井英人¹⁾、神田 晃¹⁾、稲葉宗夫²⁾

関西医科大学 1) 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学講座

2) 内科学第1講座

はじめに

慢性両側性感音難聴の原因として主に遺伝的要因、音響暴露、薬物、酸化ストレスが挙げられるなか、老人性難聴はどうであろう。老人性難聴は高齢化社会にあって75歳以上の高齢者の半数に発症しさらに増加傾向であるが、この原因に上記4因子のみをあてはめることは難しく、「予防しがたい加齢徴候のひとつ」として扱われているのではないだろうか。

一方、全身免疫機構と、聴覚系を含む中枢神経系との関連性が次第に明らかとなってきた。胸腺摘出を受けた動物では、リンパ球・マクロファージなどの免疫担当細胞とサイトカインに不均衡が生じ、これが脳血液関門を通して中枢に及び、認知障害が生じる¹⁾。中枢認知機能障害であるアルツハイマー病は、急性・慢性全身炎症の増強により認知障害が進行する²⁾。難聴の研究においても、その原因を蝸牛のみに求めるのではなく全身免疫機構障害の蝸牛への影響に目が向けられ、加齢性の慢性炎症(inflammaging)と感音難聴との関連を調べた研究では、75歳以上の高齢者において、白血球数が高いほど老人性難聴が進むことが示された³⁾。2型糖尿病や心臓血管病患者では、健常人に比しより老人性難聴が進んでいた⁴⁻⁶⁾。加齢性免疫低下による老廃物蓄積・炎症遅延(慢性炎症)は、炎症性細胞からの活性酸素を刺激・誘導して、修復不能の組織障害・加齢性萎縮を進行させるとされる⁷⁾。したがって、全身免疫改変(免疫若返り)

ができれば、加齢性聴覚障害(老人性難聴)を予防できる可能性を考える。

一方、筆者はかつてカロリー制限によりインターロイキン2受容体(IL-2R)の発現が亢進し、免疫機能が賦活化することを報告した⁷⁾。聴力正常マウスの骨髄を用いた骨髄移植や、胎児胸腺移植による「免疫若返り」により難聴を予防できた⁹⁻¹¹⁾。また、免疫担当細胞の細胞表面抗原と遺伝子の解析により、以下の3つのCD4⁺T細胞分画が難聴の進行・予防に関係していることを推定した¹²⁾。

1) Treg: 制御性T細胞(Treg。CD2⁺Foxp3⁺CD4⁺、あるいは、FR4^{high}CD4⁺細胞)。詳細な機序はいまだ不明だが、免疫機能低下や臓器萎縮を引き起こす。加齢で増加。

2) T1R2: インターロイキン1(IL-1)受容体2型を発現するT細胞(IL-1R2⁺CD4⁺T細胞)。IL-1による免疫刺激をこの受容体がブロックし免疫機能を低下させ、また、組織萎縮を起こす。加齢で増加。

3) nTnI: TregとT1R2が除かれたCD4⁺T細胞分画

そこで今回、SAMP1に定期的にnTnIを接種(同系移入)したところ、難聴や螺旋神経節萎縮の進行が予防されたので報告する。

材料と方法

用いたマウスはSAMP1であり、早期老化・早期老人性難聴モデルマウスである(図1)。

SAM(老化促進マウス、Senescence-Accelerated Mouse)はAKR/J系マウスから確立したマウスで、「老化促進モデルマウス(SAM)学会」が管理運営している。SAMにはP1からP10までの系統がある(表1)。SAMP1では、ヒトと同じく加齢に伴い胸腺(骨髄からの幼弱Tリンパ球を成熟Tリンパ球に育てる)の萎縮とTリンパ球機能障害が生じる。難聴はおおよそ5ヶ月齢から明らかとなり、高音を含めた広い音域で閾値の悪化を示す¹³⁾。この難聴に匹敵する蝸牛病変は主にらせん神経節(spiral ganglion、SG)萎縮である。その他の老化徴候として、脊椎彎曲、脱毛、老人性白内障、行動鈍麻などがある。これらの徴候は胸腺萎縮とTリンパ球機能低下に引き続いて起こるとされる^{13,14)}。



図1. SAMP1

12ヶ月齢。早期に発症し加齢に伴って促進する老人性難聴のほか、胸腺萎縮、細胞性免疫機能障害、老化アミロイドーシス、老人性白内障・角膜炎、皮膚潰瘍、脱毛、脊椎彎曲、行動鈍麻などを認める。

老化促進モデルマウス (SAM)学会のホームページより改変	
SAM*	特徴
SAMP1	胸腺萎縮、細胞性免疫機能障害、早期老人性難聴、腎萎縮、老年性肺過膨張、老化アミロイドーシス
SAMP2	老化アミロイドーシス、免疫機能不全、腎萎縮
SAMP3	顎関節の変形性骨関節症、続発性アミロイドーシス
SAMP6	老年性骨粗鬆症、続発性アミロイドーシス、大腸炎
SAMP7	老化アミロイドーシス、胸腺腫
SAMP8	学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常
SAMP9	白内障、老化アミロイドーシス
SAMP10	脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス

*AKR/J系マウスと未知の系統との不測の交雑が生じて出来たコロニーで、促進老化・短寿命を示す10系統が確立されている。老化促進モデルマウス(SAM)学会が管理運営し、日本ではSRLから販売されている。

表1. SAM(Senescence-Accelerated Mouse,老化促進モデルマウス)

方法として、SAMP1をホストとし、この5ヶ月齢から、8ヶ月齢SAM(ドナー)由来のT1R2(1×10^6 個)、Treg(1×10^6 個)、T1R2 + Treg移入(各 1×10^6)、nTnI移入(1×10^6)、あるいは生理食塩水を、1.5ヵ月ごとに4回移入する群を作製した。また、無処置の2,5ヶ月齢マウスを作製した。

12ヶ月齢において、1)難聴(聴性脳幹反応ABR;クリック音および純音)、2)蝸牛螺旋神経節萎縮(側頭骨切片作製)、3)酸化ストレスとしての血清一酸化窒素(nitric oxide, NO)濃度をそれぞれ検索した。

結果

①2ヶ月齢群(無処置)、5ヶ月齢群(無処置)、12ヶ月齢群(生食注)の間で、加齢とともに難聴が進んでおり、加齢性難聴が確認された。

②12ヶ月齢nTnI(接種)群は、5ヶ月齢群(無処置)と有意差なくこの群と同じ聴力を保ち、また、12ヶ月齢群(生食注)と比し有意に加齢性難聴が予防された。

③12ヶ月齢nTnI群は、他の12ヶ月齢の群(生食、T1R2、Treg、T1R2 + Treg)に比し有意に細胞が保たれ萎縮が予防された。

④2ヶ月齢群と12ヶ月齢群(生食注)のNO濃度に有意差はなく、持続的なNOの産生が考えられた。

⑤一方、12ヶ月齢nTnI群のNO産生は他の12ヶ月齢の群より有意に低値を示し、NO産生が抑えられていた。

考察

今回の研究結果より、nTnIの細胞分画には、「NO産生を抑制し、体循環を通して加齢性難聴やSG萎縮を予防する働きのある細胞」が存在する可能性を考える。

NOは、神経系細胞、血管内皮、血小板、好中球から恒常的に、また、線維芽細胞、Mφなどから炎症刺激の結果として産生される。したがって、全身細胞性免疫機能と蝸牛機能との橋渡しにはリンパ球とともにNOの関与が考えられる。すなわち、加齢により増加するT1R2やTreg、IL-1産生低下・反応低下、あるいは、それによる慢性炎

症と酸化ストレスが、血行性に SG へ作用し細胞萎縮を促進し、免疫を改善させれば萎縮が阻止できる可能性を考える¹⁵⁾。

免疫機能正常化や免疫若返りは、蝸牛の機能障害・萎縮の阻止因子であることが明らかとなった。臨床応用を考えた場合、骨髄移植は実施困難であろうが、食物・カロリー摂取制限と同様に、慢性感染性免疫疲弊（結核や誤嚥など）の回避や、口内を含めた身体・生活環境の清潔保持が、難聴、ひいては老化を阻止するために役立つと思われる。こうした感染回避の生活習慣は、quality of life を強く求める先進諸国の人々の間では、食物・カロリー摂取制限より実施可能かもしれない。また、胸腺は 18 歳ごろから退縮し、のちに T1R2 や Treg が増加するので、それ以前で採取された CD4⁺T リンパ球、あるいは、T1R2・Treg を除いた CD4⁺T リンパ球 (nTnI) を保存し、加齢徴候の現れる前に移入すれば、抗加齢作用を発揮するかもしれない。いずれにせよ、人口老齢化の中にあって、免疫老化を防ぐことによる抗加齢対策は今後一層重要になると考える。

本研究遂行に対し、関西医科大学耳鼻咽喉科研究助成会、および、科研費（21592170、25462655、16K11202）の援助を受けた。

文献

- 1) Song et al. Song C. The effect of thymectomy and IL-1 on memory: implications for the relationship between immunity and depression. Brain Behav Immunol. 16: 557-68,2002.
- 2) Holmes et al. Holmes C, Cunningham C, Zotova E, Woolford J, Dean C, Kerr S, et al. Systemic inflammation and disease progression in Alzheimer disease. Neurology. 73:768-74,2009.
- 3) Verschuur, C, Agyemang-Prempeh, A, Newman TA. Inflammation is associated with a worsening of presbycusis: evidence from the MRC national study of hearing. Int J Audiol 53:469-75,2014.
- 4) Frisina ST, Mapes F, Kim S, Frisina DR, Frisina RD. Characterization of hearing loss in aged type II diabetics. Hear Res 211:103-13,2006.
- 5) Gates GA, Cobb JL, D'Agostino RB, Wolf PA. The relation of hearing in the elderly to the presence of cardiovascular disease and cardiovascular risk factors. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 119:156-161,1993.
- 6) Tra Y, Frisina, RD, D' Souza M. A novel high-throughput analysis approach: immune response-related genes are regulated in age-related hearing loss. Open Access Bioinformatics. 3:107-22,2011.
- 7) Casciaro M, Di Salvo E, Pace E, et al. Chlorinative stress in age-related diseases: a literature review. Immun Ageing 14:21, doi: 10.1186/s12979-017-0104-5. 2017
- 8) Iwai H, Fernandes G. Immunological functions in food-restricted rats: enhancement of expression of high-affinity interleukin-2 receptors on splenic T cells. Immunol Lett 23:125-133,1989.
- 9) Iwai H, Lee S, Inaba M, et al: Prevention of accelerated presbycusis by bone marrow transplantation in senescence accelerated mice. Bone Marrow Transplant 28:323-328,2001.
- 10) Iwai H, Baba S, Omae M, Lee S, Yamashita T, Ikehara S. Maintenance of systemic immune functions prevents accelerated presbycusis. Brain Res 1208:8-16,2008.
- 11) Iwai H, Inaba H. Fetal thymus graft prevents age-related hearing loss and up regulation of the IL-1 receptor type II gene in CD4⁺ T cells. J Neuroimmunol 250:1-8,2012.
- 12) Iwai H, Inaba M. Fetal thymus graft enables recovery from age-related hearing loss and expansion of CD4-positive T

- cells expressing IL-1 receptor type 2 and regulatory T cells. Immun Ageing DOI: 10.1186/s12979-015-0053-9,12-26 2015.
- 13) Saitoh Y, Hosokawa M, Shimada A, et al: Age-related hearing impairment in senescence-accelerated mouse (SAM). Hear Res 75: 27-37,1994.
- 14) Hosono M, Hanada K, Toichi E, et al: Immune abnormality in relation to nonimmune diseases in SAM mice. Exp Gerontol 32: 181-195,1997.
- 15) 岩井 大. 全身免疫操作による進行性感音難聴の予防と治療. 耳鼻展 61:12-23,2018.

LOXHD1b 遺伝子 knockout ゼブラフィッシュの 作成について

樽本俊介^{1,2)}、浅岡洋一²⁾、菅原一真¹⁾、広瀬敬信¹⁾

竹本洋介¹⁾、清木 誠²⁾、山下裕司¹⁾

1) 山口大学大学院 医学系研究科 耳鼻咽喉科学

2) 山口大学 大学院医学系研究科 システムズ再生・病態医化学講座

はじめに

先天性の聴覚障害の発生頻度は、出生 1000 人に約 1 人と言われており、先天性疾患の中で最も高頻度に認められる疾患の一つである。先天性難聴の原因について近年の調査によると少なくとも 50% は遺伝子が関与しているものと推測され、また 25 % 程度はウイルス感染症や外傷、薬物など非遺伝性的原因による難聴であると言われている。現在、難聴の遺伝子解析と臨床応用に関する研究が進んできており、多くの難聴の原因遺伝子を特定することが可能となってきた。現在までに難聴に関与するとされる遺伝子は 100 種類程度存在するとされ、その原因遺伝子ごとに症状が異なることが明らかになってきている。遺伝学的検査により難聴の原因が明らかになった場合、難聴に対する有用な治療法の選択や聴力予後の推定に有用な場合がある。

遺伝性難聴の原因遺伝子として Grillet らによって報告された *LOXHD1* 遺伝子は、DFNB77 の原因遺伝子とされ、マウスでは有毛細胞の感覚毛に発現することが報告されている。¹⁾ 臨床的には常染色体劣性遺伝の形式をとる進行性難聴であり、*LOXHD1* 遺伝子変異が原因の難聴家系は国内でも報告されている。^{2,3)} 今回我々は、*LOXHD1b* 遺伝子のゼブラフィッシュ側線器における発現と *LOXHD1b* 遺伝子 Knockout ゼブラフィッシュを用いた *LOXHD1* の機能解析について検討したの

で報告する。

方法

ヒト *LOXHD1* 遺伝子の ortholog はゼブラフィッシュのゲノム上に存在することが The zebrafish information network にて確認されている (*LOXHD1a* 遺伝子および *LOXHD1b* 遺伝子)。ヒト *LOXHD1* 遺伝子とゼブラフィッシュ *LOXHD1a* 遺伝子および *LOXHD1b* 遺伝子の間のアミノ酸一致率はそれぞれ 54.67%、55.83% であった。

In situ hybridization

LOXHD1a 遺伝子及び *LOXHD1b* 遺伝子の局在を知るために Wholemount *in situ* hybridization を行った。生後 3 日目及び 5 日目のゼブラフィッシュから total RNA を抽出し、total RNA から逆転写反応により cDNA プールを作成した。*LOXHD1a* 遺伝子及び *LOXHD1b* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて同遺伝子の cDNA を PCR にて増幅し、電気泳動にて目的とした cDNA が増幅されているかどうか確認した。その後、制限酵素 BamHI で切断したプラスミドベクター (pGEM-3Zf) と cDNA をライゲーションし、大腸菌をトランスフォームした。翌日生えたコロニーに対して PCR を行い、目的の cDNA が挿入されていることを確認した。目的の cDNA が挿入されたプラスミドを大腸菌から抽

出した後に EcoRI または Hind III で切断し、DIG RNA Labeling Kit (Roche 社) を用いてセンス鎖 cRNA プローブとアンチセンス鎖 cRNA プローブを作成した。RNA プローブには Digoxigenin (DIG) が取り込まれており、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体で認識させ、最終的には BM purple のアルカリフォスファターゼ基質の発色反応で検出した。対照としてセンス RNA プローブを、遺伝子発現の確認としてアンチセンス鎖 RNA プローブを用いた。

Knockout ゼブラフィッシュの作出

Knockout ゼブラフィッシュの作出には CRISPR/Cas9 システムを用いた。^{4,5)} gRNA の標的配列については *LOXHD1b* 遺伝子の第 1 exon 上の 20 塩基の長さの配列を選択した。gRNA と Cas9 RNA を 2:1 の割合で混合した。1 細胞期および 2 細胞期のゼブラフィッシュ受精卵に gRNA と Cas9 の混合溶液を微量注入した (図 1)。微量注入を行った胚を成魚になるまで育成した後、野生型ゼブラフィッシュと交配させて F1 世代を得た。さらに F1 世代の胚を成魚になるまで育成した後、F1 世代同士を交配させて F2 世代のゼブラフィッシュを作成した。

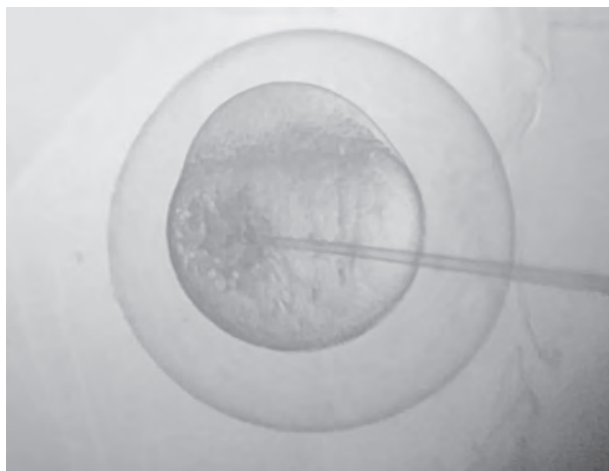


図1

結果

In situ hybridization

In situ hybridization の結果、*LOXHD1b* 遺伝子の発現がゼブラフィッシュ側線器において観察

された。

Knockout ゼブラフィッシュの作出

ゼブラフィッシュ側線器において発現が認められた *LOXHD1b* 遺伝子の *in vivo* における生理機能を明らかにするため、*LOXHD1b* 遺伝子の Knockout ゼブラフィッシュの作出を試みた。*LOXHD1b* 遺伝子に対する gRNA を作成し、gRNA と Cas9 mRNA を混合した溶液をゼブラフィッシュ受精卵に微量注入した。微量注入を施した胚を成魚まで育成した後、野生型を交配させて F1 世代を作成した。F1 世代の *LOXHD1b* 遺伝子における変異導入の効率を HMA 法により評価した。その結果 F1 世代の雄雌共にヘテロ変異体の電気泳動パターンが認められ、塩基配列の解析から雄雌それぞれにおいて塩基の欠損が認められた。次にこれら F1 世代の雄雌を交配させて F2 世代においてホモ変異体を作成した。F2 世代における変異導入についても F1 世代と同様に HMA 法および塩基配列解析により評価し、ホモ変異体の作出を確認することができた。また同個体の塩基欠損は F1 世代の雄雌双方の塩基欠損のパターンを引き継いでいることが確認された。作出した *LOXHD1b* 遺伝子ホモ変異体の中には横向きや上下逆のまま泳ぐ個体が観察されており、現在これらの遊泳異常と *LOXHD1b* 遺伝子変異の相関を精査している。(図 2)



図2

考察

ゼブラフィッシュは全ゲノム配列でヒトと 80% の相同性があることや生後 72 時間で器官が形成され、1 度に 200 匹程度産卵すること、側線器有毛細胞は内耳有毛細胞と構造的、生理学的に類似しており、有毛細胞が体表面にあるため、観察が容易であることから、有毛細胞の実験にはしばしば使用される。⁶⁾ また薬剤スクリーニングを行う上で、実験動物としてゼブラフィッシュはマウスより有用と考えられることから、本研究においてゼブラフィッシュを選択した。 *In situ* hybridization にて、側線器に *LOXHD1b* 遺伝子が発現することが明らかになったことから、CRISPR/Cas9 システムを用いて *LOXHD1b* 遺伝子の knockout ゼブラフィッシュを作成した。一部の胚で異常運動が認められたため、LOXHD1b 蛋白の有毛細胞における機能低下などが考えられる。今後は電子顕微鏡を用いて *LOXHD1b* ホモ変異体における感覚毛の詳細な形態観察を実施する予定である。さらに現在 *LOXHD1b* 遺伝子に加え、*LOXHD1a* 遺伝子の Knockout も作成中であり、これらの遺伝子変異ゼブラフィッシュを用いたヒト聴覚障害モデルの確立は将来的な治療薬剤のスクリーニングに役立つものと期待される。

参考文献

1 Nicolas Grillet, Martin Schwander, Michael

S. Hildebrand et al. Mutations in LOXHD1, an Evolutionarily Conserved Stereociliary Protein, Disrupt Hair Cell Function in Mice and Cause Progressive Hearing Loss in Humans. *Am J Hum Genet.* 2009; 85(3) : 328-337.

2 Kentaro Mori, Hideaki Moteki, Yumiko Kobayashi et al. Mutations in LOXHD1 gene cause various types and severities of hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2015; 124(10) : 135-141.

3 Shujiro B. Minami, Hideki Mutai, Kazunori Namba et al. Clinical characteristics of a Japanese family with hearing loss accompanied by compound heterozygous mutations in LOXHD1. *Auris Nasus Larynx.* 2016; 43(6) : 609-613.

4 藤原祥高, 伊川正人. 今すぐ始めるゲノム編集. 羊土社. 2014; 95-107

5 Hwang W.Y. et al. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology.* 2013; 31: 227-229.

6 Yousuke Takemoto et al. Protective effect of an astaxanthin nanoemulsion against neomycin-induced hair-cell damage in zebrafish. *Auris Nasus Larynx.* 2018; 45: 20-25.

マウス音響障害モデルに対する Adalimumab 投与における内耳保護効果の検討

山本陽平、菅原一真、山下裕司

山口大学医学部医学系研究科 耳鼻咽喉科学

はじめに

音響障害では、内耳において炎症性サイトカインが増加し、有毛細胞の障害や蝸牛血流の低下を介して難聴へ関与することが示唆されている^{1, 2)}。炎症反応の主要なメディエーターである TNF α も音響障害後に増加することが知られており、TNF α を抑制することで難聴を抑えることができたとする報告がある³⁾。今回我々はマウスにおいて、抗ヒトモノクローナル抗体製剤である Adalimumab を音響負荷前に投与すると内耳保護効果を得られるのではないかと仮説を立て、検討を行った。

対象と方法

動物は CBA/N マウス（日本エスエルシー株式会社）の雄で 6-7 週齢、体重 20-25g のものを使用した。

音響負荷の条件としては、当教室の PTS モデルである、中心周波数 4kHz の octave band noise で 130dB SPL・5 時間の負荷を設定した。

実験手順としては、まず動物を Adalimumab 投与群と Control 群の 2 群（それぞれ $n = 8$ ）に分け、負荷前の ABR を測定した（System3 聴性脳幹反応 ABR システム、バイオリサーチセンター）。音響負荷の 1 時間前にそれぞれ 10mg/kg の Adalimumab（アッヴィ合同会社）または生理食塩水を腹腔内投与した。更に音響負荷 7 日後に ABR を測定し、負荷前後の ABR 閾値の変化を比較した。その後、速やかに断頭して蝸牛を取り出した後、ファロイジンで染色して有毛細胞の欠損率を比較した。

結果

ABR 閾値は、音響負荷前と比較して、負荷後には各周波数で 20-50dB の上昇を認めた（図 1）。

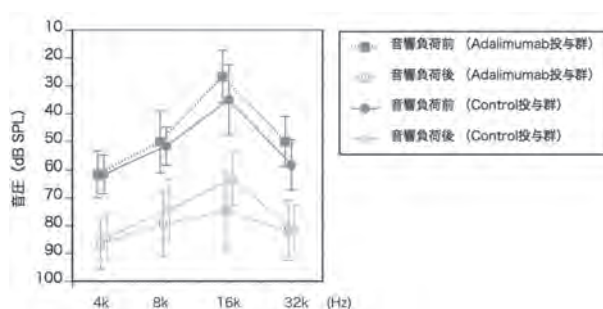


図1

当教室の負荷条件下では、負荷後 7 日目の閾値上昇は両群ともに 16kHz で最大となった。2 群間の音響負荷後の ABR 閾値上昇を比較すると、各周波数でいずれも Adalimumab 投与群の方が閾値が大きくなる傾向にあった。明確な有意差は出なかったものの、16kHz では $p=0.089$ という結果であった。

断頭後に摘出した蝸牛は有毛細胞を取り出してファロイジン染色を行い、頂回転側と基底回転側に分けて評価した（図 2）。写真の通り、Adalimumab 投与群の方が Control 群よりも有毛細胞の欠損率が高い傾向にあり、Adalimumab 投与群は頂回転側 8.1%、基底回転側 11.7%、Control 群は頂回転側 3.6%、基底回転側 3.8% であり、基底回転側では $p=0.0036$ と有意な差が得られた。

結果をまとめると以下の通りである。我々は事前の想定では Adalimumab 投与群の方が Control

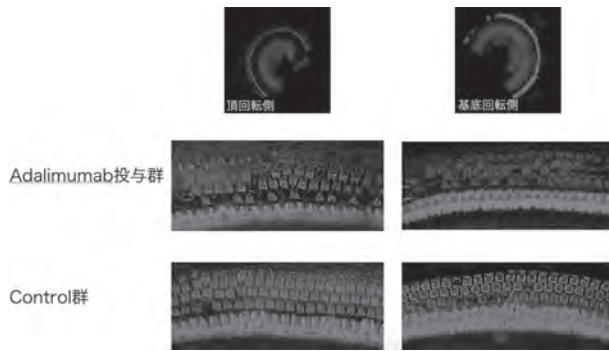


図2

群よりも ABR 閾値の上昇は抑えられ、有毛細胞欠損率も小さくなると予想していた。しかし音響負荷後の ABR 閾値については、Adalimumab 投与群の方が逆に各周波数で閾値が大きくなる傾向が見られた。また、ファロイジン染色による有毛細胞欠損率の比較でも、Adalimumab 投与群の方が欠損率が高くなる傾向にあり、特に基底回転側では有意な差が得られた。

考察

2006 年の藤岡らの報告によると、極端な変化ではないものの音響暴露後に TNF α が一過性に増加することが示されている¹⁾。また、Warangkana らは、TNF α 阻害薬である Etanercept をモルモットに投与すると、音響負荷後の ABR 閾値上昇が抑制されたと報告している³⁾。これらの報告をもとに我々は本研究を計画したが、結果は逆であった。当施設の中本らの過去の報告では、TNF α は他の炎症性サイトカインとは異なり、音響障害がない状態でも明らかに発現を認めており、内耳において常時発現していることが示されている⁴⁾。さらに大石らのノックアウトマウスの研究では、TNF α が欠損すると外有毛細胞の消失や形態変化がみられ、難聴を生じることが示されている⁵⁾。

今回の結果と上述の報告から考えると、TNF α は内耳障害にも関与しているが、一方で内耳の機能維持にも関与している可能性示唆されたと考える。すなわち、TNF α が増加すると炎症反応を誘発し内耳障害を生じる可能性があるが、逆に TNF が α を抑制しすぎると内耳の恒常性に悪影響が生じる可能性があるのではないかとと思われる。

今後はさらに検討数を増やすとともに、TNF α 阻害薬投与後の内耳における TNF α の発現の程度の確認や、音響負荷なしで Adalimumab をマウスに投与していった場合に難聴が生じることがないか等、追実験を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Masato Fujioka, et al. Proinflammatory cytokines expression in noise-induced damaged cochlea. *Journal of Neuroscience Research*. 2006; 83:575-583
- 2) 吉田尚弘, 小林俊光, 音響外傷に関する最近の知見, *耳鼻臨床* 100:5:323 ~ 331, 2007
- 3) Warangkana Arpornchayanon, et al. TNF- α inhibition using etanercept prevents noise-induced hearing loss by improvement of cochlear blood flow in vivo. *Int J Audiol*. 2013 Aug;52(8):545-52
- 4) Tetsuya Nakamoto, et al. Geranylgeranylacetone suppresses noise-induced expression of proinflammatory cytokines in the cochlea. *Auris Nasus Larynx* 39 (2012) 270-274
- 5) Naoki Oishi, et al. Tumor Necrosis Factor- α -mutant Mice Exhibit High Frequency Hearing Loss. *JARO* 14: 801-811 (2013)

新規内耳特異的発現抑制モデルマウスを用いた Dach1 遺伝子の機能解析

三輪 徹^{1,2)}、蓑田涼生¹⁾、折田頼尚²⁾

1) 熊本総合病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 中耳・内耳手術センター

2) 熊本大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

はじめに

内耳原基である耳胞への遺伝子 / 蛋白質導入は、遺伝性難聴の治療法として、または発生過程にある内耳における遺伝子 / 蛋白質の機能を調べる上でも、極めて魅力的な方法である¹⁾⁻⁶⁾。我々は、これまでに常染色体劣性無症候性難聴の原因の一つである Connexin30 (Cx30) を標的とする Short hairpin RNA (shRNA) plasmid (shRNA-Cx30) を、Electroporation 法により正常マウス耳胞へ導入し、難聴が発現することを報告してきた^{1),2)}。ShRNA は、RNA interference (RNAi) による遺伝子サイレンシングのために用いられるヘアピン型の RNA 配列であり、ダイサーによって short interfering RNA (siRNA) へと切断され、RNA 誘導サイレンシング複合体と結合する。この複合体が siRNA と相補的な配列を持つ mRNA に結合し、目的の遺伝子を切断する。

今回我々は、ノックアウトマウスが胎生致死⁷⁾である Dachshund Family Transcription Factor 1(Dach1) 遺伝子に着目し、前述の方法を用いて実験を行った。Dach1 遺伝子は、ショウジョウバエの dachsfund gene(dac) の哺乳類ホモログとして同定された⁸⁾。ショウジョウバエにおいては、dac 遺伝子の欠損によりショウジョウバエの眼、四肢が低形成となることが報告され⁷⁾、dac 遺伝子は各組織の分化を促進することが知られている⁹⁾。一方、正常マウス胎生期内耳において Dach1 は、E12 の耳胞背側および E15 の蝸牛管外側 (蝸牛血管条に分化する領域) に発現することが報告され

ている¹⁰⁾。このことから、Dach 1 を標的とする shRNA(shRNA-Dach1) プラスミドを胎生期 11.5 日 (E11.5) の段階で導入することにより、内耳における Dach1 の確実な発現抑制が可能であると考ええる。

方法

CD-1 正常マウスの E11.5 の耳胞へ、Dach1 の siRNA 発現ベクターである shRNA-Dach1 プラスミドの混濁液を Microinjection 法にて注入し、Electroporation 法により遺伝子導入した。蛍光マーカーとして Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) を用いた。コントロールには shRNA-scramble プラスミドを用いた。まず、処置後 4 日 (E15.5) で胎仔を摘出、切片を作製し in situ hybridization(ISH) 法を用いて内耳原基細胞での Dach1 mRNA の発現の有無を確認した。また、処置後 7 日 (E18.5) で帝王切開を行い、胎仔を代理母に育成させ生後 30 日 (P30) の時点で蝸牛の機能的・形態学的評価を行った。実験デザインを図 1 で示した。機能的評価には Auditory Brain Response (ABR) を用いた。形態学的評価には凍結切片作製後、免疫染色を行った。有毛細胞の評価には Surface Preparation を用いた。

統計学的検討には Student の t 検定を用い、p 値が 0.05 未満を有意と判定した。

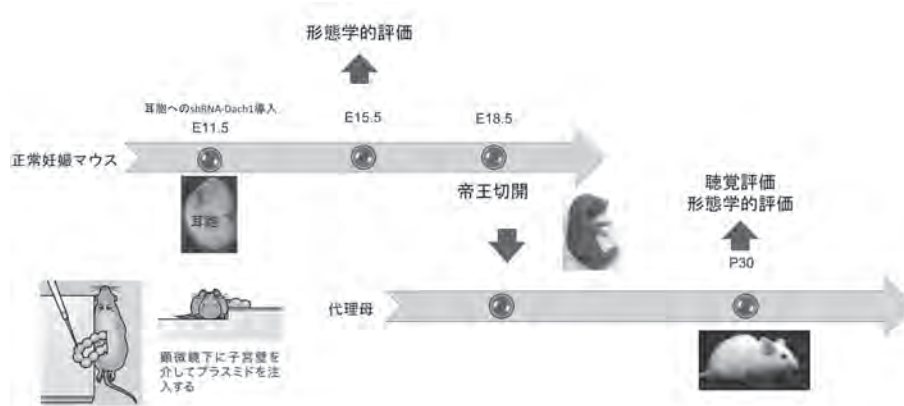


図1. 遺伝子導入方法と実験デザイン(著者らの総説⁶⁾より引用改変)

結果

EGFP を付与した shRNA-Dach1、shRNA-scramble(コントロール) は以前の我々の報告同様¹⁾²⁾、胎生期内耳の予定感覚上皮、内側壁、外側壁へ導入された(データ非掲載)。Dach1 の発現を E15.5 の時点で ISH 法で確認したところ、コントロール群では胎生期内耳上皮の外側壁に Dach1 mRNA の発現を認め、shRNA-Dach1 を導入した群では、Dach1 mRNA 発現の消失を認めた(図 2)。P30 における ABR では、shRNA-Dach1 を導入した群は、コントロールを導入した群よりも

有意に聴力閾値が上昇していた(図 3)。免疫染色において、shRNA-Dach1 を導入した群では、中間細胞のマーカである Kir4.1 の発現が消失していた(図 4)。また、辺縁細胞のマーカである KCNQ1、基底細胞のマーカである Claudin11 の発現には変化がなかったが、血管条の厚さは薄く変化していた(図 5)。また、shRNA-Dach1 を導入した群では外有毛細胞の脱落を認めたが、コントロール群では外有毛細胞の脱落をほぼ認めなかった(図 6)。

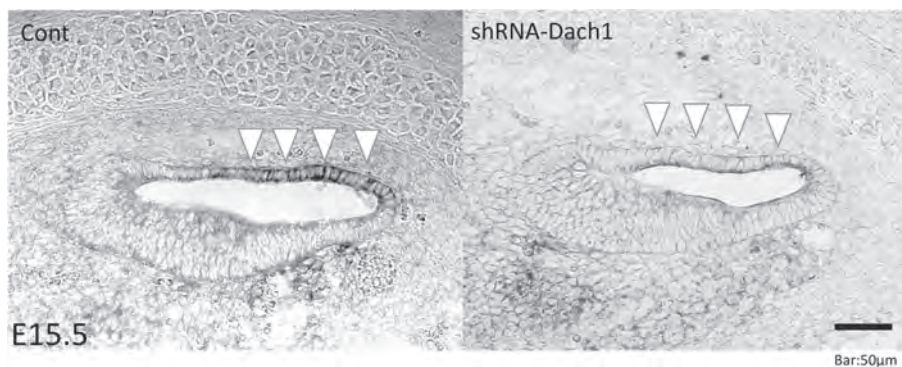


図2. E15.5におけるDach1 mRNAの発現

ShRNA-Dach1を導入した群では、Dach1 mRNAの発現が抑制されていた(右図矢頭)。

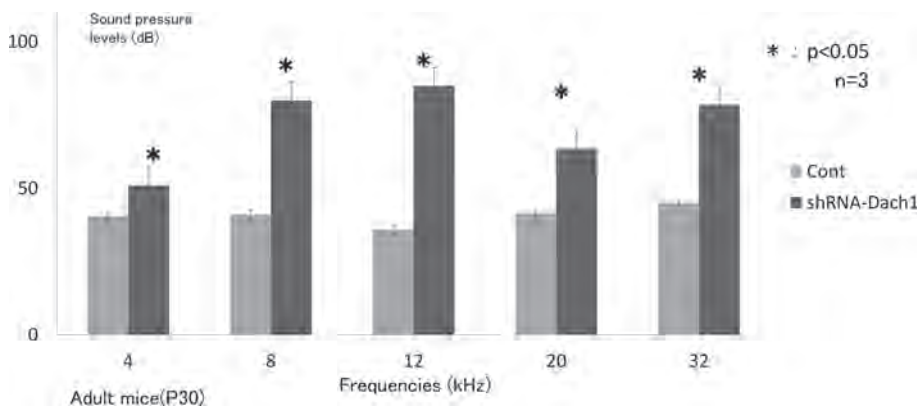


図3. ABR

shRNA-Dach1を導入した群では、すべての周波数で聴力閾値が上昇していた。

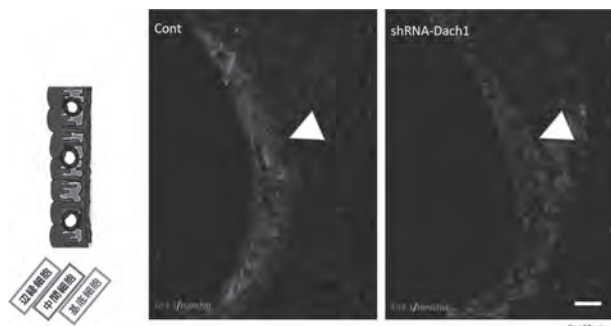


図4. 中間細胞の発現確認

shRNA-Dach1を導入した群では、血管条の中間細胞においてKir4.1の発現が抑制されていた(矢頭)。

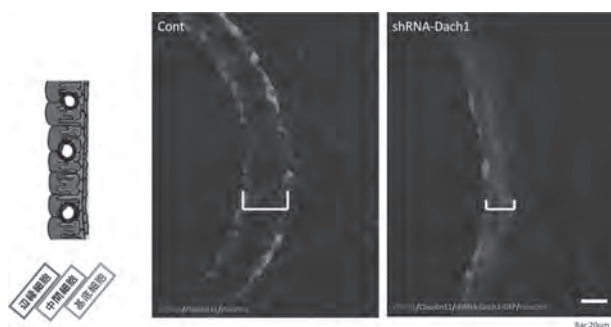


図5. 辺縁細胞、基底細胞の発現確認

shRNA-Dach1を導入した群では、辺縁細胞においてKNCQ1の発現を、基底細胞においてClaudin11の発現を認め、コントロール群と同様の結果であった。しかしながら、血管条の菲薄化を認めた(白括弧)。

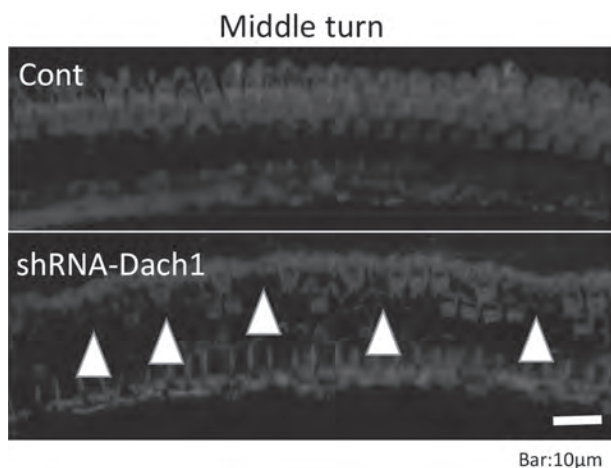


図6. 有毛細胞の確認

shRNA-Dach1を導入した群では、外有毛細胞の脱落を認めた(矢頭)。

考察

Dach1は内耳の形成に重要な役割を果たす遺伝子であることが推測されるが、Dach1欠失マウスが致死的であるため¹⁰⁾、これまでほとんど検討されてこなかった。今回我々は、正常Dach1遺伝子が胎生期内耳において発現する前の

E11.5に、RNAiのカセットを内包した遺伝子を、Electroporation法を用いて導入すること^{3),4)}で、内耳特異的にDach1の発現を抑制したモデルマウスを作製した。内耳特異的Dach1発現抑制モデル成熟マウスでは、Dach1の発現が抑制されることにより、難聴を呈し、外有毛細胞の減少を認めた。また、組織学的検討より、内耳特異的Dach1発現抑制モデル成熟マウスでは中間細胞(Kir4.1)の形成不全より血管条の菲薄化を呈していた。血管条は蝸牛電位の形成に必要であり、蝸牛電位は正常な聴覚に必須である。蝸牛電位は血管条の上皮-間葉系細胞ネットワークの働きによりKイオン交換が行われることで形成される¹¹⁾。このKイオンの流入により有毛細胞の脱分極が生じ、電気信号に変換された音が聴神経を通り聴こえを知覚する。これまでの報告より、中間細胞を形成する遺伝子の欠失により、蝸牛電位が低下し難聴を呈することが知られている¹²⁾。

まとめ

今回我々は、胎生期内耳へDach1を標的とするshRNAプラスミドを導入し、内耳特異的にDach1発現を抑制することに成功し、Dach1の機能解析を行った。Dach1は胎生期に蝸牛上皮外側壁に発現し、この発現が抑制されることで血管条の3層のうち中間細胞層が形成されず血管条形成不全が起こり、難聴が発症したものと考えられる。

- 1) Miwa, T, Minoda, R, Ise, M, et al.: Mouse otocyst transuterine gene transfer restores hearing in mice with connexin 30 deletion-associated hearing loss. *Mol. Ther.* 21: 1142-1150 2013.
- 2) Minoda, R, Miwa, T, Ise, M, et al.: Potential treatments for genetic hearing loss in humans: Current conundrums. *Gene Ther.* 22: 2015.
- 3) Brigande, J V., Gubbels, SP, Woessner, DW, et al.: Electroporation-Mediated Gene Transfer to the Developing Mouse Inner Ear. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 493: 125-139 2009.

- 4) Gubbels, SP, Woessner, DW, Mitchell, JC, et al.: Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455: 537-541 2008.
- 5) Miwa, T, Minoda, R, Kaitsuka, T, et al.: Protein transduction into the mouse otocyst using arginine-rich cell-penetrating peptides. *Neuroreport* 22: 2011.
- 6) Miwa, T, Takeda, H, Minoda, R: Developmental research of the gene therapy which is targeted embryonic inner ear for congenital inner ear disease. *Equilib. Res.* 76: 712-719 2017.
- 7) Davis, RJ, Shen, W, Sandler, YI, et al.: Dach1 mutant mice bear no gross abnormalities in eye, limb, and brain development and exhibit postnatal lethality. *Mol. Cell. Biol.* 21: 1484-90 2001.
- 8) Mardon, G, Solomon, NM, Rubin, GM: dachshund encodes a nuclear protein required for normal eye and leg development in *Drosophila*. *Development* 120: 3473-86 1994.
- 9) Okamoto, N, Nishimori, Y, Nishimura, T: Conserved role for the Dachshund protein with *Drosophila* Pax6 homolog Eyeless in insulin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109: 2406-2411 2012.
- 10) Ayres, JA, Shum, L, Akarsu, AN, et al.: DACH: genomic characterization, evaluation as a candidate for postaxial polydactyly type A2, and developmental expression pattern of the mouse homologue. *Genomics* 77: 18-26 2001.
- 11) Kikuchi, K, Hilding, DA: The development of the stria vascularis in the mouse. *Acta Otolaryngol.* 62: 277-91
- 12) Shibata, S, Miwa, T, Wu, H-H, et al.: Hepatocyte growth factor-c-MET signaling mediates the development of nonsensory structures of the Mammalian Cochlea and hearing. *J. Neurosci.* 36: 2016.

Ndufs4 欠損マウスにおける 顎下腺・副腎の形態異常とステロイド合成障害

小林祐太^{1) 2)}、本藏陽平¹⁾、阿部高明³⁾、大和田祐二²⁾、香取幸夫¹⁾

1) 東北大学 耳鼻咽喉・頭頸部外科学教室

2) 東北大学大学院医学系研究科 器官解剖学分野

3) 東北大学 医工学研究科 分子病態医工学分野

はじめに

細胞内で用いられる生化学エネルギーの主体は ATP であり、その大部分を産生するのはミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系である。ミトコンドリア異常が様々な症状を呈することは想像に容易く、例えば耳鼻咽喉科的なものに限っても、ミトコンドリア遺伝子変異 m1555A>G に伴うアミノグリコシドへの内耳易受傷性や、加齢性難聴の背景となる酸化ストレスなどは広く知られるところである。

ミトコンドリア異常による疾患の代表はミトコンドリア病 (MELAS、MERRF、CPEO、Leigh 脳症など) である。日常診療において時折遭遇するが、その重症度や罹患臓器は多種多様であり、その根本的治療に関しては全く確立されておらず、ミトコンドリア生理やその病態への関与の解明が急がれる。

電子伝達系は複数のミトコンドリア複合体 (mitochondrial complex I ~ V) により構成されており、*NDUFS4* は complex I に含まれる accessory subunit である。これを欠損したマウスは、代表的なミトコンドリア病である Leigh 脳症の病態モデルとして知られる¹⁾²⁾。他方、唾液腺は組織学的に腺房、介在部導管、線条部導管、導出部導管から構成され、線条部導管の基底部細胞膜陥入に集積するミトコンドリアは、能動的な物質輸送に重要な役割を担っている。また、げっ歯類顎下腺は特徴的で、雄のみ、アンドロゲン依存

性に線条部導管に好酸性顆粒を貯留した特殊な導管系 (GCT, Granular Convolute Duct) へ変化することも既知である。今回我々は、*NDUFS4* 欠損マウスの顎下腺、副腎の組織学的評価を行い、電子伝達系がステロイド合成へ関与していることを示唆する所見を得たので報告する。

方法

マウスは (全身性) *Ndufs4* ノックアウトの雄を用いた。7 週齢まで飼育し、顎下腺、精巣、副腎を採取して組織学的評価 (Hematoxylin Eosin 染色、免疫組織学的手法、Oil-Red O 染色) を行った。同時に血液を採取し、血漿アンドロゲン濃度測定を行った。くわえて、マウス TM3 細胞株 (精巣 Leydig 細胞株、非腫瘍性) に対して免疫細胞染色、Western Blot を用いた *NDUFS4* 発現評価を行った。

結果

Ndufs4 ノックアウト雄マウスにおいて、顎下腺で GCT の著明な発達不良を認めた。この背景として、精巣には明らかな形態異常は認められなかったものの、血漿アンドロゲン濃度は明らかな低値傾向を示した。TM3 細胞株において免疫細胞染色、Western Blot によるタンパクレベルでの *NDUFS4* の発現が確認された。

くわえて *Ndufs4* ノックアウト雄マウスにおいて、副腎皮質束状層でも形態学的異常を認めた。

Oil-Red O 染色の結果、精巣間質および副腎皮質において脂肪滴の減少～枯渇をきたしていることが示唆された。

考察

これまでに *Ndufs4* ノックアウトによる研究では、脳部位特異的 (嗅球、脳幹、小脳) なミトコンドリア機能低下や神経変性³⁾、肥大型心筋症に伴う心機能低下⁴⁾、網膜神経節細胞の細胞死⁵⁾などが報告されているが、我々が渉猟しえた限りでは、唾液腺、精巣、副腎いずれについても、*Ndufs4* に着目した先行研究は認められない。重要なことはこれら先行研究から、complex I において *NDUFS4* はあくまで accessory subunit の位置づけであり、必ずしも最終的に細胞内代謝プロファイルを著しく障害するとは限らず、またその発現そのものも組織ごとに大きく異なることが想定される点である。さらに近年では、ミトコンドリア複合体同士がさらに supercomplex をつくことで構造が安定化し活性酸素の発生抑制にもなることが示されており⁶⁾、すなわち subunit 単体の欠損であってもその病態メカニズムは非常に複雑であると考えられる。

我々の研究では、まず *Ndufs4* 欠損マウスにおいて顎下腺 GCT が著しい発達不良を生じていた。なお GCT は本来、雄でのみ発達する特殊な導管系であり、雌の顎下腺では野生型 - ノックアウト間に形態学的な差を認めていない (No Fig.)。これは、顎下腺に直接 *NDUFS4* 欠損が与える影響より、アンドロゲン欠乏など二次的な要因のインパクトの方が大きいことを示唆していた。実際に血漿アンドロゲン濃度はノックアウトマウスで低値となっており、しかしそれは精巣間質 Leydig 細胞の変性脱落が原因ではないことから、*NDUFS4* 欠損は主にアンドロゲン合成分泌に作用していると考えられる。精巣間質 Leydig 細胞に由来する細胞株 TM3 において、やはり *NDUFS4* 発現が確認されたため、今後はこの細胞を用いた薬剂的 complex I 阻害実験系や *Ndufs4* ノックダウン実験系を構築し、実際に *NDUFS4* がアンドロゲン合成分泌能へどう作用するかを検討したいと考えている。

また今回、副腎皮質では *NDUFS4* 発現を確認す

ることができなかった (NCBI database > Gene > Transcriptome data によれば、マウス副腎では *NDUFS4* 発現量が相対的に少ない) が、精巣間質と共通して脂肪滴の減少傾向が認められた。アンドロゲンに限らずステロイドホルモン全般はコレステロールを最初の基質とし、ミトコンドリアに局在する CYP11A1 (律速段階でもある) を含む種々の酵素によって合成が進む。Oil-Red O はコレステロールに特異的な染色法ではないものの、ここまでの所見はステロイド合成基質の欠乏を示唆している。それは *NDUFS4* ノックアウトがステロイド合成プロファイルに何らかの異常をきたした結果なのか、全身性にコレステロールが欠乏した結果なのか、あるいは致死的な *Ndufs4* ノックアウトマウスではその全身状態不良やストレスによりステロイド分泌そのものが亢進することが予想されるため「分泌過多」による枯渇なのか、といった様々な仮説を立て、現在検討中である。

- 1) Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, Kapur RP, Schenkman KA, Palmiter RD. Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab.* 2008 Apr;7(4):312-20.
- 2) Breuer ME, Willems PH, Smeitink JA, Koopman WJ, Nooteboom M. Cellular and animal models for mitochondrial complex I deficiency: a focus on the *NDUFS4* subunit. *IUBMB Life.* 2013 Mar;65(3):202-8.
- 3) Kayser EB, Sedensky MM, Morgan PG. Region-Specific Defects of Respiratory Capacities in the *Ndufs4*(KO) Mouse Brain. *PLoS One.* 2016 Jan 29;11(1)
- 4) Chouchani ET, Methner C, Buonincontri G, Hu CH, Logan A, Sawiak SJ, Murphy MP, Krieg T. Complex I deficiency due to selective loss of *Ndufs4* in the mouse heart results in severe hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS One.* 2014 Apr 4;9(4)
- 5) Yu AK, Song L, Murray KD, van der List D, Sun C, Shen Y, Xia Z, Cortopassi GA. Mitochondrial complex I deficiency leads

to inflammation and retinal ganglion cell death in the *Ndufs4* mouse. Hum Mol Genet. 2015 May 15;24(10):2848-60

- 6) Genova ML, Lenaz G. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. Send to Biochim Biophys Acta. 2014 Apr;1837(4):427-43.

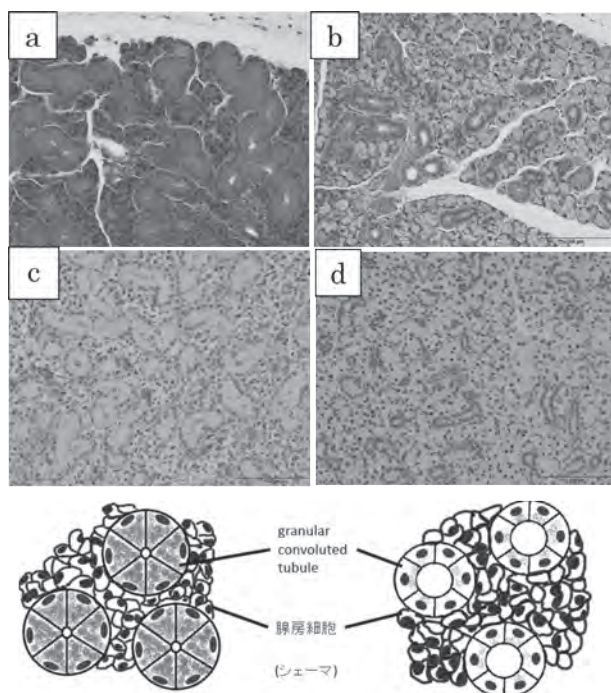


Fig.1
Ndufs4-KO ♂マウスでは顎下腺におけるGCT発達不良を認めた(a: WT, b: KO)。
*NDUFS4*は導管系で強い発現を認めた(c: WT, d: KO)。
下段にはこの現象をシェーマで示した。

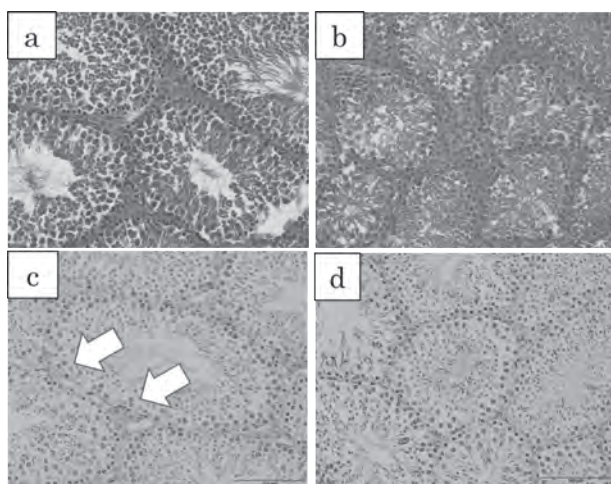


Fig.2
Ndufs4-KO ♂マウスでは精巣での形態異常は認めなかった(a: WT, b: KO)。
*NDUFS4*は精巣間質にて発現を認めた(c: WT, d: KO, 矢印は精巣間質に認められた染色)。精巣間質はアンドロゲン産生を担うLeydig細胞が主に存在する領域である。

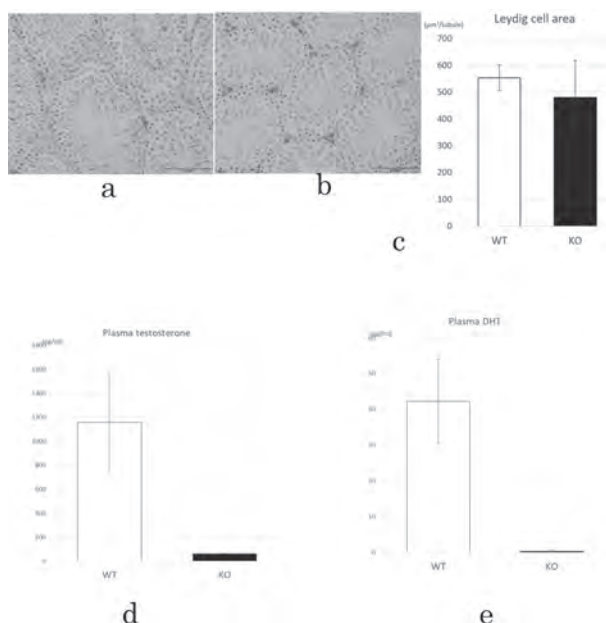


Fig.3
HSD-3βを用いた免疫組織学的手法において、*Ndufs4*-KO ♂マウスでも精巣Leydig細胞の量的変化は認めなかった(a: WT, b: KO, c: Image Jによる染色面積を対象とした画像定量、Average ± SEM, $p=0.7793$, Welch's t-test)。
しかし血漿アンドロゲン濃度は著明に低下していた(d: テストステロン, e: ジヒドロテストステロン, いずれもpg/ml, Average ± SEM, Welch's t-test においてそれぞれ $p=0.2557$, $p=0.1783$)。n制限やデータの個体間ばらつきが大きく統計学的有意差には至らず。

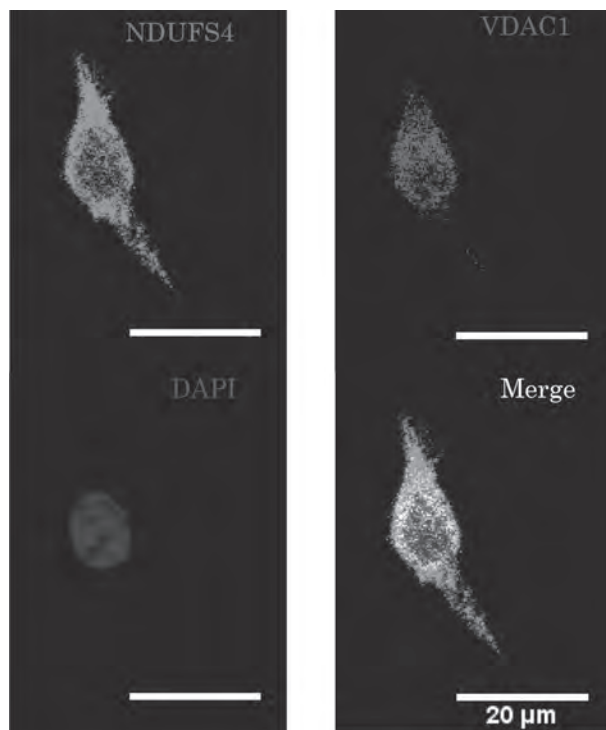


Fig.4
免疫細胞染色においてTM3細胞株(精巣Leydig細胞株、非腫瘍性)での*NDUFS4*発現が確認された。
VDAC1: ミトコンドリアマーカーとなる電位依存性陰イオンチャネル

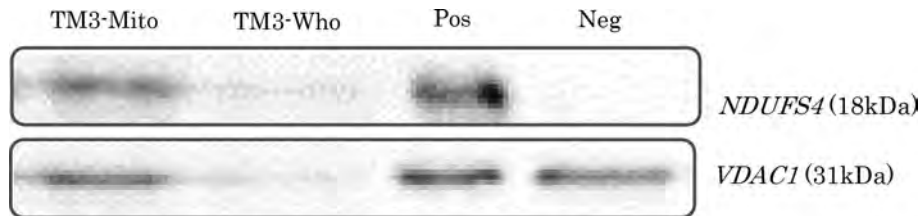


Fig.5

Western BlotにおいてTM3 細胞株(mouse Leydig cell-line, non-tumorigenic)での*NDUF54* 発現が確認された。検出はミトコンドリア濃縮を行うことで可能となった。

TM3-Mito : TM3濃縮ミトコンドリア

TM3-Who : TM3 whole cell protein

Pos : Positive controlとしてWT心臓ミトコンドリア

Neg : Negative controlとしてKO心臓ミトコンドリア

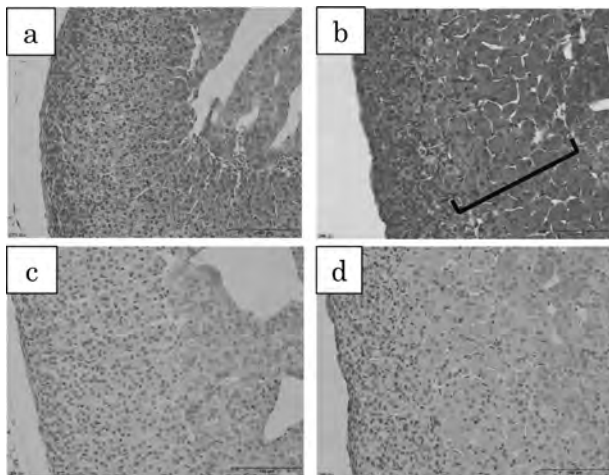


Fig.6

Ndufs4-KO ♂マウスでは副腎皮質束状層の形態異常を認めた (a:WT, b:KO, ブラケットは異常を認めた束状層を示す)。しかし免疫組織学的手法ではNDUF54発現を確認できなかった (c:WT, d:KOに差を認めず)。

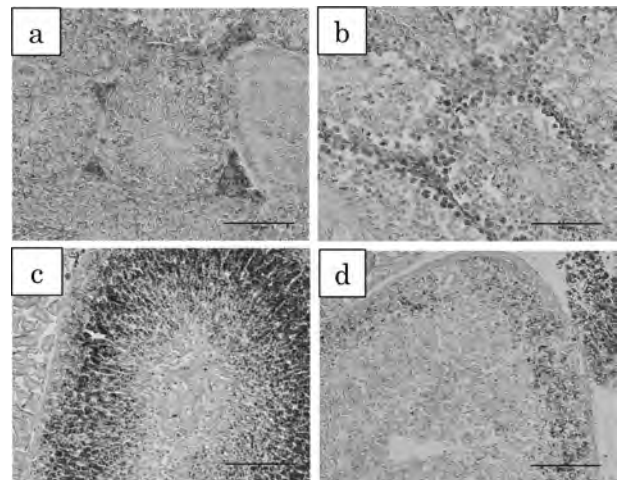


Fig.7

Oil-Red O染色において、精巣間質、副腎皮質ともに、*Ndufs4-KO* ♂マウスで脂肪滴の減少傾向を認めた(a:WT精巣, b:KO精巣, c:WT副腎, d:KO副腎)。この変化は副腎皮質で顕著であった。

日常のにおいアンケート、VAS、カード式嗅覚検査、 基準嗅力検査の結果と相互関係

岡崎 健、都築建三、橋本健吾、阪上雅史

兵庫医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

はじめに

現在日本で保険適応のある嗅覚検査は、5種類の臭素で構成されており嗅素の検知域値と認知域値を評価する検査である T&T オルファクトメーターを用いた基準嗅力検査と、静脈に臭素を注射し、潜時と持続時間を測定する静脈性嗅覚検査であり標準的な検査とされている。また、マイクロカプセル化したにおいが印刷された12種類のカードを用いて行うカード型嗅覚検査の Open Essence (OE、富士フイルム和光純薬株式会社)¹⁻⁴⁾、生活に即したにおい項目20種に対して自答する日常のにおいアンケート (Self-administered Odor Questionnaire, SAOQ)⁵⁾、Visual Analogue Scale (VAS) の有用性も報告されている。しかし、各々の検査の有用性は報告されているものの、それぞれの相互関係については詳しく検討されていない。本報告では、嗅覚障害患者における各質問票・嗅覚検査の結果の特徴と相互関係を明らかにすることを目的とした。

対象と方法

2010年2月から2018年3月の8年2か月間で、当院の嗅覚専門外来を受診した3281例の中で、基準嗅力検査、OE、SAOQを施行できた924例(男性412例、女性512例、平均年齢56.2 ± 17.0歳)を対象とした。まず、924例の疾患内訳を検索した。本検討での疾患内訳は鼻副鼻腔手術、嗅覚専門外来担当医によって診断された。すべての症例における基準嗅力検査、OE、SAOQの平均値、各項目の比較を行った。各結果の相関性はスピアマン相関係数を用いて検討を行った。また、OEの異常

点数のカットオフ値を設定するために、2004年の日本鼻科学会嗅覚検査検討委員会案に準じて、基準嗅力検査結果の平均認知域値が1.2以上を異常と判断し、ROC曲線を作成した。

集計データは、StatFlex[®] Ver.6 (アーテック(株)、大阪、日本)を使用して統計学的解析を行った。結果は、平均値で示して、 $p < 0.05$ であるときに統計学的有意差ありと判定した。

本研究は、兵庫医科大学倫理審査委員会(承認番号1512)に基づいて行った。

結果

疾患の内訳は、鼻副鼻腔炎400例(43.3%)、感冒後234例(25.3%)、外傷50例(5.4%)、頭蓋内疾患(パーキンソン病、認知症など)14例(1.5%)、先天性13例(1.4%)、その他(心因性、鼻副鼻腔腫瘍、全身疾患など)43例(4.7%)、原因不明170例(18.4%)であった。

基準嗅力検査における各項目別の認知域値の平均は、A (β -phenylethyl alcohol、バラのにおい) 4.90、B (Methyl cyclopentanone、焦げたにおい、カラメルのにおい) 4.06、C (Isovaleric acid、腐敗臭、汗、古靴下のにおい) 3.77、D (γ -undecalactone、桃の缶詰、甘くて重いにおい) 4.77、E (Skatol、糞臭、口臭、いやなにおい) 4.31であった(図1)。OEの結果で、正答率が高かったにおいの種類は、「カレー」51.1%、「メントール」46.3%、「蒸れた靴下・汗臭」40.5%で、正答率が低かったにおいは、「炒めたニンニク」16.1%、「バラ」22.7%であった(図2)。

SAOQで、点数が高かったにおいの種類(平均点)



図1. 基準嗅力検査

C (Isovaleric acid、腐敗臭、汗、古靴下において) 3.77が最も域値が低く、A (β-phenylethyl alcohol、バラにおいて) 4.90が最も域値が高かった。

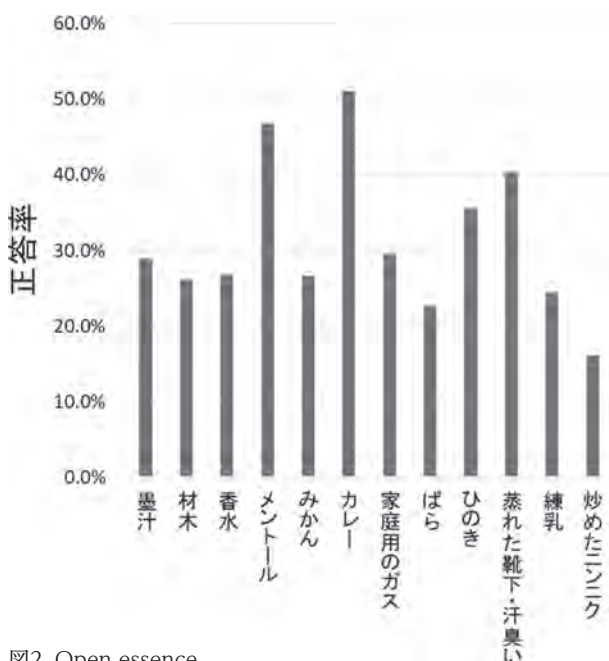


図2. Open essence

正答率が高かったにの種類の、「カレー」51.1%、「メントール」46.3%、「蒸れた靴下・汗臭い」40.5%で、正答率が低かったにおいては、「炒めたニンニク」16.1%、「バラ」22.7%であった。

は、香水 (0.91)、カレー (0.89)、炒めたニンニク (0.83)、低かったのは、バター (0.51)、海苔 (0.55) であった (図3)。

重症度別項目比較において、各項目比率について比較した (図4)。高度から脱失の嗅覚障害では、OEでは、メントール、カレー、SAOQでは香水、カレー、コーヒーの比率が高かった。基準嗅力検査とOEにおいて、高度嗅覚障害と脱失の臭い別の比率を比較すると Isovaleric acid と蒸れた靴下・汗の臭いの低下に特に差が見られた。

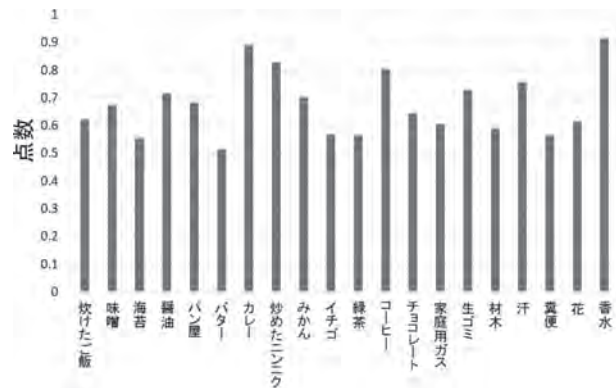


図3. 日常のにおいアンケート

点数が高かったにの種類の、香水 (0.91)、カレー (0.89)、炒めたニンニク (0.83)、低かったのは、バター (0.51)、海苔 (0.55) であった。

VAS と SAOQ ($rs=0.843$, $P<0.001$)、基準嗅力検査の検知域値 ($rs=-0.751$, $P<0.001$)、認知域値 ($rs=-0.721$, $P<0.001$)、OE ($rs=0.718$, $P<0.001$) の結果は相関関係を示した。

基準嗅力検査とOEは、有意な相関 ($rs=-0.822$, $P<0.001$) を示し、ROC 曲線下面積は 0.886 であり、カットオフ値を 7 点にすると感度 0.77、特異度 0.93 であった。

考察

嗅覚検査や嗅覚のアンケートは、各々の検査の有用性は報告されているもののそれぞれの相互関係については詳しく検討されていない。そのため、本報告では、各質問票・嗅覚検査を施行できた嗅覚障害患者 924 例の結果の特徴と相互関係を臨床的に検討した。

基準嗅力検査では、嗅素符号 C (Isovaleric acid: 腐敗臭、古靴下、汗臭) が最も低かった。OE では、「カレー」、「メントール」、「蒸れた靴下・汗臭い」、「ひのき」の順で正答率が高かった。過去の報告²⁾において「メントール」と「カレー」は、刺激性のにおいであり評価が難しいと判断されており、それらを除くと最も正答率が高かったのは蒸れた「靴下・汗臭い」であった。またOEで、「蒸れた靴下・汗臭い」の正答率が高度嗅覚障害より脱失例で低かった。そのことから、Isovaleric acid や「蒸れた靴下・汗臭い」の臭いは脱失の判別に有用となる可能性が示唆された。

VAS は基準嗅力検査、OE、SAOQ と OE は

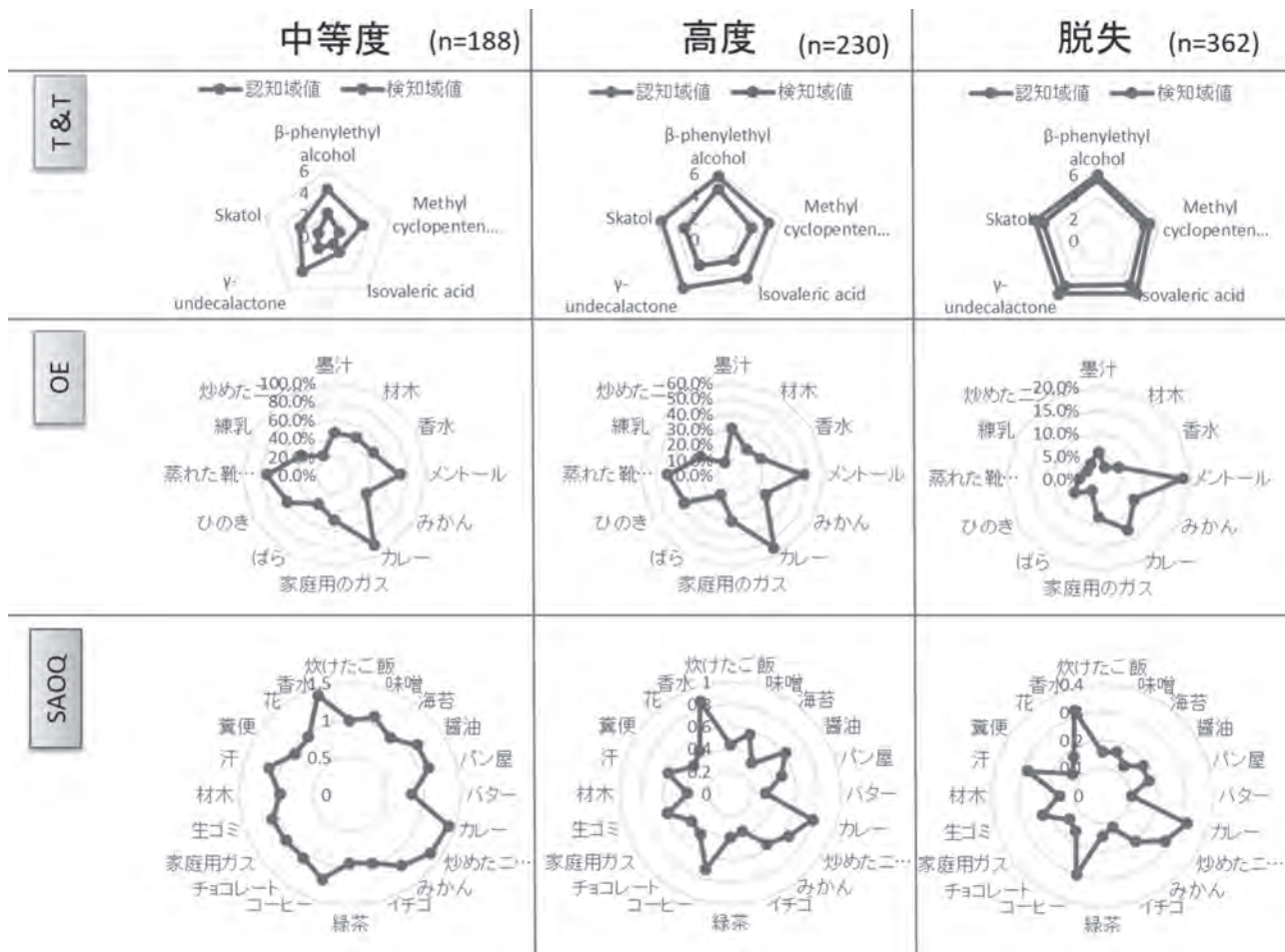


図4. 重症度別比較

高度から脱失の嗅覚障害において、OEでは、「メントール」、「カレー」、SAOQでは香水、カレー、コーヒーの比率が高かった。基準嗅力検査においては、軽度・中等度において、高度・脱失と比較しIsovaleric acid、Skatolの域値の比率が他の臭素とくらべ低い印象であった。

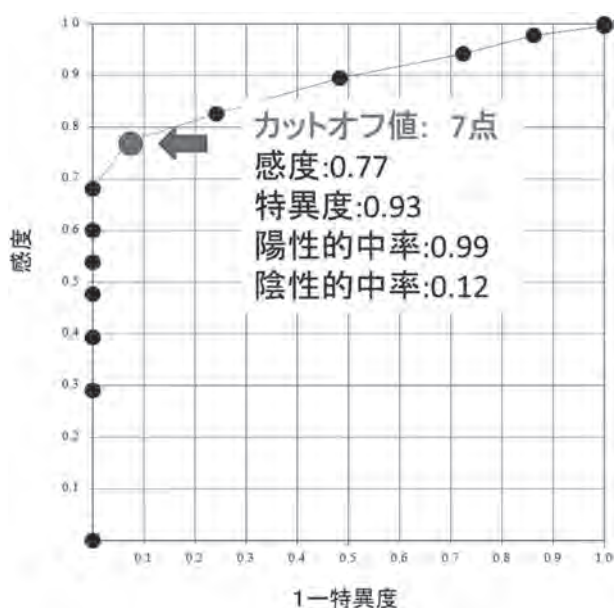


図5. 基準嗅力検査 (1.2以上) とOEによるROC曲線
ROC曲線下面積は0.886。カットオフ値を7点にすると感度0.77、特異度0.93。

基準嗅力検査と有意な相関を認めた。しかし、SAOQでは炒めたニンニクのおいし点が高いにもかかわらず、OEではニンニクの臭いの正答率が低い結果となった。検査はそれぞれの特徴を持っており総合的に評価することが必要であると考えた。

OEの異常値をT & T オルファクトメーター検査の異常値と比較しROC曲線を描いたところ7点以下がカットオフ値として有用でないかと考えた。このことは、スクリーニングにおいて8点以上は正常と判断するべきであるという過去の報告と同様であった³⁾。また、OEを用いて「メントール」、「みかん」、「練乳」3嗅素の組み合わせが加齢性嗅覚機能低下のスクリーニングに有用であるとの報告⁴⁾もあり、絞り込むことによりさらに有用な検査となる可能性がある。今後さらに疾患別特徴や年齢別の特徴などを検討していきたい。

まとめ

本検討は、基準嗅力検査、OE、SAOQ が施行できた 924 例を対象として、各検査の特徴や相関関係を検討した。基準嗅力検査と OE は、相関関係を示し同様の特徴を示したが、SAOQ は一部異なる結果となった。Isovareric acid や「蒸れた靴下・汗臭い」の臭いは脱失の判別に有用となる可能性が示唆された。OE のカットオフ値は、7 点が適当と考えた。さらに、各嗅覚検査、アンケートを検討することにより検査と嗅覚障害の関係をしたい。

謝辞

本研究は、JSPS 科研費 25462671、16K11220、2015 年（都築）2016 年（橋本）兵庫医科大学教員研究費助成の助成を受けたものである。

参考文献

1) 森 恵莉, 他: カード型嗅覚同定能検査と基準嗅

力検査および静脈性嗅覚検査の比較検討, 日耳鼻, 114: 917-923, 2011

2) Fumino Okutani, et al: Evaluation of “Open Essence” odor-identification test card by application to healthy volunteers, ANL, 40: 76-80, 2013.

3) Fujio H, et al: Evaluation of card-type odor identification test for Japanese patients with olfactory disturbance. Ann Otol Rhinol Laryngol, 121:413-418, 2012.

4) 藤尾 久美, 他: オープンエッセンスによる嗅覚加齢性変化のスクリーニング, 日耳鼻, 121: 38-43, 2018.

5) Takebayashi H, et al: Clinical availability of a self-administered odor questionnaire for patients with olfactory disorders. Auris Nasus Larynx. 38:65-72, 2011.

鼻呼気凝集液の臨床的意義

血清 Nerve growth factor (NGF) と 長期スギ舌下免疫療法の効果

山田武千代、登米 慧、椎名和弘、斎藤秀和

秋田大学大学院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

はじめに

バイオマーカー (Biomarker) は、「通常の生物学的過程、病理学的過程、もしくは治療的介入に対する薬理学的応答の指標として、客観的に測定され評価される特性」と定義づけられ、疾病の存在や進行度をその濃度に反映し、血液中に測定される物質を指す用語である。抗原特異的免疫療法では、 T_H2 細胞、 T_H1 細胞、制御性 T (Treg) 細胞の増殖、IgG4 阻止抗体、好塩基球の変化などが報告されている。国民病といわれるスギ花粉症¹⁾ に対しては保険診療として舌下免疫療法が行われている。今回はスギ花粉症の長期舌下免疫療法とバイオマーカーについて検討した。スギ花粉大量飛散シーズンでは飛散ピーク時における症状薬物スコアは舌下免疫療法 1 年目群に比べ 3 ~ 5 年目群が有意に低いことから、飛散ピーク時の 1 年目と 4 年目で血清分子を検討した。

方法

スギ特異的舌下免疫療法を長期施行した 20 例を対象とした。毎年スギ花粉の飛散前、飛散ピーク時に採血、血清をマイナス 80 度で冷凍保存した。血清中の分子は ELISA 及びビーズマルチプルアッセイで測定した (IL-17A: R&D Systems, Minneapolis, MN; C3a, C5a: BD Biosciences, San Jose, CA; NGF, HGF, IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ : Multiplex Assays, Millipore, Billerica, MA)。鼻アレルギー診療ガイドラインに従い²⁾、飛散ピーク時の症状薬物スコアを観察し、Wilcoxon's signed-rank test、Spearman's correlation coefficient by rank で統計処理を行った。

結果

血清 IL-4、血清 IL-17A 濃度は 4 年目で、1 年目と比較して有意に減少し、血清 NGF 濃度は 4 年目で、1 年目と比較して有意に増加した (図 1)。

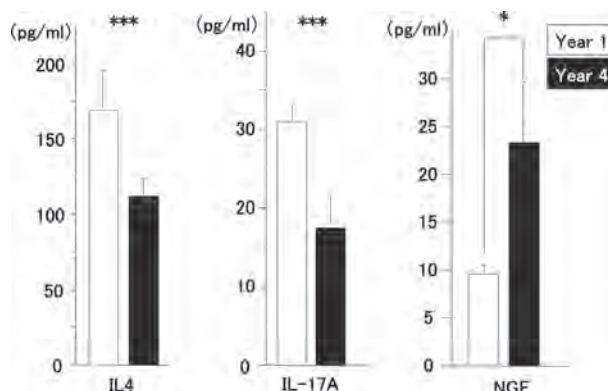


図1. 長期舌下免疫療法における血清分子変動
(*** $p < 0.005$, * $p < 0.05$)

舌下免疫療法 4 年目の血清 NGF 濃度は舌下免疫療法 4 年目の症状薬物スコアと有意な相関が認められた ($\gamma = 0.563$, $p = 0.014$)。血清 NGF 濃度で患者を、NGF 高値グループ H ($n=5$) と NGF 低値グループ L ($n=15$) に分けると、グループ H の症状薬物スコアがグループ L よりも 4 年目に有意に高かった (図 2)。

その他、血清 C3a、C5a レベルは、4 年目で治療前及び 1 年目と比較して有意に減少した ($p < 0.0005$) ($p < 0.001$)。血清 IL-5、IL-13、IFN- γ レベルは 4 年目で、1 年目と比較して有意な変化は認めなかった。舌下免疫療法 4 年目の血清 IL-17A レベルは舌下免疫療法 4 年目の症状薬物スコアと有意な相関が認められた ($g = 0.57$, $p < 0.01$)。

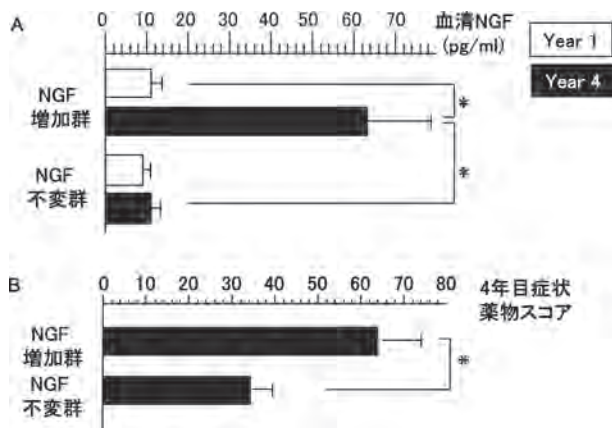


図2. 長期SLITにおける血清NGF変化による分類 (A) と4年目の症状スコア (B) (* $p < 0.05$)

考察

スギ花粉症に対する舌下免疫療法4年目で(1年目と比較して)血清NGFは有意に増加し、舌下免疫療法4年目の血清NGF濃度は舌下免疫療法4年目の症状薬物スコアと有意な相関が認められた。今回、スギ花粉症においてNGFとの関係を初めて示した。アレルギー性鼻炎患者の上皮および粘膜下組織において、NGFは好酸球、肥満細胞で主に発現し、上皮粘液細胞および粘膜下組織腺細胞に存在しているおり³⁾、アレルギー性鼻炎患者に鼻腔に抗原を誘発させると鼻腔洗浄液中のNGFが増加する⁴⁾。気道アレルギーとしての研究では、気管支喘息マウスモデルにおいて肺胞洗浄液のNGF発現陽性細胞数は喘息群において顕著に高く、抗NGF抗体処置によりコラーゲン沈着などの気道リモデリングを減少させている⁵⁾。抗NGF抗体はRhoA発現を低下させ、気道炎症と気道過敏性を抑制する⁶⁾。

減少が認められたのは、スギ花粉症に対する舌下免疫療法4年目で(1年目と比較して)有意な減少が認められたのは、血清IL-4、IL-17A、C3a、C5aであった。気道アレルギーの感作において、補体の活性化が起こり、C3a、C5aの産生が増強されることが知られており⁷⁾、補体はIL-17A産生を誘導する⁸⁾。感作で誘導されるC3a、C5aが、免疫療法で抑制されることは興味深い。T_H1、T_H2、T_H17パラダイムが論じられているが、サイトカイン発現、GATA3、STAT6、retinoic acid-related orphan receptor γ t、STAT3、CCR6の分子から、IL-4/IL-17陽性細胞の存在が認めら

れている⁹⁻¹⁰⁾。肥満細胞はアレルギー反応で重要な働きをしているが、NGFを産生し放出し神経免疫相互作用および組織炎症に関与する。NGFは肥満細胞の強力な脱顆粒因子であり分化および成熟を促進しIL-3との補因子としても作用するが、B細胞およびT細胞、好中球および好酸球においても作用を有する¹¹⁾。長期舌下免疫療法群の治療抵抗群ではNGFが高くアレルギー反応を悪化させている可能性がある。

参考文献

- 1) Yamada T, Saito H, Fujieda S. Present state of Japanese cedar pollinosis: the national affliction. *J Allergy Clin Immunol.* 133, 632-9, 2014.
- 2) Okubo K, Kurono Y, Fujieda S, Ogino S, et al. Japanese Society of Allergology. Japanese guideline for allergic rhinitis. *Allergol Int.* 60, 171-89, 2011.
- 3) Bresciani M, Lalibertè F, Lalibertè MF, Gramiccioni C, et al. Nerve growth factor localization in the nasal mucosa of patients with persistent allergic rhinitis. *Allergy.* 64, 112-7, 2009.
- 4) Sanico AM, Stanis AM, Gleeson TD, Bora S, et al. Nerve growth factor expression and release in allergic inflammatory disease of the upper airways. *Am J Respir Crit Care Med.* 161, 1631-5, 2000.
- 5) Huang LW, Sun G, Wang DL, Kong LF. Inhibition of nerve growth factor/tyrosine kinase receptor A signaling ameliorates airway remodeling in chronic allergic airway inflammation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 19, 2261-8, 2015.
- 6) Chen J, Kou L, Kong L. Anti-nerve growth factor antibody improves airway hyperresponsiveness by down-regulating RhoA. *J. Asthma.* 2018 [Epub ahead of print] doi: 10.1080/02770903.2017.1396467.
- 7) Zhang X, Köhl J: A complex role for

- complement in allergic asthma. *Expert Rev Clin Immunol.* 6, 269-277, 2010.
- 8) Lajoie S, Lewkowich IP, Suzuki Y, Clark JR, et al. Complement-mediated regulation of the IL-17A axis is a central genetic determinant of the severity of experimental allergic asthma. *Nat Immunol.* 11, 928-35, 2010.
- 9) Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4-positive T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol.* 125, 222-30, 2010.
- 10) Irvin C, Zafar I, Good J, Rollins D, et al. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage characterizes a population of patients with severe asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 134, 1175-86, 2014.
- 11) Kritas SK, Caraffa A, Antinolfi P, Saggini A, et al. Nerve growth factor interactions with mast cells. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 27,15-9,2014.

抗 HMGB1 抗体を用いた局所炎症制御による 外傷性嗅覚障害後の嗅覚機能回復促進

小林正佳、玉利健悟、Mohammed Omar Al Salihi、西田幸平、竹内万彦

三重大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科

目的

嗅神経系は本来高い再生能力を有している。しかし実際の臨床において、外傷性嗅覚障害例の予後は悪く、嗅覚改善率は約 30% である¹⁾。われわれはこれまでに外傷性嗅覚障害モデルマウスを用いて、嗅神経切断後の神経再生が局所炎症の程度に依存すること、炎症急性期にステロイド薬や抗インターロイキン-6 受容体 (IL-6R) 抗体、Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 阻害薬を用いた抗炎症治療を施行すれば、マクロファージなどの炎症細胞浸潤とグリア瘢痕形成を抑制し、嗅神経再生が促進され、嗅覚回復が良好になることを報告した²⁻⁴⁾。細胞核内タンパク質である High mobility group box 1 (HMGB1) も細胞損傷により細胞外へ放出されると炎症性メディエーターとなることが知られており、これを阻害することで頭部外傷後の嗅覚回復が良好になる可能性が考えられる。よって本研究はこの確認をするために施行した。

方法

遺伝子組み換えマウスである OMP (olfactory marker protein)-tau-lacZ マウス⁵⁾を用いて、外傷性嗅覚障害モデル動物を作製した。固くて組織傷害度が強いステンレス製のカッターを用いて、左側の嗅神経を切断した。右側の嗅神経はコントロールとして温存した。その直後に抗 HMGB1 抗体 (少量: 25 μ g/body、多量: 50 μ g/body) を腹腔内注射した。コントロール群には IgG (50 μ g/body) を投与した。この後 5、14、42、100

日目にマウスを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した。2 週間の脱灰処理後、頭部の凍結連続切片 (水平断) を作製し、X-Gal 染色を施行して嗅神経を青色に発色させた。その標本を顕微鏡下 CCD カメラで撮影し、画像撮影画像解析ソフト Image J (NIH, USA) で炎症組織量を測定した。嗅神経の再生は以下の計算式で評価した。

$$\text{神経再生率 (\%)} = \frac{\frac{\text{神経切断側 (左側) の青色呈示長の合計}}{\text{神経切断側 (左側) の糸球体層の周囲長}}}{\frac{\text{コントロール側 (右側) の青色呈示長の合計}}{\text{コントロール側 (右側) の糸球体層の周囲長}}}$$

Glial fibrillary acidic protein (GFAP) と CD68 に対する免疫染色で、嗅球の活性化星状膠細胞とマクロファージを確認した。それぞれ炎症組織内の 5 カ所で単位面積あたりの細胞数を計測し、その平均値を算出した。

統計処理は二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行った。3 群間の差の検定は post hoc test に Bonferroni method を用いて行い、 $p < 0.0167$ で有意差ありとみなした。

結果

抗 HMGB1 抗体投与群は、コントロール IgG 投与群と比較して、炎症組織、活性化星状膠細胞、組織球浸潤が抗 HMGB1 抗体の投与量に依存して少なくなり、またより多くの嗅神経が再生していた (図 1、2)。

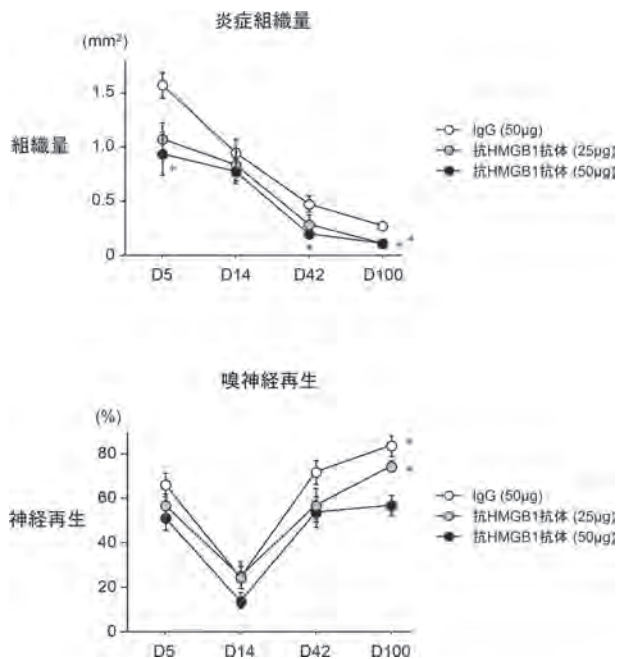


図1

嗅神経切断直後抗HMGB1抗体投与後の炎症組織量と嗅神経再生率の変化。*印は抗HMGB1抗体投与群とコントロールIgG群との間で、 $p < 0.0167$ で有意差あり。各点 $n = 6$

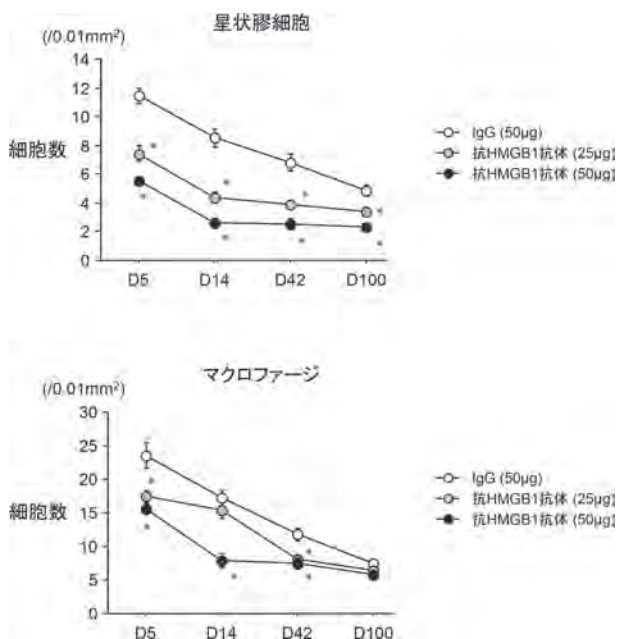


図2

嗅神経切断直後抗HMGB1抗体投与後の活性化星状膠細胞数とマクロファージ数の変化。*印は抗HMGB1抗体投与群とコントロールIgG群との間で、 $p < 0.0167$ で有意差あり。各点 $n = 6$

考察

今回の研究結果から、外傷後に HMGB1 を抑制すれば、傷害された嗅神経の再生が促進することが明らかとなった。過去のわれわれの研究で、外傷性嗅覚傷害の予後改善を図るために、外傷急性

期にステロイド薬を投与することを報告した。しかし、日本神経外傷学会が定めている頭部外傷の管理、治療ガイドラインにおいて、急性期のステロイド薬投与は、外傷治療における有効性のエビデンスが低いことと副作用に対する懸念から、脊髓損傷例を除いて推奨されていない。そこでステロイドにかわる抗炎症薬として、炎症性サイトカインのひとつである IL-6 や TNF- α の受容体抗体、阻害薬の有効性を検討した。これは慢性関節リウマチなどの難治性炎症の新しい治療薬としてすでに臨床実用化されているので、もし将来嗅覚障害診療への応用を考えたとき、比較的早期に使用可能になるであろうと考えたからである。これらの薬物もステロイドと同様に有効性を示したが、一方で過剰な免疫能抑制により、重症感染症を引き起こすという副作用の懸念もある。これらの薬物と比較して、今回の研究に用いた抗 HMGB1 抗体は、これまでに副作用を生じたという報告がないのが大きな長所である。

現在の救急医療現場で、頭部外傷の急性期に嗅覚障害の有無と予後まで考慮に入れた治療をしている施設はかなり少ない。本研究結果は、外傷性嗅覚障害の予後成績向上のためには、慢性期の治療法開発とともに受傷急性期に対処して外傷性嗅覚障害の発症率を下げるように取り組むのも効果的な手段であることを示唆している。今回の研究結果をもとに、抗 HMGB1 抗体の実地医療への応用を進めることで、今後の外傷性嗅覚障害の予後成績向上が図れるのではないかと考える。

文献

- 1) Costanzo RM, DiNardo LJ and Reiter ER: Head injury and olfaction. *In* Handbook of Olfaction and Gustation (Doty RL ed), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 629-638 (2003)
- 2) Kobayashi M and Costanzo RM: Olfactory nerve recovery following mild and severe injury and the efficacy of dexamethasone treatment. *Chem Senses* 34, 573-580 (2009)
- 3) Kobayashi M, Tamari K, Miyamura T and

- Takeuchi K: Blockade of interleukin-6 receptor suppresses inflammatory reaction and facilitates functional recovery following olfactory system injury. *Neurosci Res* 76, 125-132 (2013)
- 4) Al Salihi MO, Kobayashi M, Tamari K, Miyamura T, Takeuchi K. Tumor necrosis factor- α antagonist suppresses local inflammatory reaction and facilitates olfactory nerve recovery following injury. *Auris Nasus Larynx* 44, 70-78 (2017).
- 5) Mombaerts P, Wang F, Dulac C, Chao SK, Nemes A, Mendelsohn M, Edmondson J and Axel R: Visualizing an olfactory sensory map. *Cell* 87, 675-686 (1996)

Acetylcholine-induced ciliary beat of the human nasal mucosa is regulated by the pannexin-1 channel and purinergic P2X receptor

Do Ba Hung¹⁾²⁾、大淵豊明¹⁾、若杉哲郎¹⁾、小泉弘樹¹⁾、横山 満³⁾、鈴木秀明¹⁾

1) 産業医科大学医学部 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

2) ハノイ医科大学 耳鼻咽喉科

3) 産業医科大学 共同利用研究センター

はじめに

気道上皮粘膜にみられる線毛輸送機能は、塵埃や細菌などの異物を排除するのに重要な役割を果たしている。調和のとれた線毛運動は粘膜表面の恒常性を保つのに必須であり、線毛運動の低下や乱れはさまざまな気道疾患と関連している。線毛運動の制御には、 Ca^{2+} 、ATP、acetylcholine (Ach)、NOなどが関与することが以前から知られている。しかしその制御機構の詳細は、ヒトにおいては未だよく解明されていない。

われわれはこれまでにヒト鼻粘膜を使った *ex vivo* の実験により、Ach 刺激によりヒト鼻粘膜から ATP が放出されることを報告した¹⁾。今回われわれは Ach による線毛運動の刺激作用の経路が、この ATP 放出の制御経路ときわめて類似した関係にあることを見出したので報告する。

対象と方法

肥厚性鼻炎患者から全麻下に下鼻甲介粘膜を切除し、下鼻道側粘膜を下鼻甲介骨から分離した後、酸素を飽和溶解させた Hank's balanced salt solution に浸した。この粘膜から幅 1 mm、長さ 5 ~ 6 mm の帯状の粘膜片を切り出し、位相差顕微鏡に接続した高速度ビデオカメラ (HAS-U1 (DITECT 社)) で線毛運動を記録した。そして種々の薬剤を負荷し、線毛運動速度 (ciliary beat

frequency (CBF)) の変化を測定した。

結果

無刺激の状態での CBF は 6 ~ 10 Hz であった。Ach (100 μM)、ATP (100 μM) はこの CBF を有意に増加させた。この線毛運動促進作用は溶液中から Ca^{2+} を除去することにより完全に抑制され、また、atropine sulfate (muscarinic receptor antagonist)、2-aminoethoxydiphenyl borate (IP_3 receptor antagonist)、carbenoxolone (pannexin-1 blocker)、probenecid (pannexin-1 blocker)、pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonic acid (P2X receptor antagonist)、flufenamic acid (connexin channel blocker) によっても有意に抑制された。一方、bafilomycin A1 (vesicular transport inhibitor) はこの線毛運動促進作用には影響を与えなかった。

考察

今回の実験でヒト鼻粘膜上皮の線毛運動が、前回われわれが見出した ATP 放出とほぼ相同なメカニズムで制御されていることが分かった。今回得られた結果から、Ach 刺激による線毛運動制御の細胞内シグナル伝達経路について、図 1 に示すような仮説が立てられる²⁾。まず Ach が

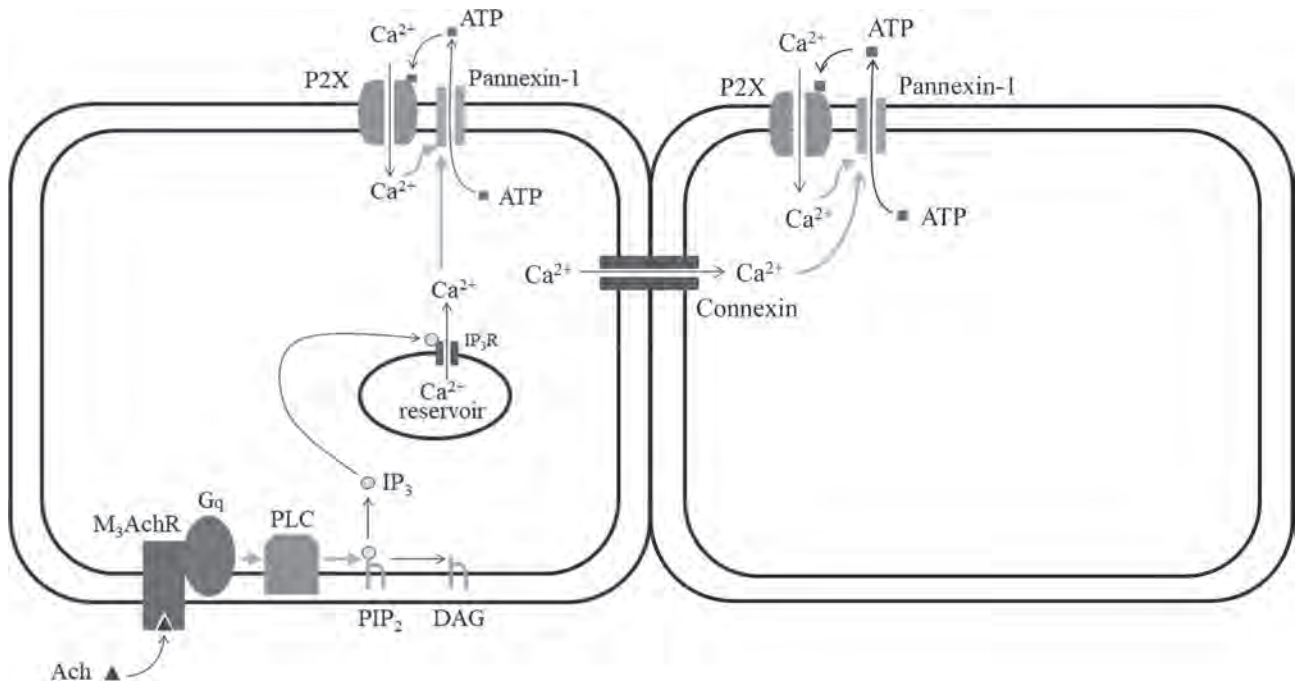


図1. ACh 刺激による線毛運動制御のシグナル伝達経路（文献2）より引用）

muscarinic receptor に結合する。鼻粘膜に存在する muscarinic receptor は主に M_3 であることが知られている³⁾⁴⁾。 M_3 は G_q 蛋白と共役しているので phospholipase C が活性化され、 IP_3 と diacyl glycerol が生成する。 IP_3 は細胞内 Ca^{2+} reservoir 表面に存在する IP_3 receptor に結合し、 Ca^{2+} を放出させる。これによって膜電位の脱分極が起こると pannexin channel が開く。鼻粘膜に存在する pannexin はタイプ1 (pannexin-1) であり⁵⁾⁶⁾、これを通して ATP が細胞外へ放出される。この ATP 放出反応には vesicular transport は関与していないと考えられる。ヒト鼻粘膜において pannexin-1 は P2X プリン受容体の7種のサブタイプのうち P2X7 と共発現しており⁶⁾、放出された ATP は P2X7 に結合する。活性化された P2X7 を通して細胞外 Ca^{2+} が細胞内に流入し、これによって pannexin-1 が再び活性化される。このような反応経路によって autocrine による feedback 機構が形成されていることが推定される。こうした細胞内 Ca^{2+} の上昇は connexin channel を通して隣接する細胞へ伝搬されると考えられる。

気道上皮の線毛運動に関してはこれまでも培養細胞や実験動物を使つての研究がなされている。今回の研究では、手術時に採取した鼻粘膜を *ex vivo* の環境で観察してその反応を測定しており、

ヒトの *in vivo* における現象をかなり忠実に反映しているものと考えられるため、ひじょうに重要な知見である。

結論

ACh はヒト鼻粘膜上皮の線毛運動を亢進させ、この反応には pannexin-1 channel と P2X receptor が関与することが示された。Pannexin-1 channel から放出された ATP は P2X receptor を刺激し、次に P2X receptor を通して流入する Ca^{2+} は pannexin-1 channel を刺激すると考えられる。すなわち、このシステムが周期的な細胞内 Ca^{2+} の上昇を引き起こす振動子として機能している可能性が示唆される。将来、この制御機構を標的とした気道疾患の新しい治療戦略が考えられる。現在、細胞内 Ca^{2+} 上昇の下流の経路についてさらに検討中である。

参考文献

- 1) Koizumi H, Ikezaki S, Ohbuchi T, Do BH, Hohchi N, Kawaguchi R, Kitamura T, Suzuki H: Acetylcholine-induced *ex vivo* ATP release from the human nasal mucosa. *Auris Nasus Larynx* 44: 422-427, 2017.
- 2) Do BH, Ohbuchi T, Wakasugi T, Koizumi H, Yokoyama M, Hohchi N, Suzuki H:

- Acetylcholine-induced ciliary beat of the human nasal mucosa is regulated by the pannexin-1 channel and purinergic P2X receptor. *Am J Rhinol Allergy* 32: 217-227, 2018.
- 3) Nakaya M, Yuasa T, Usui N. Immunohistochemical localization of subtypes of muscarinic receptors in human inferior turbinate mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2002; 111: 593-597.
- 4) Nakaya M, Kondo K, Kaga K. Immunohistochemical study of m1-m5 muscarinic receptors and nNOS in human inferior turbinate mucosa. *Acta Otolaryngol* 2007; 127: 103-107.
- 5) Ohbuchi T, Hohchi N, Ohkubo J, Hashida K, Koizumi H, Wakasugi T, Takenaga F, Suzuki H: Identification of pannexins in rat nasal mucosa. *Allergy Rhinol* 4: e63-e65, 2013.
- 6) Ohbuchi T, Takenaga F, Hohchi N, Wakasugi T, Ueta Y, Suzuki H: Possible contribution of pannexin-1 to ATP release in human upper airway epithelia. *Physiol Rep* 2: e00227, 2014.

Neural inflammation by nAChR expressed eosinophil in the eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) with asthma

Dan Van Bui¹⁾, Akira Kanda^{1,2)}, Yoshiki Kobayashi^{1,2)}, Yasutaka Yun¹⁾,
Kensuke Suzuki¹⁾, Shunsuke Sawada¹⁾, Hiroshi Iwai¹⁾

1) Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, Kansai Medical University

2) Allergy Center, Kansai Medical University

Introduction

Eosinophilic chronic rhinosinusitis (ECRS) is a refractory disease, and closely related to bronchial asthma. Interestingly, endoscopic sinus surgery not only improves asthma symptoms, but also reduces the dosage of anti-inflammatory drugs^[1]. Although the interaction from upper to lower airway has not been known, cholinergic nerve system such as nasal-bronchial reflex (NBR) contributes to regulate this interaction. However, the underlying mechanism that upper airway signaling via this pathway modulates chronic lower airway inflammation is unclear. In this study, to investigate nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) signaling-induced neural inflammation by acetylcholine released from cholinergic nerve, we examined $\alpha 4/\alpha 7$ nAChR mRNA level in airway allergic inflammation mouse model and expression of these receptors in the eosinophil, a key player in allergic airway inflammation.

Methods

1. OVA-induced total eosinophilic airway

inflammation, allergic rhinitis with asthma

Mice were injected 50 μ g OVA with 1mg of aluminum hydroxide by intraperitoneal (i.p.) on day 0 and day 14. From day 21-25, mice were intranasal (i.n.) challenge with 1% OVA. Nasal and lung tissues were harvested 24h after the last challenge (day 26).

2. qPCR

RNA from nasal and lung tissues were isolated using a RNA isolation kit (Macherey Nagel), and then reversely transcribed with PrimeScript RT reagent kit (Takara). qPCR were performed using SYBR Green reagents (Qiagen) with RotorGene system. Gene amplification was normalized to GAPDH and gene expression level quantified as fold difference.

3. Flow cytometry

To measure the expression of $\alpha 4/\alpha 7$ nAChR on eosinophils from IL-5 transgenic spleen, cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies (CD19, CD90.2, SiglecF, CD45) and rabbit anti-mouse $\alpha 4/\alpha 7$ nAChR in 4 °C for 30min. Then, cells were stained with goat anti-rabbit conjugated with Alexa 488. For intracellular staining, cells were

fixed and permeabilized by using Cytofix/Cytoperm kit (BD), and were incubated with anti- $\alpha 4$ / $\alpha 7$ nAChR antibodies in 4° C for 30 min. Stained cells were measured by FACS CantoII (BD Biosciences), and data were analyzed by FlowJo software v 7.1 (Tree Star, Inc).

Results

1. Increasing of $\alpha 4$ nAChRs mRNA expression in nasal and lung tissue from allergic rhinitis with asthma model

To investigate the gene expression of nAChRs in the inflamed site of this allergic mouse model, qPCR were performed in nasal and lung tissues. OVA-induced eosinophilic airway tissues mice were shown 2 folds increasing expression of $\alpha 4$ nAChR mRNA in comparison with naïve group.

2. Splenic eosinophils expressed both $\alpha 4$ and $\alpha 7$ nAChRs

For flowcytometric analysis, we found that splenic eosinophils from IL-5 transgenic mice expressed $\alpha 4$ nAChRs in both surface and intracellular staining. By contrast, $\alpha 7$ nAChRs barely expressed.

Discussion

We found that increasing of $\alpha 4$ - but not $\alpha 7$ nAChRs gene expression in nasal and lung tissues from eosinophilic airway inflammation model. Similarly, these receptors were expressed in the eosinophil. Recently, the involvement of nAChRs in Th2 immune response diseases has been reported. Lauriane Galle-Treger reported that pre-treatment with $\alpha 7$ nAChRs agonists attenuates ILC-2-dependent airway hyperreactivity^[2]. By contrast, $\alpha 4$ nAChRs agonists promote

Th2 immune response^[3]. Our data suggests that signaling through $\alpha 4$ nAChRs expressed on eosinophils accelerate chronic airway inflammation, while $\alpha 7$ nAChRs attenuate this inflammation (Fig.1). Thus, this study might be an important milestone for a new

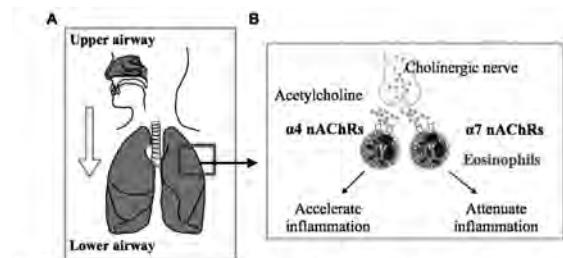


Fig.1 nAChRs signalling on eosinophils modulate chronic airway inflammation hypothesis

strategy targeted on anti-cholinergic drug to airway inflammation.

Figure legend

(A) The interaction from upper to lower airway inflammation (B) Modulation of airway inflammation through neural inflammation induced by nAChRs expressed in the eosinophil.

References

1. Ehnhage, A., et al., *One year after endoscopic sinus surgery in polyposis: asthma, olfaction, and quality-of-life outcomes*. Otolaryngol Head Neck Surg, 2012. 146(5): p. 834-41.
2. Galle-Treger, L., et al., *Nicotinic acetylcholine receptor agonist attenuates ILC2-dependent airway hyperreactivity*. Nat Commun, 2016. 7: p. 13202.
3. Nordman, J.C., et al., *The alpha4 nicotinic receptor promotes CD4+ T-cell proliferation and a helper T-cell immune response*. Mol Pharmacol, 2014. 85(1): p. 50-61.

ダイレクトリプログラミングによる蝸牛神経の再生

西村幸司¹⁾、野田哲平²⁾、大森孝一¹⁾

1) 京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科

2) 浜の町病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科

はじめに

哺乳類の一次聴覚ニューロンであるラセン神経節細胞は、音情報を内耳から脳幹の蝸牛神経核に伝達する神経細胞である。ラセン神経節細胞は一度変性すると、自発的に再生することなく、恒久的な感音難聴をきたす^{1,2)}。補聴器や人工内耳はラセン神経細胞の音響あるいは電気刺激が必要な聴覚デバイスであるが、ラセン神経細胞が高度に変性した場合、これらのデバイスの効果は期待できない。ラセン神経節細胞の変性を原因とする感音難聴治療戦略の一つとして、遺伝子治療が挙げられる。従来のラセン神経節細胞をターゲットとした遺伝子治療の報告は、BDNF³⁾、NT-3⁴⁾、human nerve growth factor⁵⁾などの神経栄養因子を用いたものであった。これらの報告は、生存している神経細胞の保護効果と神経突起の蝸牛有毛細胞への伸張を目的としており、いちど失われた神経細胞の再生を目指しているわけではない。

我々は、ダイレクトリプログラミングによるラセン神経節細胞の再生を目指している。ダイレクトリプログラミングは、未分化細胞を介さずに、人為的にある種の分化した細胞を別の種類の細胞に分化転換させることである。我々は、以前に神経分化転換のパイオニア転写因子である Ascl1 の導入によりマウス蝸牛非感覚上皮細胞から神経細胞へのダイレクトリプログラミングを報告した⁶⁾。今回、我々がターゲットとした細胞はラセン神経節内の非神経細胞である。ラセン神経節内の非神経細胞は主にシュワン細胞、間葉系細胞から構成される⁷⁾。シュワン細胞はラセン神経節細胞を栄養し保護する役割も果たすために、ダイレクトリプログラミングされたシュワン細胞由来の神経細胞

の生存にもシュワン細胞の一部が必要である。シュワン細胞は豊富に存在し、ラセン神経の変性後も生存し増殖することが知られているために⁸⁾、ダイレクトリプログラミングによりシュワン細胞が枯渇する懸念は小さいと考えられる。

Ascl1 は神経細胞への分化転換のパイオニア転写因子であるが、一般に可塑性の低い生後の細胞に対しても Ascl1 単独で神経細胞にリプログラミングすることができる^{6,9)}。中脳アストロサイトやマウス胎生線維芽細胞から Ascl1 により誘導された神経細胞は主にグルタミン作動性神経であった⁹⁾。ラセン神経節細胞は蝸牛神経核細胞を刺激するグルタミン酸作動性神経である^{10,11)} から、グルタミン酸作動性神経細胞の作製が聴覚回路の再生には必要と考えられる。さらに、転写因子 NeuroD1 はラセン神経節細胞の発生に必要¹²⁻¹⁵⁾ であり、かつ胎生の蝸牛非感覚上皮からの神経誘導に十分¹⁶⁾ とされているが、われわれは Ascl1 と NeuroD1 の共発現がよりラセン神経節に近似した神経の誘導できると仮説を立てた。内因性のラセン神経節細胞、ラセン神経節非神経細胞、リプログラミングされた神経細胞の3者を比較してトランスクリプトーム解析を行ったので報告する。

方法

1. 動物

Mapt 遺伝子を EGFP で置換し、神経細胞で EGFP を発現する Tau-EGFP ノックインマウス¹⁷⁾ (Jackson Laboratories) を用いた。ホモ結合型の Tau-EGFP マウスは行動異常や長期増強の欠失が報告されている¹⁸⁾ ために、実験にはヘテロ接合型の Tau-EGFP マウスを用いた。また、野生型のマ

ウスとして CD-1 マウス (Charles River) を用いた。

2. 生直後のラセン神経節の採取

生後 1 日齢の Tau-EGFP マウスからラセン神経節を摘出した。内耳骨胞を摘出後、蝸牛骨胞を実体顕微鏡下に外して、膜迷路を露出させた¹⁹⁾ のち、蝸牛軸から慎重にラセン神経節を分離させた。20-24 個のラセン神経節を氷上の 100 μ l HBSS に回収した。Oshima らの報告¹⁹⁾ に従って組織を単細胞化した。

3. フローサイトメトリー

Tau-EGFP 陰性分画はラセン神経節非神経細胞 (Spiral ganglion non-neuronal cell: 以下 SGNNC) として培養後、神経誘導転写因子あるいはコントロールベクターをトランスフェクトした。6-10 日の培養後、誘導神経細胞 (Induced neuron: 以下 iN) を Tau-EGFP 陽性かつ DsRed 陽性の細胞分画から回収した。最後に、Tau-EGFP 陽性内因性ラセン神経節細胞を (Primary auditory neuron: 以下 PAN) を回収し、SGNNC と iN とトランスクリプトプロファイルを比較した。

4. プラスミド DNA

バイシストロン性のプラスミドベクター pIRES2 DsRed-Express2 (Clontech) を用いた。マルチクローニング領域に *Ascl1*, *NeuroD1* のコーディング領域を挿入した。作成したベクター *pCMV-Ascl1-DsRed2*, *pCMV-NeuroD1-DsRed2* を便宜的に以下 *Ascl1-DsRed*, *NeuroD1-DsRed* と表記する。

5. トランスフェクションと細胞培養

CD-1 マウスや Tau-EGFP マウス由来の SGNNC を 0.2% グラチンでコートしたガラスボトムディッシュ上で“アストロメディウム”を用いて接着培養させた²⁰⁾。細胞へのトランスフェクションは Lipofectamine LTX (Life Technologies) を以前の報告²⁰⁾ に基づき行った。トランスフェクション後、アストロメディウムで 20 時間インキュベートした後、“分化メディウム”で細胞培養を行った²¹⁾。

6. 神経分化誘導効率の定量

神経マーカーの β II-tubulin²²⁾, microtubule-

associated protein 2 (MAP2)²³⁾ 陽性かつ、細胞体の 3 倍以上の長さの神経突起を有する細胞を iN と定義した。

7. トランスクリプトーム解析 (RNA-seq)

RNA は Single Cell RNA Purification Kit (NORGEN) を用いて抽出した。RNA ライブラリは two-pronged approach を用いて、Illumina 社 HiSeq 2500 で解読した。発現データは transcripts per million reads (TPM) 法²⁴⁾ でノーマライズした。

8. ドロップレットデジタル PCR (ddPCR)

ddPCR²⁵⁾ を用いて RNA-seq のデータの妥当性を検証した。QX200 ddPCR システム (Bio-rad) により、iN, PAN, VC 群それぞれから β III-tubulin, Prph, Sox2, Tnc mRNA 分子を定量化した。

結果

1. ラセン神経節非神経細胞 (SGNNC) は神経細胞にダイレトリプログラミングされうる

Ascl1 をトランスフェクト後 8 日間培養した SGNNC の免疫細胞化学を図 1 に示す。汎神経マーカーの β II-tubulin に対する抗体 TuJ1 陽性の神経突起を有する iN の一部は、PAN に特異的に発現する Map2 (図 1 A)、グルタミン作動性神経マーカー Vglut1 (図 1 B), I 型ラセン神経節細胞に発現する Prox1 (図 1 C) を発現した。図 1 D は縦軸に TuJ1 陽性の神経突起を有する細胞の誘導効率を示し、横軸に導入遺伝子の種類 (コントロール、NeuroD1 のみ, *Ascl1* のみ, NeuroD1 と *Ascl1* 両方) を示した。*Ascl1* は有意に高効率に神経を誘導した ($F(1,20) = 59.03$ $p < 0.0001$) (図 1 D)。Map2 についても同様の結果であった (図 1 E)。

2. RNA-seq およびドロップレットデジタル PCR (ddPCR) を用いたトランスクリプトーム解析

図 2 に実験のデザインを示す。コントロールベクターを導入した SGNNC (vector control: 以下 VC), *Ascl1* と NeuroD1 の導入により作製された iN, 内因性のラセン神経節細胞 PAN の 3 者を RNA-seq および ddPCR により比較した。図 3A はピアソンの相関係数を示し、各群内のばらつき

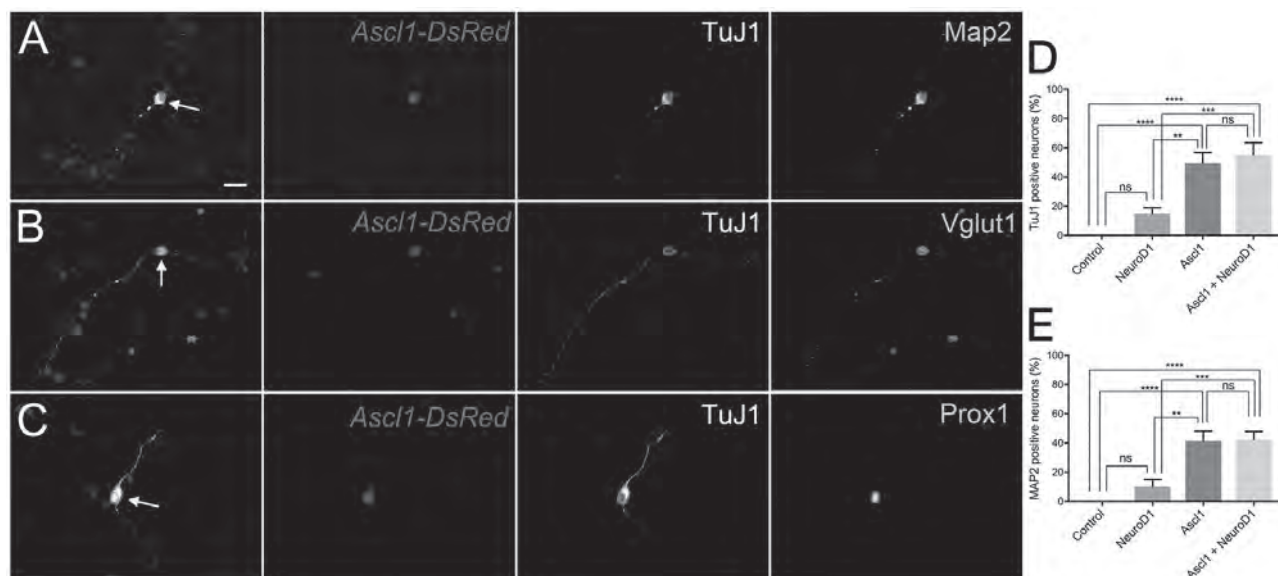


図 1. SGNNC から PAN へのダイレクトリプログラミング

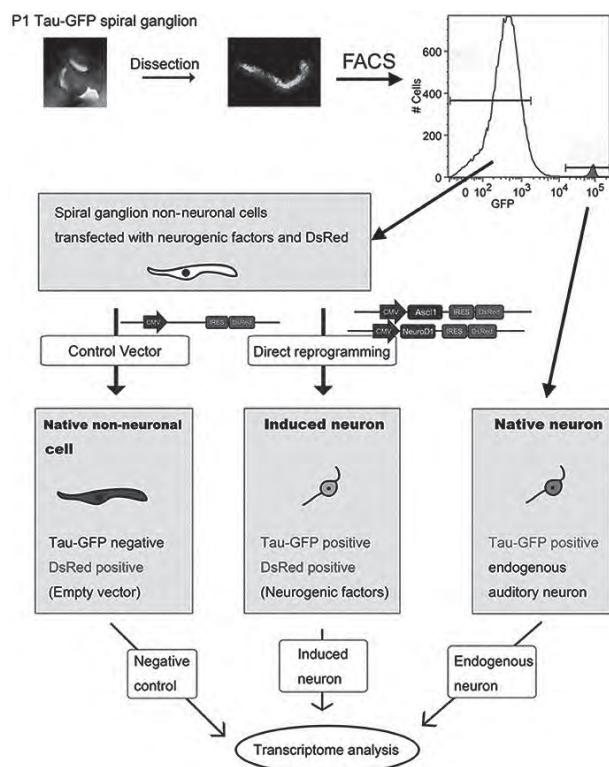


図 2. 実験のデザイン

が小さいことを示す。図 3B は主成分分析の結果を示し、群内のばらつきが小さいが、各群間は異なる遺伝子発現プロファイルを示すことを表している。RNA-seq (図 3C) の妥当性を検証するために ddPCR (図 3D) で代表的な遺伝子 (神経細胞は β III-tubulin, Prph、シュワン細胞は Sox2、線維芽細胞は Tnc) を用いて TPM と ddPCR の発

現量を各群で検討した。TMP と ddPCR は良い相関を示しており、PAN はいずれの方法にても β III-tubulin, Prph を高く発現し、VC はいずれの方法にても Sox2, Tnc を高く発現した。SGNNC はシュワン細胞と線維芽細胞が混在したヘテロな細胞集団であることが示唆された。iN は以上検討した 4 つの遺伝子について PAN と VC の中間の発現量を示した。図 3E は恣意的に、神経に豊富に発現する遺伝子 (Neuronal, Synaptic, Ion Channel)、ラセン神経節に豊富に発現する転写因子 (transcription factors)、細胞骨格の再構成に重要な役割を果たす遺伝子、グリア細胞に豊富に発現する遺伝子 (Oligodendro, Schwann)、線維芽細胞に発現する遺伝子 (Mesenchymal)、有糸分裂に関する遺伝子 (Mitosis) をピックアップして、各群のヒートマップを作成している。iN は PAN の特徴を有する一方で、起源細胞 SGNNC の遺伝子発現パターンを維持していた。図 3F は unsupervised hierarchical clustering の結果を示す。群内のばらつきは小さいが、群間の相違が比較的大きいことが視覚的に示されている。

考察

本研究は、ラセン神経節に存在する非神経細胞から神経様の細胞をダイレクトリプログラミングできることを示した初めての研究である。Ascl1 は

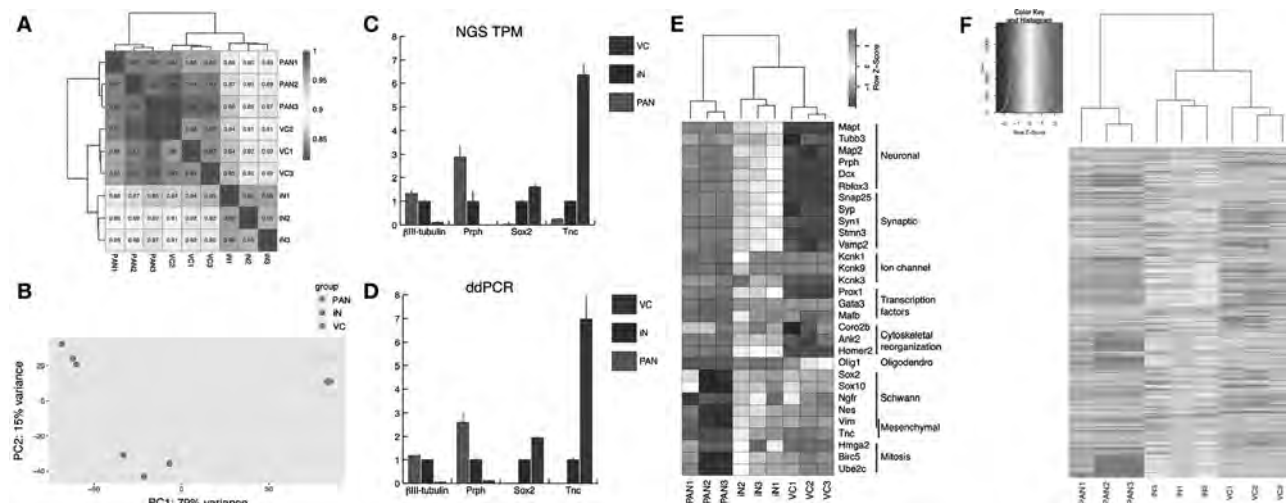


図 3. トランスクリプトーム解析

注：図 1 – 4 は Noda et al. Front Cell Dev Biol. 2018 Feb 14;6:16 を改変した

種々の細胞腫から機能的な神経細胞を誘導できることが報告されている^{6,9,26)}。NeuroD1 はラセン神経節細胞の発生と分化に関わる最も重要な転写因子¹²⁻¹⁵⁾であり、加えて我々は以前に、Ascl1 に NeuroD1 を追加すると蝸牛非感覚上皮からより成熟した神経細胞を誘導できることを示した⁶⁾。これらの経緯でわれわれは今回、ダイレトリプログラミングに用いる転写因子セットとして、Ascl1 と NeuroD1 を用いた。NeuroD1 単独のトランスフェクションも試したが、神経分化誘導効率は低かった。NeuroD1 自体の神経分化誘導能は低く、蝸牛神経から誘導された幹細胞²⁷⁾や活性の高いグリア細胞に対しては神経分化を誘導する一方で、Ascl1 はより広い種々の細胞^{9,28)}に対して神経分化誘導能を有する可能性がある。iN はソースとなる細胞種に依存して神経のサブタイプが決定されるとされている^{29,30)}。同じ微小環境に存在する細胞は同じ化学的シグナルやストレスに発生期に暴露されることで特異的な神経サブタイプに誘導されるのかもしれない。

我々が SGNNC から作製した一部の iN は内因性の PAN に酷似した性質を有した。これらの iN は PAN と同じ双極性ニューロンでありかつ PAN 特異的タンパクを発現した。しかしながらトランスクリプトーム解析によると iN には起源細胞である SGNNC の特徴が残存していた。これは、本研究において、リプログラミングのために培養した

期間は 1 週間と他の報告より比較的短かった故、リプログラミングが不完全であった可能性がある。加えて、起源細胞の中で細胞種特異的なリプログラミング因子があることが想定されている³¹⁾。SGNNC はヘテロな細胞集団から構成されるために各々の細胞集団のリプログラミングの品質に差異が生じるのかもしれない。RNA-seq のデータによると、iN はシュワン細胞あるいは線維芽細胞のトランスクリプトームプロファイルを残していた。このことはシュワン細胞も線維芽細胞も共に神経にリプログラムされる能力 (competence) があることを示している。

特記すべき点として、VC 群は培養しかつコントロールベクターをトランスフェクトされた SGNNC であることが挙げられる。SGNNC in situ と比較して、機械刺激や培養による影響が VC をより iN に近いトランスクリプトームプロファイルに偏倚させた可能性がある。従って、VC 群と SGNNC in situ の遺伝子プロファイルの差の検証が今後の課題として残る。一方で、我々の究極の目的が、ラセン神経節が障害された生体で SGNNC を PAN にリプログラミングさせることであるから、ラセン神経節が障害された微小環境を模しているかもしれない in vitro での SGNNC を用いた実験にはこの点に置いて意義があると考えられる。

謝辞

本研究はトロント大学 Dabdoub 研究室で行われた。

参考文献

- 1 Kujawa, S. G. & Liberman, M. C. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci* 29, 14077-14085, doi:10.1523/JNEUROSCI.2845-09.2009 (2009).
- 2 Sagers, J. E., Landegger, L. D., Worthington, S., Nadol, J. B. & Stankovic, K. M. Human Cochlear Histopathology Reflects Clinical Signatures of Primary Neural Degeneration. *Sci Rep* 7, 4884, doi:10.1038/s41598-017-04899-9 (2017).
- 3 Shibata, S. B. et al. Transgenic BDNF induces nerve fiber regrowth into the auditory epithelium in deaf cochleae. *Exp Neurol* 223, 464-472, doi:10.1016/j.expneurol.2010.01.011 (2010).
- 4 Suzuki, J., Corfas, G. & Liberman, M. C. Round-window delivery of neurotrophin 3 regenerates cochlear synapses after acoustic overexposure. *Sci Rep* 6, 24907, doi:10.1038/srep24907 (2016).
- 5 Wu, J., Liu, B., Fan, J., Zhu, Q. & Wu, J. Study of protective effect on rat cochlear spiral ganglion after blast exposure by adenovirus-mediated human beta-nerve growth factor gene. *Am J Otolaryngol* 32, 8-12, doi:10.1016/j.amjoto.2009.08.012 (2011).
- 6 Nishimura, K., Weichert, R. M., Liu, W., Davis, R. L. & Dabdoub, A. Generation of induced neurons by direct reprogramming in the mammalian cochlea. *Neuroscience* 275C, 125-135, doi:10.1016/j.neuroscience.2014.05.067 (2014).
- 7 Nayagam, B. A., Muniak, M. A. & Ryugo, D. K. The spiral ganglion: connecting the peripheral and central auditory systems. *Hear Res* 278, 2-20, doi:10.1016/j.heares.2011.04.003 (2011).
- 8 Lang, H. et al. Sox2 up-regulation and glial cell proliferation following degeneration of spiral ganglion neurons in the adult mouse inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 12, 151-171, doi:10.1007/s10162-010-0244-1 (2011).
- 9 Chanda, S. et al. Generation of Induced Neuronal Cells by the Single Reprogramming Factor ASCL1. *Stem cell reports* 3, 282-296, doi:10.1016/j.stemcr.2014.05.020 (2014).
- 10 Zhou, J., Nannapaneni, N. & Shore, S. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 are differentially associated with auditory nerve and spinal trigeminal inputs to the cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 500, 777-787, doi:10.1002/cne.21208 (2007).
- 11 Yuan, Y. et al. Ouabain-induced cochlear nerve degeneration: synaptic loss and plasticity in a mouse model of auditory neuropathy. *J Assoc Res Otolaryngol* 15, 31-43, doi:10.1007/s10162-013-0419-7 (2014).
- 12 Ma, Q., Chen, Z., del Barco Barrantes, I., de la Pompa, J. L. & Anderson, D. J. neurogenin1 is essential for the determination of neuronal precursors for proximal cranial sensory ganglia. *Neuron* 20, 469-482 (1998).
- 13 Liu, M. et al. Essential role of BETA2/NeuroD1 in development of the vestibular and auditory systems. *Genes Dev* 14, 2839-2854 (2000).
- 14 Kim, W. Y. et al. NeuroD-null mice are deaf due to a severe loss of the inner ear sensory neurons during development. *Development* 128, 417-426 (2001).
- 15 Evsen, L., Sugahara, S., Uchikawa, M., Kondoh, H. & Wu, D. K. Progression of Neurogenesis in the Inner Ear Requires

- Inhibition of Sox2 Transcription by Neurogenin1 and Neurod1. *Journal of Neuroscience* 33, 3879-3890, doi:10.1523/jneurosci.4030-12.2013 (2013).
- 16 Puligilla, C., Dabdoub, A., Brenowitz, S. D. & Kelley, M. W. Sox2 induces neuronal formation in the developing mammalian cochlea. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 714-722, doi:10.1523/JNEUROSCI.3852-09.2010 (2010).
 - 17 Tucker, K. L., Meyer, M. & Barde, Y. A. Neurotrophins are required for nerve growth during development. *Nat Neurosci* 4, 29-37, doi:10.1038/82868 (2001).
 - 18 Ahmed, T. *et al.* Cognition and hippocampal synaptic plasticity in mice with a homozygous tau deletion. *Neurobiol Aging* 35, 2474-2478, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2014.05.005 (2014).
 - 19 Oshima, K. *et al.* Differential distribution of stem cells in the auditory and vestibular organs of the inner ear. *J Assoc Res Otolaryngol* 8, 18-31, doi:10.1007/s10162-006-0058-3 (2007).
 - 20 Heinrich, C. *et al.* Directing astroglia from the cerebral cortex into subtype specific functional neurons. *PLoS biology* 8, e1000373, doi:10.1371/journal.pbio.1000373 (2010).
 - 21 Oshima, K., Teo, D. T., Senn, P., Starlinger, V. & Heller, S. LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells. *BMC developmental biology* 7, 112, doi:10.1186/1471-213X-7-112 (2007).
 - 22 Caccamo, D. *et al.* Immunohistochemistry of a spontaneous murine ovarian teratoma with neuroepithelial differentiation. Neuron-associated beta-tubulin as a marker for primitive neuroepithelium. *Lab Invest* 60, 390-398 (1989).
 - 23 Hafidi, A., Fellous, A., Ferhat, L., Romand, M. R. & Romand, R. Developmental differentiation of MAP2 expression in the central versus the peripheral and efferent projections of the inner ear. *J Comp Neurol* 323, 423-431, doi:10.1002/cne.903230309 (1992).
 - 24 Wagner, G. P., Kin, K. & Lynch, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. *Theory Biosci* 131, 281-285, doi:10.1007/s12064-012-0162-3 (2012).
 - 25 Hindson, B. J. *et al.* High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Anal Chem* 83, 8604-8610, doi:10.1021/ac202028g (2011).
 - 26 Treutlein, B. *et al.* Dissecting direct reprogramming from fibroblast to neuron using single-cell RNA-seq. *Nature* 534, 391-395, doi:10.1038/nature18323 (2016).
 - 27 Diensthuber, M. *et al.* Spiral ganglion stem cells can be propagated and differentiated into neurons and glia. *BioResearch open access* 3, 88-97, doi:10.1089/biores.2014.0016 (2014).
 - 28 Wapinski, O. L. *et al.* Hierarchical mechanisms for direct reprogramming of fibroblasts to neurons. *Cell* 155, 621-635, doi:10.1016/j.cell.2013.09.028 (2013).
 - 29 Masserdotti, G. *et al.* Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* 17, 74-88, doi:10.1016/j.stem.2015.05.014 (2015).
 - 30 Liu, Y. *et al.* Ascl1 Converts Dorsal Midbrain Astrocytes into Functional Neurons In Vivo. *J Neurosci* 35, 9336-9355, doi:10.1523/JNEUROSCI.3975-14.2015 (2015).

31 Gascon, S., Masserdotti, G., Russo, G. L. & Gotz, M. Direct Neuronal Reprogramming: Achievements, Hurdles, and New Roads

to Success. *Cell Stem Cell* 21, 18-34, doi:10.1016/j.stem.2017.06.011 (2017).

急性音響外傷における ERK シグナルのリン酸化とその機能的役割

松延 毅^{1) 2)}、栗岡隆臣²⁾、佐藤泰司³⁾、藤岡正人⁴⁾、塩谷彰浩²⁾

1) 日本医科大学大学院医学研究科頭頸部・感覚器学

2) 防衛医科大学校 耳鼻咽喉科学講座

3) 防衛医科大学校 麻酔科学講座

4) 慶應義塾大学医学部 耳鼻咽喉科学教室

はじめに

音響外傷は急性感音難聴の中で多くを占める疾患である。音響外傷における聴力像や蝸牛形態学的変化はある程度解明されているものの、発症機序に関する分子学的メカニズムはほとんど分かっていない。Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は mitogen-activated protein kinase (MAPK) の 1 つであり、遺伝子発現の調整、分裂、代謝、生存、アポトーシス、分化に関与するとされている細胞内シグナルである。ERK は音響負荷などの細胞外からの刺激に反応して、スレオニンとチロシン残基がリン酸化されて活性化される。MAP キナーゼ経路は、MAP キナーゼ (MAPK)、MAP キナーゼキナーゼ (MAP2K)、MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MAP3K) の 3 つの階層のセリン/スレオニンキナーゼから構成された細胞内の情報伝達経路である。MAP3K は細胞外から加わる様々な刺激や細胞内環境の変化などに応答して自身のリン酸化酵素としての活性を亢進させる¹⁾。活性化した MAP3K は MAP2K をリン酸化により活性化する。活性化した MAP2K はさらに MAPK をリン酸化し、活性化 MAPK は転写因子をはじめとするさまざまな標的分子をリン酸化することによって多彩な機能を発揮する。

哺乳類においては MAP キナーゼ経路には 3 つの主要な経路が知られている。これらのうち、JNK (c-Jun N-terminal kinase) ならびに p38 経路は

ストレス応答キナーゼ (stress-activated protein kinase: SAPK) 経路とも呼ばれ、紫外線、放射線、酸化ストレスや熱ショックといったさまざまなストレス刺激や炎症性サイトカインによって活性化され、アポトーシスの誘導をはじめとする多様なストレス応答に関与している。

細胞死の制御機構としてこれらの経路が注目されるようになったきっかけは、神経成長因子 (NGF) に依存して生存する培養交感神経細胞から NGF を除去することで誘導されるアポトーシスに、JNK ならびに p38 が積極的に関わっていることが示されたことであった。しかしその後は、JNK や p38、さらにその上流の MAP2K、MAP3K に関しても、それぞれの分子が細胞死を促進するという報告だけでなく、逆に抑制的に働くという報告も相次ぐこととなった。結局、後にノックアウトマウスを用いた解析などが決め手となり、JNK や p38 が単独で細胞死を制御する状況はまれで、むしろ細胞の置かれた環境や細胞自身の細胞死シグナルに対する感受性などに応じて、他の細胞死制御機構との連携により細胞の運命を決定しているという考え方が定着しつつある²⁾。

しかし、聴覚における ERK の役割についてはあまり知られていない。そこで今回我々は、マウスを用いて音響外傷と有毛細胞に関する ERK2 の役割について検討を行った。

方法

Erk2 ノックアウトマウスは胎生致死であることが報告されている³⁾。そこで、Cre/loxP システムを用いて内耳有毛細胞特異的 *Erk2* 遺伝子ノックアウトマウス (HC-E2CKO) を作製し、音響外傷における ERK1/2 のリン酸化と発現について検討を行った。作製には、*Erk2*^{flax/flax} マウスを内耳有毛細胞特異的な遺伝子である *Pou4f3* の cre マウスと交配させた。さらに音響外傷後の聴力と有毛細胞の生存率についても評価した。

結果

音響外傷直後に、蝸牛外側壁とコルチ器において ERK1/2 のリン酸化を確認した (図 1)。特に、コルチ器では有毛細胞や支持細胞でリン酸化を認めた。そこで、HC-E2CKO マウスを用いて、有

毛細胞での ERK2 の役割について解析した。まず、HC-E2CKO マウス (8 週齢) で蝸牛の形態を検討したが、コントロールと比較して明らかな形態異常を示さず、有毛細胞と一部の支持細胞を除いては ERK2 の発現に変化は認めなかった。音響外傷後における HC-E2CKO マウスの聴力評価を行ったところ、コントロールでは部分的な聴力の回復を示したが、HC-E2CKO ではほとんど回復を示さず、高周波数領域 (32 kHz) において有意差を認めた (図 2)。

考察

急性音響性外傷も内耳の急性障害モデルとして内耳障害の病態解明に多く用いられている。ある閾値以上の強大音曝露により、内耳有毛細胞は細胞死にいたり不可逆性の聴覚障害に陥る。音響外傷

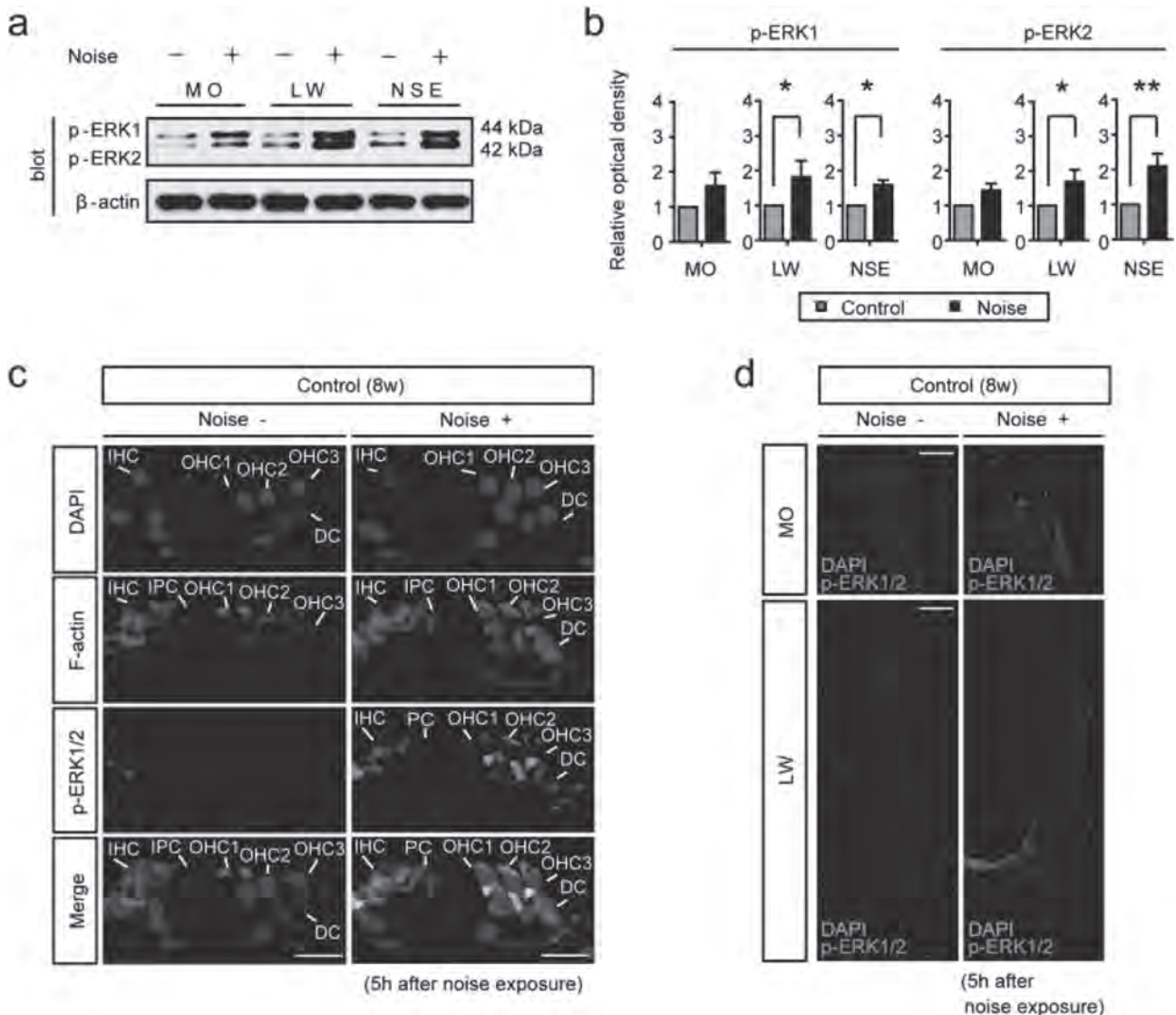


図 1

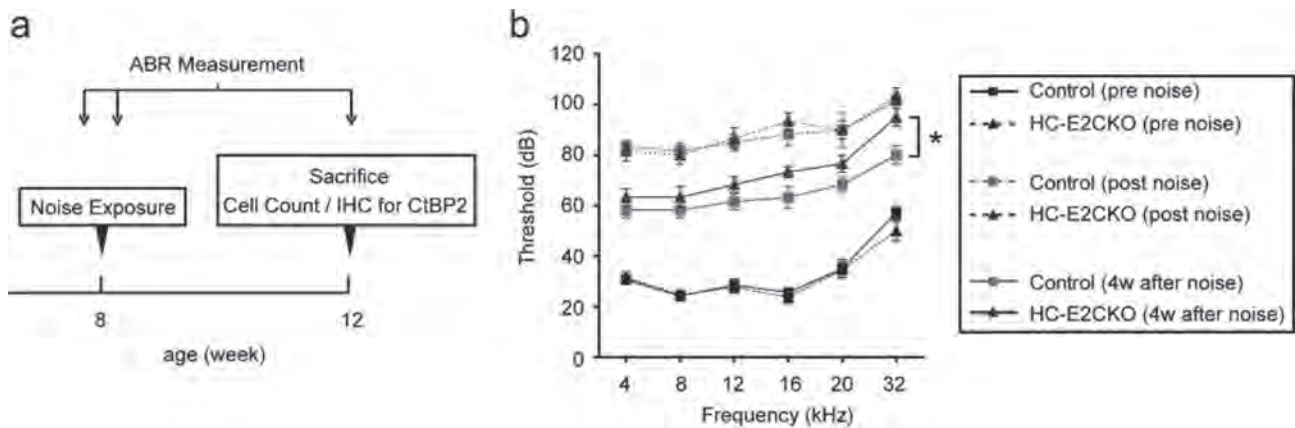


図 2

により蝸牛有毛細胞が細胞死に至る機序としては、物理的な損傷、血流障害などもあるが、生化学的な機序の関与も大きいことがわかっている。蝸牛が強大音に曝露されるとまず組織内の活性酸素量が急速に増加することが報告されている。過量に産生された活性酸素は数日間産生され続け影響を及ぼし続ける。また、音響外傷においても、蝸牛感覚上皮の有毛細胞のアポトーシスが引き起こされるが、その経路はやはり活性酸素産生を引き金とする MAP キナーゼ経路である。音響外傷による蝸牛有毛細胞のアポトーシス経路も主にカスパーゼにより制御されているようである。強大音曝露に引き続き、蝸牛有毛細胞内にカスパーゼ 3, 8, 9 の共発現がみられる⁴⁾。その他にも、cytochrome c のミトコンドリアから細胞質への放出や、アポトーシス経路のエフェクター分子である EndoG⁵⁾ や AIF⁶⁾ のミトコンドリアから核への放出が観察されている。また、筆者らは強大音曝露により蝸牛内組織の Activator protein-1 が活性化されることを見だし、JNK 経路が病態に関与していることを報告した⁷⁾。これらは MAP キナーゼ経路のうちのストレス応答キナーゼ (Stress-activated protein kinase: SAPK) 経路である JNK ならびに p38 経路の関与を示唆する所見である。それをさらに裏付ける報告が増加している。JNK 阻害剤である CEP-1347 の投与により強大音曝露による有毛細胞死を軽減させるとされ、MAPK-JNK 経路をブロックするとされる細胞透過性ペプチドである AM-111 や D-JNK-1 は強大音曝露後の投与でも、音響性聴覚障害を軽減させるという結果が出ている^{8), 9), 10)}。これらの報告より、内耳蝸牛組織にお

いて MAP キナーゼ経路、特に JNK 経路は内耳障害の病態に大きく関与しているものと考えられる。

まとめ

HC-E2CKO は音響外傷に対して障害を強く認めたことから、内耳有毛細胞における ERK2 は音響外傷時に保護的に作用することが示唆された。内耳における MAP キナーゼの関与は主に急性内耳性難聴における有毛細胞障害であることが、これまでの報告でわかっている。海外においては JNK 経路の阻害剤を用いた臨床治験もおこなわれているようである。現在のところ内耳性難聴の病態解明は十分に進展しておらず有効な治療法も確立していないのが現状である。今後のさらなる研究に期待したい。

参考文献

- 1) 恵口豊, 辻本賀英. アポトーシス研究を推進したブレイクスルー. pp10-27. 羊土社. 2006.
- 2) Liu, J, Lin A: Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. Cell Res 2005; 15: 36-42.
- 3) Satoh, Yasushi, et al. "Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) knockdown mice show deficits in long-term memory; ERK2 has a specific function in learning and memory." The Journal of Neuroscience 27 (2007): 10765-10776.
- 4) Nicotera TM, Hu BH, Henderson D. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of the chinchilla cochlea. J Assoc

- Res Otolaryngol 2003; 4(4): 466-477.
- 5) Yamashita D, Miller JM, Jiang HY, Minami SB, Schacht J. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. NeuroReport 2004; 15(18): 2719-2722.
 - 6) Han W, Shi X, Nuttall AL. AIF and endoG translocation in noise exposure induced hair cell death. Hear Res 2006; 211: 85-95.
 - 7) Matsunobu T, Ogita K, Schacht J. Modulation of activator protein/DNA binding activity by acoustic overstimulation in the guinea-pig cochlea. Neuroscience 2004; 123(4): 1037-1043.
 - 8) Wang J, Van De Water TR, Bonny C, de Ribaupierre F, Puel JL, Zine A. A peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase protects against both aminoglycoside and acoustic trauma-induced auditory hair cell death and hearing loss. J Neurosci 2003; 23 (24) 8596-8607.
 - 9) Guitton MJ, Wang J, Puel. New pharmacological strategies to restore hearing and treat tinnitus. Acta Otolaryngol 2004; 124(4): 411-415.
 - 10) Coleman JK, Littlesunday C, Jackson R, Meyer T. AM-111 protects against permanent hearing loss from impulse noise trauma. Hear Res 2007; 226(1-2): 70-78.

Ca²⁺-ATPase 変異による進行性聴力障害について

美野輪 治^{1,2,3,4)}、神谷和作¹⁾、大保貴嗣⁷⁾、山崎和生⁷⁾、鈴木裕⁷⁾、
吉木淳⁴⁾、城石俊彦⁶⁾、野田哲生^{3,5)}、岡崎康司²⁾、池田勝久¹⁾

- 1) 順天堂大学医学部 耳鼻咽喉科学教室
- 2) 順天堂大学 難病の診断と治療研究センター
- 3) 理化学研究所バイオリソース研究センター、疾患モデル評価研究開発チーム
- 4) 理化学研究所バイオリソース研究センター、実験動物開発室
- 5) がん研究会がん研究所 細胞生物部
- 6) 国立遺伝学研究所 哺乳動物遺伝研究室
- 7) 旭川医科大学生化学講座 機能分子科学分野

背景

マウスの難聴変異体は、加齢性障害を含む聴力障害の根底的な機構を理解する上で依然として重要なモデルである⁶⁾。我々は、順遺伝学的方法に基づく ENU 突然変異誘発プラットフォームを構築し¹⁾⁻³⁾、活用することにより、聴覚障害を有するマウス変異体を同定・樹立し、ヒト加齢進行性難聴の機構解析のための新規マウスモデルを開発した。

方法

進行性聴覚障害を有するマウス系統を樹立するため、クリックボックスによる驚愕反応を指標として変異体マウスをスクリーニングし、難聴候補個体の聴性脳幹反応 (ABR) を測定した。単離された Ca²⁺-ATPase;Pmca2 突然変異体 4 系統について、非症候性難聴の定義的特徴である、難聴の他に形質を伴わない事を確認するために、更に包括的表現型スクリーニングを実施した⁴⁾⁵⁾。進行性表現型の可能性を検索するため、2 週間隔での測定における差異を検討した。これら変異体における有毛細胞カルシウムイオンの排出活性の障害を証明するために、変異遺伝子産物を発現する細胞から変異タンパク産物を抽出し、酵素反応中間体 EP の定量的測定を行なった。

結果

樹立した上記 4 系統は、4 つの異なる allele を其々持つ変異体であり、この内、M850 は早期より高度難聴を示し、一方で、M290 は早期週齢において、中程度の難聴にとどまり、表現型強度に差異を認めた。異なる時点での有毛細胞およびらせん神経節細胞の最終的な消失を含む、これら系統の間の明確な表現型変化を観察した。C57BL と C3H の掛け合わせによる F1 の遺伝背景は、これらの表現型の相違を著しく増大した。この F1 においては、M850 は早期より高度難聴を示す一方で、M290 は早期週齢において全くの正常聴力であった。

考察

これら 4 系統のうち、M095 と M639 は、両者 (M850 と M290) の中間の表現型を示し、低周波領域ではほぼ正常で、高周波領域において中程度難聴を示し、更に全領域で継時的に ABR 域値の上昇を示した。従って、この 2 系統が、この条件下で、進行性の難聴を解析するためには最適と考えられた。

こうした明瞭な表現型の差異は、各変異遺伝子産物の Ca²⁺ ポンプ活性の差から生じることが推

定される。近縁な Ca^{2+} -ATPase family である Serca2 遺伝子の変異は、マウスにおいて扁平上皮癌を生じることが知られており、細胞内 Ca^{2+} 濃度の定常的調節が、細胞の多岐にわたる機能に関わることが推論されている。聴覚においては細胞内 Ca^{2+} 調節障害の表現型が継時的な差異を伴って発現する経路が、有毛細胞の機能的低下のみをもたらすのか、不動毛の部分的な形態形成異常を生じるものなのか⁷⁾、或はその細胞の生存そのものを脅かすものかに、分けられると仮定すると、これらの経路を解明することが、ヒト加齢・進行性難聴発症機構の重要な可能性を示すと考えられる (図 1)。

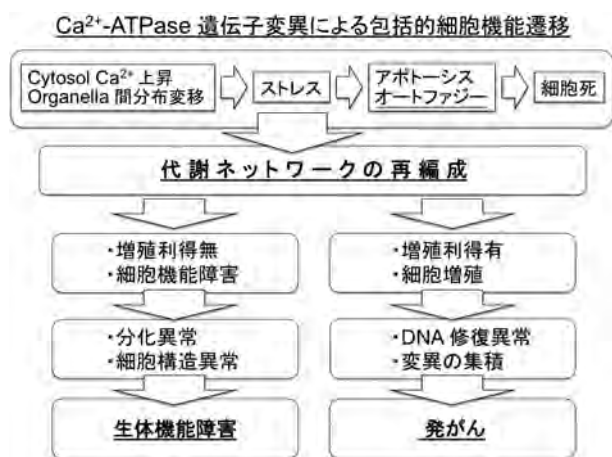


図 1

参考文献

- 1) Brown SD, Hardisty-Hughes RE, Mburu P., Nat Rev Genet, 9, 4, 277-90, 2008.
- 2) Bull KR et al., “Unlocking the bottleneck in forward genetics using whole-genome sequencing and identity by descent to

isolate causative mutations”, PLoS Genet.9 ,1, Epub 2013 Jan 31.

- 3) Gondo Y, “Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics.” Nat. Rev. Genet., 10, 803 – 810, 2008.
- 4) Spiden SL, Bortolozzi M, Leva FD, Angelis MH, Fuchs H, Lim D, Ortolano S, Ingham NJ, Brini M, Carafoli E, Mammano F, Steel KP. “The Novel Mouse Mutation Oblivion Inactivates the PMCA2 Pump and Causes Progressive Hearing Loss” PLOS Genetics, 4,10, e1000238, 2008
- 5) Mario Bortolozzi, et al “The Novel PMCA2 Pump Mutation Tommy Impairs Cytosolic Calcium Clearance in Hair Cells and Links to Deafness in Mice” The Journal Of Biological Chemistry, vol. 285, NO. 48, pp. 37693-37703, November 26, 2010
- 6) Paul K. Potter1,et al “Novel gene function revealed by mouse mutagenesis screens for models of age-related disease” Nature Communications, 7:12444 ,18 Aug 2016
- 7) Miyasaka Y,et al “Heterozygous mutation of Ush1g/Sans in mice causes early-onset progressive hearing loss, which is recovered by reconstituting the strain-specific mutation in Cdh23” Human Molecular Genetics, 1-15, 2016, with thallium-based olfactory imaging in patients with idiopathic olfactory dysfunction. Sci Rep. 15;7(1):3581, 2017.

側頸嚢胞における ハイリスク型・ヒトパピローマウイルス -16 の感染

池上太郎、上原貴行、平川 仁、真栄田裕行、我那覇章、鈴木幹男

琉球大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

はじめに

側頸嚢胞は、胎生期に形成される第2鰓器官の頸洞の退縮異常により生じる^{1,2)}。一方、皮膚や咽頭壁に瘻孔を有するものを側頸瘻という^{1,2)}。ヒトパピローマウイルス (HPV) はエンベロープを持たない、二本鎖 DNA をもつウイルスで、パピローマウイルスに属するウイルスである³⁾。現在までに200種類以上の HPV が同定されており³⁾、HPV は皮膚または粘膜に感染する。粘膜に感染する HPV は、発がんに関与するものと、関与しないものに分類されており、それぞれハイリスク型 HPV とローリスク型 HPV に分類される。さらにハイリスク型 HPV には、現在14種類 (HPV-16、-18、-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-66、-68) 同定されている。ハイリスク型 HPV では、多くの場合、HPV DNA の E2 遺伝子の領域が宿主ゲノムに組み込まれることで、発癌タンパク質である E6 および E7 のタンパク質の発現が亢進し、癌化へと導く^{4,5)}。

側頸嚢胞において、PCR 法により19例中7例で HPV-16 または HPV-18 ゲノム DNA が検出されることが報告された⁶⁾。そこで本研究では、側頸嚢胞の HPV 感染の有無、ウイルス量、宿主ゲノムへの HPV 遺伝子の組み込みについて調べた。

方法

サンプル収集

対象は、2002年から2015年まで当科を受診した側頸嚢胞の患者6名である (男性3名、女性3名、年齢は2～29歳)。また HPV の陽性コントロー

ルとして HPV 関連中咽頭癌のリンパ節転移の患者を1名含めた (表1)。側頸嚢胞6例中5例のサンプルは、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルを用いた。一方、新鮮凍結サンプルが手に入った側頸嚢胞1例および陽性コントロールサンプル1名は新鮮凍結サンプルも用いた。新鮮凍結サンプルが手に入った側頸嚢胞症例では、嚢胞液も採取した。以上は、琉球大学倫理審査委員会で承認されている。

DNA の検出

FFPE および新鮮凍結サンプルから DNA を抽出した。FFPE サンプルについては DNA 抽出前に以下の処理を行った。30 μ m の厚さ分の FFPE 切片 (10 μ m の厚さの切片を3枚) をキシレンで脱パラフィンし、100% エタノールに入れた。つづいて、切片のエタノールを風乾し、Gentra Purgene Tissue kit (キアゲン) を用いて DNA 抽出を行った。FFPE サンプルから抽出した DNA は、さらに 25 mM ホウ酸 - 水酸化ナトリウムバッファー (pH 11.0) で 100℃、30 分間熱し、再度エタノール沈殿し、DNA を精製した⁷⁾。抽出した全ての DNA サンプルは、 β -グロビン遺伝子増幅用のプライマーセット、PC04/GH20 で PCR を行い、DNA のクオリティを確認した。

HPV DNA のスクリーニング

HPV のスクリーニングで一般的に使われるコンセンサスプライマーセット GP5+/GP6+ および MY09/MY11 で PCR を行った (表1)。1st PCR

でバンドが出ない場合には、1st PCR 産物を 10 倍希釈し、それをテンプレートとして GP5+/GP6+プライマーセットで nested PCR を行った⁸⁾。得られた PCR 産物は、精製し、ダイレクトシーケンス法で配列を決定した。

FFPE から抽出した DNA は、200 bp 以下に断片化していることがあることから、GP5+/GP6+および MY09/MY11 のプライマーセットによる PCR では増幅できない可能性もあった。そこで、頭頸部領域で 9 割以上検出される HPV-16 に絞って、E2、E6、E7 の 3 遺伝子の領域にプライマーをデザインした⁹⁾。目的のサイズのバンドが得られた場合には、PGEM-T easy vector (プロメガ) にサブクローニングし、DNA シーケンスにかけて配列決定をした。

リアルタイム PCR 法による HPV-16 DNA の定量

HPV-16 DNA 量は HPV-16 の初期遺伝子の配列を含むプラスミドを $10^1 \sim 10^6$ コピーになるように段階希釈をしたものを標準 DNA として、E6 遺伝子の領域でリアルタイム PCR (taqman probe 法) を行い、定量した¹⁰⁾。また、ハイリスク型 HPV では、ホストゲノム DNA に組み込まれる際に、E2 遺伝子が欠損することが知られる。このことから、E6 DNA コピー数と E2 DNA コピー数を比較することで、HPV DNA のホストゲノム DNA への組み込み状態を知ることができる。具体的には、E2/E6 = 1 のとき、HPV DNA はエピソード DNA の状態 (episomal) であり、E2/E6=0 のとき、HPV DNA は完全に組み込まれた状態である (integration)。一方、E2/E6 が 0 より大きく 1 より小さいときは、エピソード DNA と組み込まれた DNA が混在した状態である (mixed)^{5, 10)}。このため、本研究では、さらに HPV-16 E2

遺伝子についてもリアルタイム PCR 法で定量し、E2/E6 を算出した (表 1)。また測定したサンプルの DNA 量を揃えるため、human genomic placental DNA を 0.3 ~ 300 ng に段階希釈し、検量線を引き、サンプルのゲノム DNA 量も定量し、補正した¹⁰⁾。

HPV DNA *in situ* hybridization

GenePointTM HPV biotinylated DNA probe および GenePoint tyramide signal amplification system for biotinylated probes (HPV-16、-18、-31、-33、-35、-39、-45、-51、-52、-56、-58、-59、-68 のハイリスク型 HPV DNA を検出できるプローブ、DAKO) を使用し、HPV DNA *in situ* hybridization (HPV DNA ISH) を行った。また細胞核はヘマトキシリンで対比染色をした。

p16^{INK4a} の免疫染色

CINTec[®] p16 Histology kit (MTM) を用いて、p16^{INK4a} の免疫染色を行った。また細胞核はヘマトキシリンで対比染色をした。

結果

HPV 型の同定

表 1 に示したように、側頸嚢胞 6 例中 4 例で HPV-16 型が検出された。患者 4 では嚢胞液からも HPV-16 が検出された。

HPV-16 DNA のコピー数とその状態

陽性コントロールである中咽頭癌リンパ節転移サンプルは、 1.06×10^6 copies/50 ng DNA であり、E2/E6 は 0.92 で、HPV DNA の状態は mixed であった。一方、HPV-16 陽性の側頸嚢胞 4 例では、HPV DNA コピー数は、 7.10×10^2

表1 側頸嚢胞における用いたサンプルの状態、PCR増幅、ウイルス量、ウイルス感染の状態、ISHシグナルの状態とp16^{INK4a}の陽性細胞の割合

患者No.	性別	年齢	症状	サンプル	PCR 増幅					ウイルス量 (copies/50 ng DNA)	組み込み				p16 ^{INK4a} (%)
					GP	MY	E2	E6	E7		HPVタイプ	E2/E6	Status	ISHシグナル	
1	男性	2	側頸嚢胞	FFPE	-	-	+	+	+	16	1.65 × 10 ³	1.03	Episomal	D	0
2	男性	29	側頸嚢胞	FFPE	+	+	+	+	+	18	7.39 × 10 ²	0.56	Mixed	D, P	5
3	女性	18	側頸嚢胞	FFPE	-	-	+	+	-	16	2.21 × 10 ⁴	0.03	Mixed	D, P	5
4	女性	6	側頸嚢胞	凍結 & FFPE	-	-	+	+	not tested	16	9.21 × 10 ³	0.03	Mixed	D, P	5
4			嚢胞液	凍結	-	-	+	+	not tested	16	7.10 × 10 ²	0.49	Mixed	NA	NA
5	男性	16	側頸嚢胞	FFPE	-	-	-	-	-	No			(-)		5
6	女性	9	側頸嚢胞	FFPE	-	-	-	-	-	No			(-)		5
Control	男性	50	HPV関連・中咽頭癌リンパ節転移	凍結 & FFPE	+	+	+	+	+	16	1.06 × 10 ⁶	0.92	Mixed	D, P	100

D, diffuse; FFPE, フォルマリン固定パラフィン包埋; ISH, *in situ* hybridization; P, punctuate; NA, not available; -, 増幅なし; +, 増幅あり; (-), ISH陽性シグナルなし。

～ 1.65×10^6 copies/50 ng DNA であり、患者ごとにコピー数が異なっていた。またそのうち3例では E2/E6 は 0.03 ～ 0.56 で HPV DNA の状態はミックス状態 (mixed) であった。一方、側頸嚢胞の患者 1 では E2/E6 は 1.03 で、エピソード状態 (episomal) であった (表 1)。

HPV DNA ISH

ISH の結果は、E2/E6 によって予測された HPV DNA の状態と一致しており、HPV DNA の状態が mixed であった側頸嚢胞 3 症例と 1 例の陽性コントロールである中咽頭癌リンパ節転移サンプルでは diffuse (episomal signal) と punctuate (integrated signal) が見られた (図 2)。一方、HPV DNA がエピソード状態と予想された症例 1 では、diffuse のみしか観察されなかった (表 1、図 1)。

p16^{INK4a} 免疫染色

陽性コントロールの中咽頭癌リンパ節転移サンプルでは、p16^{INK4a} の染色率は 100% であっ

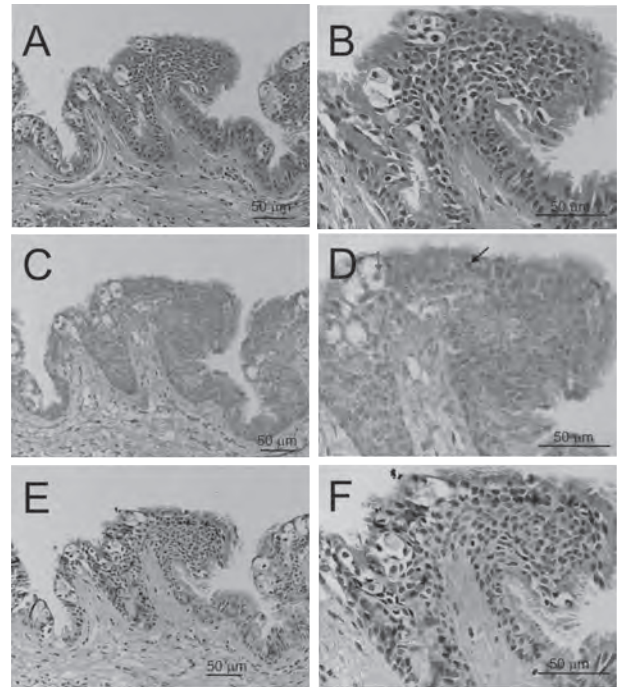


図 2. HPV-16 感染・側頸嚢胞の患者 6 (エピソード DNA と組み込まれた DNA がミックスの状態)。A および B、ヘマトキシリン・エオシン染色；C および D、HPV DNA in situ hybridization (HPV DNA ISH)；E および F、p16^{INK4a} の免疫染色。HPV DNA ISH では、HPV DNA がホストゲノム DNA が組み込まれた状態のシグナルである punctuate (黒矢印) とエピソード DNA の状態のシグナルである diffuse (赤の矢印) が見られた (D)。p16^{INK4a} は嚢胞壁の細胞中 5% 程度の細胞で発現していた (F)。

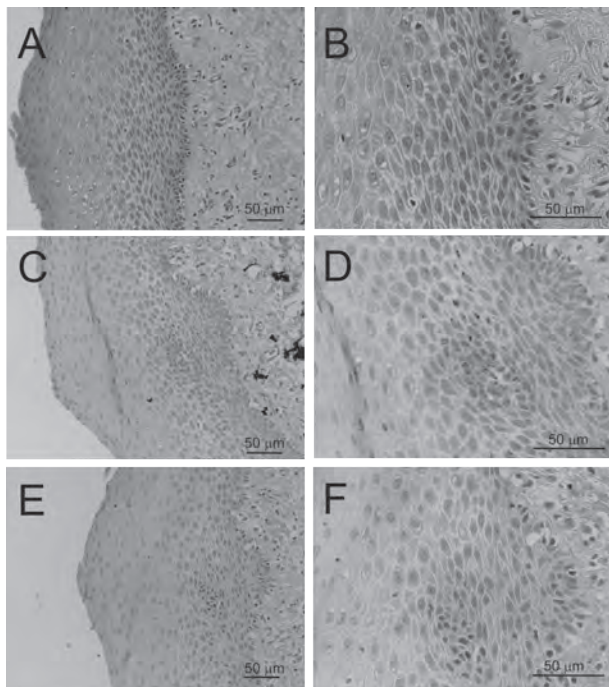


図 1. HPV-16 感染・側頸嚢胞の患者 1 (エピソード DNA の状態)。A および B、ヘマトキシリン・エオシン染色；C および D、HPV DNA in situ hybridization (HPV DNA ISH)；E および F、p16^{INK4a} の免疫染色。HPV DNA ISH では、HPV DNA がエピソード状態のシグナルである diffuse (赤の矢印) が見られた (D)。p16^{INK4a} は発現していなかった (F)。

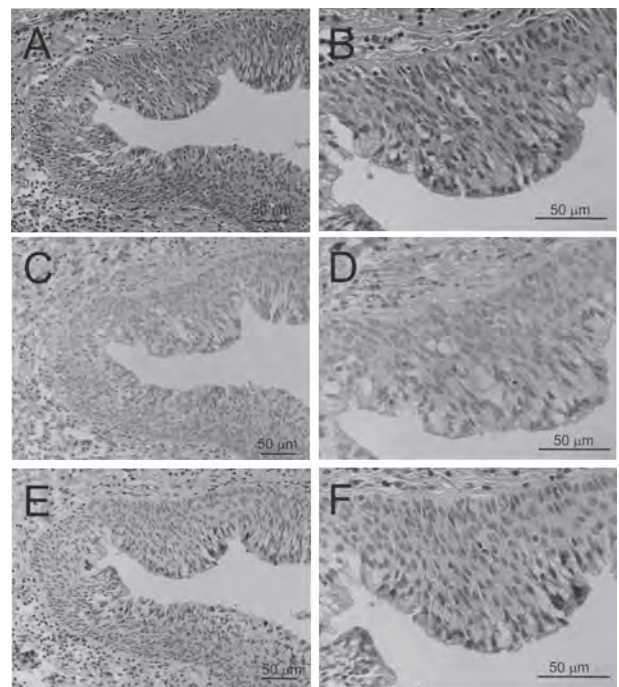


図 3. HPV-16 非感染・側頸嚢胞の患者 4。A および B、ヘマトキシリン・エオシン染色；C および D、HPV DNA in situ hybridization (HPV DNA ISH)；E および F、p16^{INK4a} の免疫染色。p16^{INK4a} は嚢胞壁の細胞中 5% 程度の細胞で発現していた (F)。

た。HPV-16 感染の側頸嚢胞 4 例において、HPV DNA がエピソームの状態の患者では p16^{INK4a} は全く発現していなかった (図 1)。一方、HPV DNA がミックスの状態の患者では、p16^{INK4a} は嚢胞壁の細胞のうち 5% 程度の細胞で発現していた (図 2)。一方、HPV 非感染の側頸嚢胞 2 例においても、5% 程度の細胞で p16^{INK4a} が発現していた (図 3)。

考察

今回、HPV-16 陽性・側頸嚢胞 4 例では $7.10 \times 10^2 \sim 1.65 \times 10^6$ copies/50 ng (median 9.21×10^3) であった。一方、当科の以前の研究では、HPV-16 関連扁桃癌において HPV DNA 量は $1.54 \times 10^2 \sim 1.34 \times 10^7$ copies/50 ng DNA (median 4.13×10^5) であった。これらの結果から、側頸嚢胞における HPV DNA 量は HPV 関連扁桃癌よりは少なかった。

また今回、側頸嚢胞において HPV の感染の有無に関わらず、p16^{INK4} が嚢胞壁の 5% 程度の細胞で発現していた。このことから、側頸嚢胞では、少ない p16^{INK4a} の発現は HPV 感染のサロゲートマーカーにはならないことが判明した (図 1-3)。

今回、調べた 6 例の側頸嚢胞は瘻孔を有しておらず、他の領域と交通が見られなかった。現在のところ、どのように側頸嚢胞に HPV が感染したのか不明である。HPV DNA が羊水および胎盤から検出され¹¹⁻¹⁵⁾、また胎生期に HPV に暴露されると、新生児の口腔内から HPV が検出されることが報告されている^{11,12)}。このことから、胎生期に羊水から HPV が鰓器官に入り、持続感染が生じた可能性がある。側頸嚢胞への HPV の感染ルートの解明については、今後さらなる研究が必要である。

側頸嚢胞の治療法は通常外科手術による切除であるが、エタノール硬化療法なども行われている^{16, 17)}。今回の研究結果から、側頸嚢胞はハイリスク型 HPV に感染していることがあるため、できるだけ手術により摘出が望ましいと考える。

参考文献

1. Waldhausen JH: Branchial cleft and arch

anomalies in children. *Semin Pediatr Surg* 15: 64-69, 2006.

2. Veivers D and Dent J: Lateral cervical cysts: An Australian perspective. *ANZ J Surg* 82: 799-802, 2012.

3. Bzhalava D, Eklund C and Dillner J: International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* 476: 341-344, 2015.

4. Badaracco G, Venuti A, Sedati A and Marcante ML: HPV16 and HPV18 in genital tumors: Significantly different levels of viral integration and correlation to tumor invasiveness. *J Med Virol* 67: 574-782, 2002.

5. Peitsaro P, Johansson B and Syrjänen S: Integrated human papilloma virus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40: 886-891, 2002.

6. Pai RK, Erickson J, Pourmand N and Kong CS: p16INK4A immunohistochemical staining may be helpful in distinguishing branchial cleft cysts from cystic squamous cell carcinomas originating in the oropharynx. *Cancer* 117: 108-119, 2009.

7. Deng Z, Hasegawa M, Matayoshi S, Kiyuna A, Yamashita Y, Maeda H and Suzuki M: Prevalence and clinical features of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma in Okinawa, southern Japan. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 268: 1625-1631, 2011.

8. Deng Z, Hasegawa M, Yamashita Y, Matayoshi S, Kiyuna A, Agha S, Uehara T, Maeda H and Suzuki M: Prognostic value of human papillomavirus and squamous cell carcinoma antigen in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 103: 2127-2134, 2012.

9. Ikegami T, Uehara T, Deng Z, Kondo S, Maeda H, Kiyuna A, Agena S, Hirakawa H, Yamashita Y, Ganaha A, Suzuki M: Detection of human papillomavirus in branchial cleft cysts. *Oncol Lett* 16: 1571-1578, 2018
10. Deng Z, Hasegawa M, Kiyuna A, Matayoshi S, Uehara T, Agena S, Yamashita Y, Ogawa K, Maeda H and Suzuki M: Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 35: 800-808, 2013.
11. Armbruster-Moraes E, Ioshimoto LM, Leão E and Zugaib M: Presence of human papillomavirus DNA in amniotic fluids of pregnant women with cervical lesions. *Gynecol Oncol* 54: 152-158, 1994.
12. Sarkola ME, Grénman SE, Rintala MA, Syrjänen KJ and Syrj Nen SM: Human papillomavirus in the placenta and umbilical cord blood. *Acta Obstet Gynecol Scand* 87: 1181-1188, 2008
13. Syrjänen S: Current concepts on human papillomavirus infections in children. *APMIS* 118: 494-509, 2010.
14. Tseng CJ, Lin CY, Wang RL, Chen LJ, Chang YL, Hsieh TT and Pao CC: Possible transplacental transmission of human papillomaviruses. *Am J Obstet Gynecol* 166: 35-40, 1992.
15. Smith EM, Johnson SR, Cripe TP, Pignatari S and Turek L: Perinatal vertical transmission of human papillomavirus and subsequent development of respiratory tract papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 100: 479-483, 1991.
16. Kim MG, Kim SG, Lee JH, Eun YG and Yeo SG: The therapeutic effect of OK-432 (picibanil) sclerotherapy for benign neck cysts. *Laryngoscope* 118: 2177-2181, 2008.
17. Knipping S, Goetze G, Neumann K and Bloching M: Sclerotherapy of cervical cysts with Picibanil (OK-432). *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 264: 423-427, 2007.

頭頸部扁平上皮癌における CXCR4 の役割

登米 慧、鈴木真輔、山田武千代

秋田大学耳鼻咽喉科・頭頸部外科

背景、目的

頭頸部扁平上皮癌に対する治療には手術のほかに、シスプラチンを中心とした化学療法と放射線療法がある。再発・転移性の腫瘍に対しては近年、VEGFR 阻害薬や免疫チェックポイント阻害薬が実用化されているが、患者によっては予後は十分とは言えない。我々は以前から、治療の新たなターゲットとなる分子を検索しており、今回は CXCR4 に着目した。

CXCR4 は 7 回膜貫通型 G タンパク共役受容体スーパーファミリーに属するケモカインレセプターである。エイズウイルスの感染経路の 1 つとして知られており、免疫関連では以前から広く研究されてきたタンパク質だが、近年癌進展にも関連していることが分かってきた。主に腺癌の分野では、アゴニストである SDF-1 が予後を増悪させる因子であることが示されている。頭頸部癌領域では臨床検体を用いた論文がほとんどを占めており、基礎研究に関連した論文は非常に少ない。

今回の研究は CXCR4 が頭頸部扁平上皮癌細胞株の癌進展に関連していることを証明し、今後の CXCR4/SDF-1 軸の研究の足掛かりとすることを目的とする。

方法、結果

まずは western blotting 法を用いて頭頸部扁平上皮癌細胞株に CXCR4 が発現していることを確認した (図 1)。そのうち最も発現が亢進していた FaDu で以降の実験を行った。

次に migration assay を用いて FaDu の遊走能を検討した。SDF-1 を加えた培地で培養した FaDu は遊走能が亢進し、AMD3100 を加えた培

地ではその作用が抑制されていた (図 2)。

Proliferation assay、MTT assay により細胞増殖能を検討した。Proliferation assay では AMD3100 を加えた培地の FaDu では増殖能が抑制される傾向にあった (図 3) が、4 日目の実数では有意差は認めなかった (図 4)。MTT assay でも AMD3100 培地では増殖能が抑制され、こちらは他の培地と比較して有意差を認めた (図 5)。

AMD3100 は細胞増殖を抑制し、SDF-1 は遊走能を上昇させることが示された。

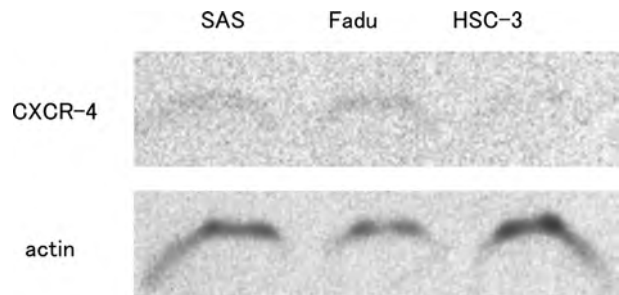


図 1. CXCR4 は SAS、FaDu、HSC-3 すべての細胞株において発現を認めた

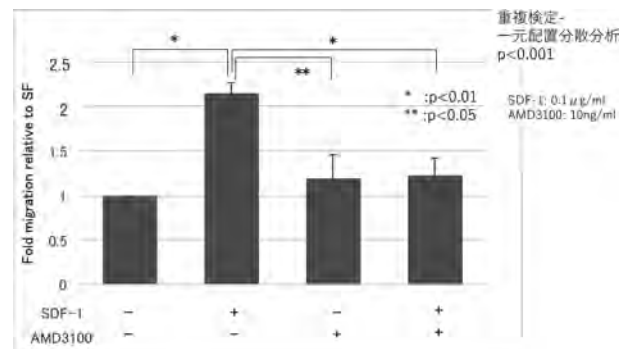


図 2. migration assay においてディッシュ裏面へ移動した細胞数の比を示す。培地に SDF-1 を加えた細胞は遊走能が亢進し、AMD3100 によってその作用が抑制された

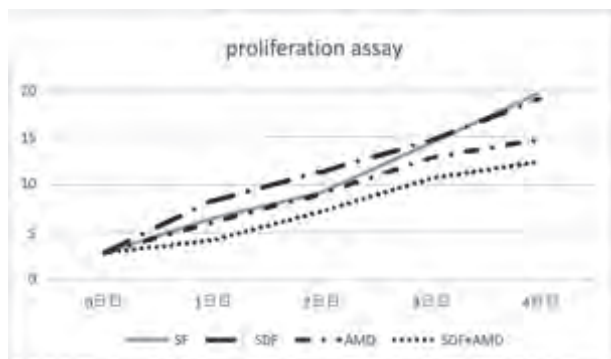


図 3. proliferation assay で培養した細胞の実数値を、横軸を日数にして示す。培地に AMD3100 を加えると、細胞増殖は抑制される傾向にあった

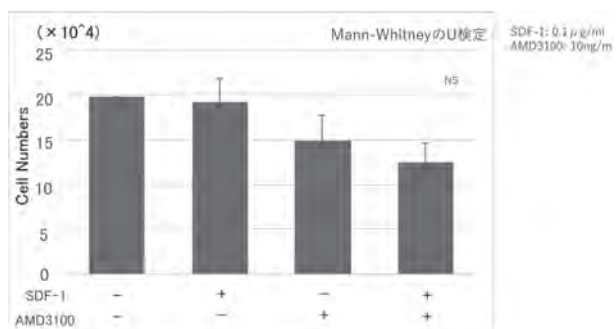


図 4. proliferation assay の 4 日目時点の細胞数を示す。AMD3100 を加えると増殖は抑制される傾向にあったが、有意差は認めなかった。

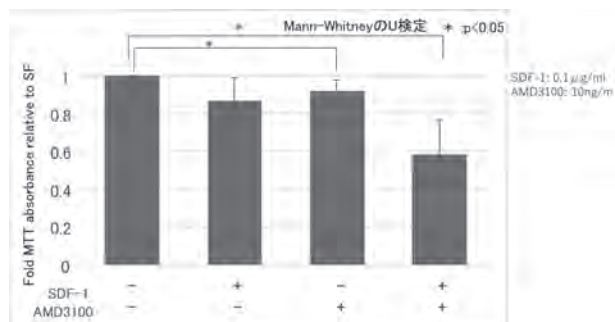


図 5. MTT assay において、培地に AMD3100 を加えた細胞の増殖は有意に抑制された。

考察

腺癌の分野では同様の基礎研究に加え、臨床検体を用いた研究でも SDF-1 が癌細胞の転移、浸潤を促進することが示されている。本研究はそれらの先行研究と矛盾せず、頭頸部扁平上皮癌の浸潤・転移においても CXCR4、SDF-1 が重要な役割を果たしている可能性を示した。今後は癌細胞におけるシグナル伝達経路との関係を解明し、CXCR4/SDF-1 軸の作用機序の解明を目指す。また CXCR4 は制御性 T 細胞の遊走にも関与しており癌微小環境中の免疫にも関連している可能性がある。これについても調査を進める予定である。

頭頸部扁平上皮がんリンパ節転移に際して発現亢進する分泌性因子の診断・治療標的としての可能性

真田朋昌¹⁾、三谷壮平¹⁾、上田哲平²⁾、鵜久森徹¹⁾、羽藤直人¹⁾

1) 愛媛大学耳鼻咽喉科

2) 松山赤十字病院 耳鼻咽喉科

はじめに

頭頸部がんの 90% 以上を占める扁平上皮がんの転移には、際立った特徴がある。すなわち、高頻度にリンパ節転移を伴うことで、言い換えれば、リンパ節転移を伴わない 頭頸部扁平上皮がん (HNSCC) の遠隔転移はまれである。このことはリンパ節転移の遠隔転移に対する影響を想起させ、本疾患の治療戦略におけるリンパ節転移抑制の重要性を示唆する。

我々はこれまでにヒト口腔扁平上皮がん細胞のリンパ節転移モデルを構築し、リンパ節転移機構について検討をおこなってきた。そのなかで腫瘍細胞が転移に先立ち標的臓器の組織構築を転移に好適に改変するため分泌する液性因子としてリジロキシダーゼ様因子 2 (LOXL2) を見出した (図 1、2)、¹⁾。LOXL2 は LOX (リジロキシダーゼ) のファミリー分子の 1 つ。リジン残基のアミノ基に作用する作用するデアミナーゼとして機能し、コラーゲンやエラスチンの架橋をおこなう。他のファミリー分子として LOXL1 ~ 4 が知られている。近年、LOX は、がん細胞や活性化した線維芽細胞において発現が亢進することが確認され、細胞外ではコラーゲン重合、細胞内では転写制御に関与し、がんや線維症の病態に寄与することが報告されている。本研究では、LOXL2 の診断・治療標的としての可能性、あるいはリキッドバイオプシーとしての可能性を査定する。

対象と方法

LOXL2 ノックダウン細胞を作成し、非ノックダ

ウン細胞とノックダウン細胞をそれぞれ移植したマウスにおいて転移活性を比較した。

また、臨床研究として患者より採血をおこない血清 LOXL2 を測定した。愛媛大学耳鼻咽喉科頭頸部外科を受診した HNSCC 患者 36 人 (口腔がん 11 人、下咽頭がん 8 人、中咽頭がん 8 人、喉頭がん 6 人、その他 3 人)、年齢は 46 歳 ~ 85 歳、平均 66.1 歳。HNSCC の既往がない患者 7 人より採血をおこなった。癌患者と非癌患者間での相違、Stage や原発部位と血清 LOXL2 値との相関を検討した。同 HNSCC 患者 36 人のうち手術加療をおこなった患者の切除標本を用いて組織学的検討をおこなった。LOXL2 抗体 (Abcam 社、Anti-LOXL2 antibody ab96233) をもちいて免疫染色をおこなった。本研究に先駆けて、当院倫理委員会に臨床研究申請をおこない、承認を得た。

結果

LOXL2 ノックダウン細胞移植マウスにおいてリンパ節転移の減少を認めた (図 3)。

HNSCC 患者の血清 LOXL2 の平均値が 1.619ng/ml であったのに対して、HNSCC の既往がない患者の血清 LOXL2 の平均値は 0.1675ng/ml であった。有意差を持って、HNSCC の既往がない患者に比べ、HNSCC 患者の血清において LOXL2 の高発現を認めた (図 4)。一方、臨床像と LOXL2 値との間には明らかな相関は認めなかった。

また、舌がん患者の切除標本において施行した免疫染色では、同一がん病変の中でも深部に位置

する、活動性が高いと考えられる部位に LOXL2 タンパク質が強く分布している像が得られた。

考察

腫瘍細胞の転移に先立ち、標的臓器の組織構築を転移に好適に改変するためには、なんらかの分泌性因子の関与が必要と考えられた。先行研究にて、ヒト転移性 HNSCC のマウスにおけるリンパ節転移モデル系を用いた検討において、HNSCC のリンパ節転移に先立つ前転移期過程形成に関与が考えられる因子の検索より、転移に先立ち発現亢進する四つの候補遺伝子を見出した。その中の一つが LOXL2 であった。LOX は、乳がんの肺転移において転移に先立つ前転移期過程形成に関与することが知られており²⁾、そのファミリー分子である LOXL2 にも同様の働きある可能性が予想された。

LOXL2 ノックダウン細胞移植マウスにおいてリンパ節転移が減少を認めたことから、LOXL2 が確かにリンパ節転移において機能することが示唆された。転移に至る頭頸部扁平上皮がん細胞は、原発巣に存在する時点で前転移期過程形成因子である LOXL2 を転移標的に送り付けることで前転移期過程を形成させて、転移の準備が整ったところで転移巣を形成するという仮説シナリオが考えられた (図5)。

また、組織における LOXL2 発現様式と予後に相関があるという報告があり³⁾、組織中の LOXL2 発現に関しても検討をおこなった。手術により腫瘍切除をおこなった舌がん患者の切除標本において LOXL2 タンパク質の分布を検討した。血清 LOXL2 と組織中 LOXL2 発現様式になんらかの相関がみられるようなら、血清 LOXL2 による予後予測の可能性まで考えられるとの思惑であったが、数例の検討において明らかな傾向はみられなかった。しかしながら、非がん部に比べ、がん部に優位に陽性を示す像がみられ、なかでも上皮から組織内部に浸潤した運動端において LOXL2 強陽性を示す像を認めた (図6)。

HNSCC 患者では HNSCC の既往がない患者に比べ血清 LOXL2 が高発現していることから、がん患者の体内では、がん細胞が自らの転移を完成

するため、盛んに LOXL2 を分泌しており、それが血液中にも循環していることが考えられた。組織中の所見に関してはまだ少数症例での検討であるが、がん細胞の活動性と LOXL2 が関与している可能性を強調する所見が得られたものと考えられた。

結論

HNSCC のリンパ節転移において関与が強く疑われる LOXL2 が患者がん組織において確認され、また患者血清中に局在していたことは、LOXL2 が転移抑制治療の標的となり得る可能性を示しているとともに、リキッドバイオプシーにおける診断標的としての可能性も強く示唆している。

参考文献

- 1) Mayorca-Guiliani AE, Yano H, Nakashiro K, Hamakawa H, Tanaka J. Premetastatic vasculogenesis in oral squamous cell carcinoma xenograft-draining lymph nodes. *Oral Oncology*, 48, 663-670, 2012
- 2) Erler JT, Bennewith KL, Cox TR, Lang G, Bird D, Koong A, Le QT, Giaccia AJ. Hypoxia-induced lysyl oxidase is a critical mediator of bone marrow cell recruitment to form the premetastatic niche. *Cancer Cell* 15, 35-44, 2009
- 3) Peinado H, Moreno-Bueno G, Hardisson D, Pérez-Gómez E, Santos V, Mendiola M, de Diego JI, Nistal M, Quintanilla M, Portillo F, Cano A. Lysyl oxidase-like 2 as a new poor prognosis marker of squamous cell carcinomas. *Cancer Res*, 68, 4541-50, 2008

16S ribosomal RNA 遺伝子解析が有用であった non-typeable *Haemophilus influenzae* による髄膜炎症例

角田梨紗子^{1,5)}、野口直哉¹⁾、鈴木貴博¹⁾、東海林史¹⁾、栗田口敏一¹⁾、
太田伸男¹⁾、樋口じゅん²⁾、八田益充³⁾、賀来満夫⁴⁾、香取幸夫⁵⁾

- 1) 東北医科薬科大学 耳鼻咽喉科
- 2) 仙台市立病院 神経内科
- 3) 仙台市立病院 感染症内科
- 4) 東北大学大学院 感染制御・検査診断学
- 5) 東北大学耳鼻咽喉・頭頸部外科

はじめに

Haemophilus influenzae（インフルエンザ菌）は、急性中耳炎や副鼻腔炎など耳鼻咽喉科領域感染症の代表的な原因菌である。今回副鼻腔炎から髄膜炎を発症し、遺伝子解析により莢膜型が non-typeable の β -lactamase nonproducing ampicillin resistant (BLNAR) *H. influenzae* が原因と考えられた一例について報告する。

症例と現病歴

症例は 35 歳男性。主訴は発熱と頭痛。既往歴に 22 年前交通外傷で頭部手術、4 年前よりてんかんがあった。現病歴は、A 病院搬送 1 週間ほど前から発熱と感冒症状があり、4 日前近医を受診しクラリスロマイシンなどを処方されるも解熱せず、搬送前日に同院再受診し、レボフロキサシン処方となった。搬送当日夕刻より嘔吐、下痢があり、その後に痙攣が見られたため市中総合病院である A 病院へ救急搬送となった。

搬送時の現症と検査所見

Japan Coma Scale-0、体温 36.2℃、血圧 144/84 mmHg、脈拍 89 回/分。身長：162.5 cm、体重：52.9 kg、髄膜刺激兆候として、Neck flexion test で頸部痛があった。

血液検査

WBC 20,700 / μ L, RBC 4.40 $\times 10^6$ / μ L, Hb 14.6 g/dL, Plt 190 $\times 10^3$ / μ L, AST 27 IU/L, ALT 15 IU/L, BUN 15 mg/dL, Cre 0.56 mg/dL, CRP 15.44 mg/dL

CT

頭部 CT では、過去の交通外傷の影響と思われる所見以外は新たな病変は指摘できなかった。副鼻腔 CT では、頭蓋骨手術後のため、頭蓋底部は粗で不正な部分が多く見られた(図 1-A 黄色矢印)。左上顎洞を中心に、篩骨洞と前頭洞にも軽度軟部陰影が見られたが(図 1-B)、蝶形洞は正常だった。頸部より尾側に感染や炎症の原因となり得る所見は指摘できなかった。

図1 CT所見

副鼻腔CT



図1-A



図1-B

黄色矢印：頭蓋骨手術後のため、頭蓋底部は粗で不正な部分が多く見られた

MRI

両側側脳室後角に fluid level が見られ、拡散強調画像で高信号 (図 2-A)、Gd 造影 T1 強調画像では同部に造影増強効果は認められず (図 2-B)、膿の貯留が疑われた (図 2-A-B 黄色矢印)。

図2 MRI所見

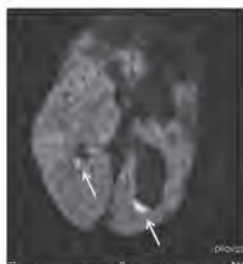


図2-A: 拡散調画像

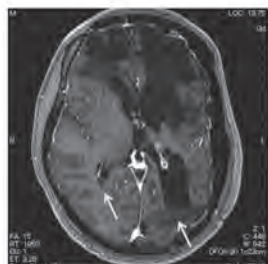


図2-B: Gd造影T1強調画像

黄色矢印: 両側側脳室後角に fluid level を認めた

髄液検査

外観はやや黄色混濁、初圧は 22cm H₂O。髄液糖 < 10 (正常 45-80) mg/dL、髄液蛋白 > 400 (正常 ≤ 45) mg/dL、髄液細胞数 3,399 (正常 ≤ 5) / μL、髄液細胞比 (単球: 多核) 13% : 87%、グラム染色では、リンパ球優位の白血球増多を認めるも、菌体や貪食像は確認されなかった。

微生物学的検査

髄液所見から細菌性髄膜炎が疑われたが、血液培養、髄液培養は陰性であった。また、髄液迅速試験でインフルエンザ菌 b 型、肺炎球菌、大腸菌、B 群溶血連鎖球菌、髄膜炎菌、クリプトコックスは陰性だった (脳脊髄膜炎起炎菌莢膜多糖抗原キット、バイオ・ラッド ラボラトリーズ株式会社及びセロダイレクト ‘栄研’ クリプトコックス、栄研化学)。そのため、保存髄液より DNA 抽出し 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子解析を行ったところ¹⁾、原因菌として *H. influenzae* が同定された (基準株との一致率 99.8%)。本菌は、PCR 法により^{2,3)} 莢膜型は non-typable、β-ラクタマーゼ (TEM-1 型、ROB-1 型) は陰性であった。また、ペニシリン結合タンパク (PBP3) をコードする *ftsI* 遺伝子の DNA シークエンシングにより⁴⁾ 本菌の PBP3 の薬剤耐性に関与する部位にアミノ酸置換 (Met377Ile, Ser385Thr, Leu389Phe,

Asn526 Lys) が認められた。

診断

上記より、本症例は non-typable BLNAR *H. influenzae* による細菌性髄膜炎との診断に至った。

治療経過

デキサメサゾン 3.3mg 静注後にセフトリアキソン (CTRX) 2g × 2/日、バンコマイシン (VCM) 1g × 2回/日、アンピシリン (ABPC) 2g × 4回/日の投与を開始した。11 日目に *H. influenzae* が同定されたため、CTRX 単剤とし、合計 14 日間治療継続した。14 日目の髄液検査では髄液細胞数は 46 / μL と著明な減少を確認した。また、MRI 所見、CT での副鼻腔炎所見も改善した。後遺症無く 40 日目にリハビリ病院へ転院となった。

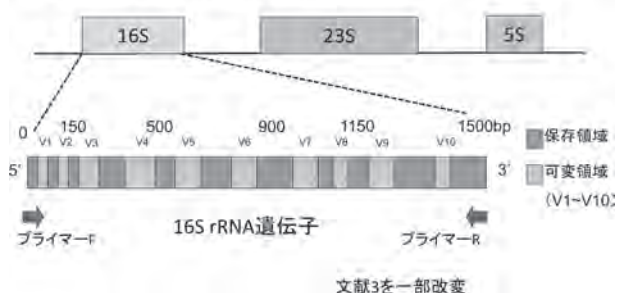
考察

本症例は上顎洞中心の副鼻腔炎で、頭蓋骨の術後で骨構造が粗な部分から炎症が波及し髄膜炎をきたしたものと考えられた。

本症例では、髄液のグラム染色、血液培養、髄液培養、髄液迅速試験のいずれにおいても原因菌を推定し得る情報が得られなかった。髄液迅速試験に *H. influenzae* は含まれていたが、b 型の莢膜を持つ株 (Hib) のみしか検出することができないため、non-typable 株が原因であった本症例では検出することができなかった。今回は、16S rRNA 遺伝子解析により *H. influenzae* を同定した。16S rRNA 遺伝子とは、細菌が共通にもつ約 1,500bp の領域で、保存領域と可変領域からなる (図 3)。

図3 16S ribosomal RNA遺伝子配列について

細菌性のリボソームRNAの構成



この領域をユニバーサルプライマーを用いて PCR 法で増幅し、特異的な可変領域の塩基配列から菌種を決定することが可能である。本法の利点は、組織検体から直接 DNA 抽出可能であること、抗菌薬投与後でも同手法可能であることなどである。欠点としては、遺伝子配列が類似する菌の識別は困難であること、複数菌が混在する場合同定困難であることなどである³⁾。本症例は、原因菌不明の治療として、CTRX, VCM, ABPC の 3 剤併用で治療を開始した。*H. influenzae* が同定されて以降は、CTRX 単剤で治療を行うことが可能となったため、本手法は治療上大変有用であった。

H. influenzae の主な薬剤耐性機序は、1) β -ラクタマーゼ産生、2) PBP3 のアミノ酸置換の 2 つによる⁴⁾。今回検出された株は、*H. influenzae* が産生し得る TEM-1 型、ROB-1 型 β -ラクタマーゼは共に陰性であった³⁾。後者 2) の耐性機序により、BLNAR 株となる。*H. influenzae* の PBP3 は *ftsI* 遺伝子によりコードされており、PBP3 の中でも、Arg517His または Asn526Lys に加えて Met377Ile, Ser385Thr, Leu389Phe の置換を持つ株では、より高度のアンピシリン耐性を示すとされている⁴⁾。欧米諸国に比し、本邦ではより高度耐性を示すアミノ酸置換を有する株が多くを占めている⁵⁻⁷⁾。本症例で検出された株も、高度耐性を示すアミノ酸置換パターンを示していた。

H. influenzae は、莢膜のタイプにより a ~ f および non-typable *H. influenzae* (NTHi) に分けられる。Hib は侵襲性 *H. influenzae* 感染症の主な原因となる。すでに Hib ワクチンが導入されている欧米諸国では、ワクチン導入後侵襲性 *H. influenzae* 感染症例は激減している一方で、Hib 以外の莢膜型と NTHi が侵襲性 *H. influenzae* 感染症の主体となってきている^{5,8)}。我が国では、2013 年 4 月の予防接種法の改正に伴い Hib ワクチンは定期接種になった。Hib ワクチン導入後、本邦においても諸外国と同様に Hib 以外の莢膜型と NTHi による侵襲性 *H. influenzae* 感染症が増加していくとすると、諸外国に比べ高度耐性 BLNAR 株が多くを占める本邦では、侵襲性感染症において耐性株の占める割合が増加し、治療に難渋する可能性も懸念される。実際に本症例は、

高度耐性 BLNAR と思われる NTHi を原因とする髄膜炎症例であった。2013 年 4 月から侵襲性 *H. influenzae* 感染症は成人も含め、感染症法の 5 類感染症として、届出が必要な疾患となった。今後、侵襲性 *H. influenzae* 感染症について、莢膜型は勿論のこと、薬剤感受性を含めたさらなる動向調査が必要である。

まとめ

培養陰性の細菌性髄膜炎症例ににおいて 16S rRNA 遺伝子解析は有用であった。近年 Hib ワクチン導入に伴い、NTHi による侵襲性感染症の割合が増加傾向にあり、今後の動向に注目が必要である。

参考文献

1. 大楠清文、江崎孝行. 感染症診断における遺伝子解析技術の応用. 日本臨床微生物学会誌 2008; 18: 1-14.
2. Falla TJ, Crook DW, Brophy LN, Maskell D, Kroll JS, Moxon ER. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol. 1994; 32:2382-6.
3. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, Appelbaum PC, Sunakawa K, Ubukata K: Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. Microb Drug Resist 2003; 9:39-46.
4. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:1693-1699
5. 角田 梨紗子, 小澤 大樹, 中野 竜一, 矢野 寿一. 【小児感染症 2015- 小児感染症のマネージメント -】 小児で注意すべき耐性菌 β -ラク

- タマーゼ非産生アンピシリン耐性 (BLNAR) インフルエンザ菌. 小児科臨床 2015; 68: 2597-2603.
6. Kakuta R, Yano H, Hidaka H, Kanamori H, Endo S, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Ozawa D, Inomata S, Tanouchi A, Kaku M, Katori Y. Molecular Epidemiology of Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* Causing Acute Otitis Media in Japanese Infants and Young Children. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35:501-6.
7. Dabernat H, Delmas C: Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001-2008: a retrospective database analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 2745-2753.
8. Wang S, Tafalla M, Hanssens L, Dolhain J. A review of *Haemophilus influenzae* disease in Europe from 2000-2014: challenges, successes and the contribution of hexavalent combination vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2017;16:1095-1105.

ヒトの咽頭における味覚認知

西井智子、任 智美、阪上雅史

兵庫医科大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科

はじめに

味覚情報は口腔に入れた飲食物を体内に摂り入れてよいかどうかを判断するために重要である。口腔支配の味覚神経における味覚機能の役割については多くの研究がなされているが、咽頭・喉頭部の味覚機能についての報告は少ない。ハムスター・ラットにおける味覚神経応答特性¹⁾では、口腔側の味覚を支配する鼓索神経、舌咽神経舌枝および大錐体神経は4基本味刺激によく応答するが、咽頭・喉頭部支配の舌咽神経咽頭枝や上喉頭神経は甘味刺激、塩味刺激、苦味刺激に対する応答は小さく、酸味刺激に対する応答が大きい。また、口腔側にはみられない水に対する神経応答が特徴的である。ヒトで舌側への水刺激は嚥下を誘発しないが咽頭への水刺激は嚥下を誘発する^{2, 3)}。このように、口腔側からの感覚入力と咽頭・喉頭部からの感覚入力は異なっている。味覚受容器である味蕾は口腔内ばかりでなく、咽頭・喉頭部にも存在する。その中でも喉頭内に最も多いとされる。また、上咽頭にも存在することから、咽頭・喉頭部の味蕾は味覚機能の役割は持たず、気道保護に関わるとされている⁴⁾。さらに、咽頭・喉頭部支配の神経は、生体が生きていくために必要な自律機能（気道防御、嚥下反射、体液調節、心血管応答）に関与するとされ、茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭の味蕾支配の神経は心血管応答に関与しないという¹⁾。このように、味蕾の役割、神経応答の特性、自律機能の違いから、口腔と咽頭・喉頭を支配する感覚神経は生理機能が異なっている。しかし、ヒトにおいて咽頭・喉頭部が味覚認知に関わるかどうかは未だ不明である。

今回、ヒトの咽頭部における味の知覚を味の認

知が明確である舌後方部と比較したので報告する。

対象・方法

健常成人10人(男性7人、女性3人、平均28.4歳)を対象に、座位の姿勢で外径1 mmのシリコンチューブを口腔から挿入し、水と5基本味溶液を舌後方部あるいは下咽頭部へ0.1 ml注入し、認知された味と知覚された強さをVisual Analogue Scale (VAS)で回答させた。そこで、被験者には[甘味、塩味、酸味、苦味、うま味、不特定、無味]の中から認知した味を選択してもらった。続いて知覚された強さ[VAS 0(無味)~10(想像できる最も濃い味)]を回答してもらった。刺激溶液として蒸留水、0.3 M ショ糖(甘味)、0.3 M NaCl(塩味)、0.04 M 酒石酸塩(酸味)、0.5 mM 塩酸キニーネ(苦味)、0.15 M グルタミン酸ナトリウム(うま味)溶液を使用した。挿入したチューブの先端が下顎切歯から7cmはその先端が舌後方部に位置し、下顎切歯から12 cmはその先端が下咽頭部に位置した。刺激溶液の注入の順序はランダムに行った。味蕾は舌後方部では有郭乳頭の溝に面して並んでいるので注入液を溝に入れ込むためには、注入直後に被験者に嚥下するように求めてから判定を行った。下咽頭部では、注入後そのまま判定し、判定後直ぐにその溶液を嚥下した後でもう一度判定を行った。この嚥下により、溶液は咽頭粘膜へ広がり、刺激面積は大きくなると考えた。咽頭では乳頭はなく味蕾は上皮組織に散在するので、刺激溶液は容易に味蕾に達することができる。そこで、嚥下後の判定部位は咽頭部とし、下咽頭の判定部位とは区別した。

結果

水あるいは5基本味溶液の注入により、咳反射は起こらなかった。認知された味を舌後方部、下咽頭部、咽頭部で比較した結果を図1に示す。水は刺激部位に関わらず、ほぼ無味が選択された。5基本味に関しては、舌後方部での正答例が0.3 M ショ糖 10 例 (100 %)、0.3 M NaCl が 9 例 (90%)、0.04 M 酒石酸塩が 10 例 (100 %)、0.5 mM 塩酸キニーネが 10 例 (100 %)、0.15 M グルタミン酸ナトリウムが 8 例 (80 %) で、ほとんどの被験者がどの味も正しく認知した。これに対し、下咽頭部での正答例は、0.04 M 酒石酸塩が 1 例 (10 %) のみで、ほとんどの被験者は不特定または無味を選択した。下咽頭部注入液の嚥下後の判定 (図1の咽頭部) で、正答例は0.3 M ショ糖が 0 例 (0 %)、0.3 M NaCl が 0 例 (0%)、0.04 M 酒石酸塩が 4 例 (40 %)、0.5 mM 塩酸キニーネが 1 例 (10 %)、0.15 M グルタミン酸ナトリウムが 0 例 (0 %) であり、被験者の多くは不特定または無味の判定であった。次に刺激溶液に対して、認知とは関係なく知覚された強さを図2に示す。水のVAS値は舌後方部0.7

± 0.37、下咽頭部 0、咽頭部 0.1 ± 0.11 で部位毎による有意差はみられなかった。一方5基本味溶液に関しては、0.3 M ショ糖では舌後方部 5.3 ± 0.67、下咽頭部 0.8 ± 0.32、咽頭部 1.9 ± 0.35、0.3 M NaClでは舌後方部 5.3 ± 0.75、下咽頭部 0.4 ± 0.17、咽頭部 0.7 ± 0.34、0.04 M 酒石酸塩では舌後方部 7.0 ± 0.42、下咽頭部 0.6 ± 0.24、咽頭部 1.5 ± 0.44、0.5 mM 塩酸キニーネでは舌後方部 6.8 ± 0.55、下咽頭部 0.6 ± 0.24、咽頭部 1.4 ± 0.47、0.15 M グルタミン酸ナトリウムでは舌後方部 5.1 ± 0.59、下咽頭部 0.3 ± 0.24、咽頭部 0.5 ± 0.17 であり、下咽頭部と咽頭部は舌後方部に比べると全ての味質において有意にVAS値は低かった ($P < 0.05$: Wilcoxon 検定、Bonferroni 補正)。

考察

本実験では刺激溶液を下咽頭部へ注入中、あるいはその刺激液を嚥下時に、咳反射が起こらなかったため、注入液が喉頭内に侵入することは無かったと考える。従って、本実験で下咽頭部および咽頭部から得られた結果は咽頭粘膜刺激の結果を示す。

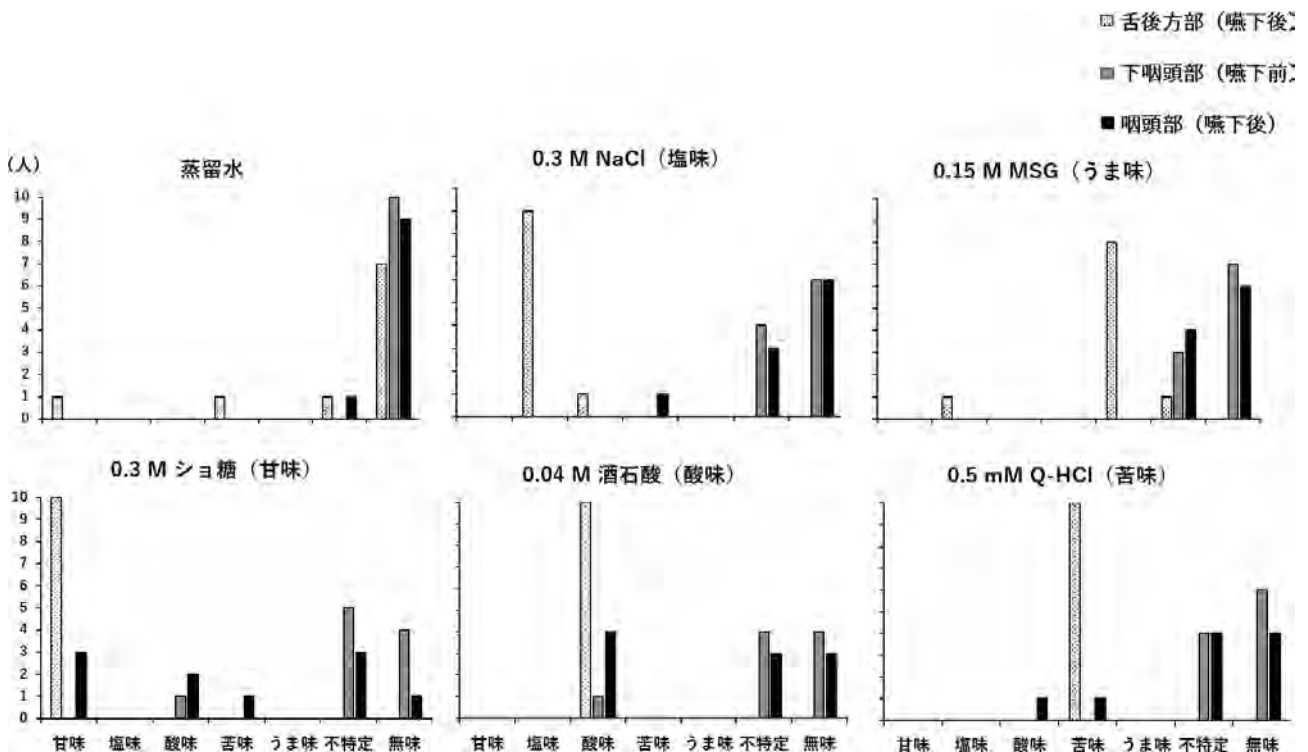


図1. 舌後方部、下咽頭部および咽頭部における味の認知性の比較

味の認知テストは以下の作業後に被験者に回答してもらった。即ち、舌後方部は刺激溶液注入後に嚥下、下咽頭部は刺激溶液注入直後（嚥下前）、咽頭部は下咽頭部に刺激溶液注入後に嚥下してから認知テストを行った。詳しくは本文参照。刺激溶液の注入の順序はランダムに行った。水はどの部位でもほとんどの被験者が無味を選択した。舌後方部ではどの味質もほとんどの被験者が正しい味質を選択したが、下咽頭部および咽頭部では多くの被験者が不特定または無味を選択した。

我々は水を飲んでも特別な味を感じない。しかし、ヒトの嚥下実験から、咽頭には水に興奮する神経線維が存在することが証明されている³⁾。本実験により水は無味で、知覚の強さは0であることが確認された。このことは咽頭部の感覚神経が興奮しても知覚が生じ難いことを示す。

咽喉頭部の味蕾は、咽頭部では少なく自由神経終末も多いことから、刺激溶液は味蕾と自由神経終末の両方が上喉頭神経の化学応答に関与している可能性がある¹⁾。

本研究で得られた結果から、舌後方部では注入液の味質が正しく認知されるのに対して、咽頭部では呈示された味溶液の味質は正しく認知されず、不特定や無味が多かった。また、知覚された強さは舌後方部と比較すると有意に小さく、顕著な差があった。咽頭部に呈示された味覚刺激は、味質およびその強さとも脳で認知され難いことが分かった。

咽頭部（嚥下後）は知覚された強さが下咽頭部（嚥下前）より増加した。また、咽頭部は味の認知性の回答が僅かではあるが不特定や無味の選定例が減少し、正しい味質あるいは異なる味質を選んだ例が高くなった（図1）。これは嚥下により刺激面積が広がることで知覚の強さが増し、味の認知の判断を促したと考えられる。特に咽頭部での酸刺激では認知の正答が40%になり、酸以外の異なる味質は選ばれなかった。しかし、この場合

も、かなりの被験者は不特定と無味の判定であった。酸味は他の味質よりも刺激性を有するので、明確に酸味を感じてなくとも酸味を選んだことが考えられる。

食塊が咽頭・喉頭部を通過する時に上喉頭神経は化学感覚情報を中枢に伝える。しかし、本実験結果は咽頭部では味覚は認知されないことを示した。上喉頭神経が水に応答しても、無味と感じるように、咽頭・喉頭部では味の知覚は起こらない。しかし、ここでの感覚情報は嚥下誘発を含め自律的な機能に役立っているものと思われる。

文献

- 1) 花森隆充：咽頭・喉頭の味覚．日本味と匂学会誌 1996;3:13-21.
- 2) 北田泰之：口腔および咽頭・喉頭の感覚と嚥下誘発—おいしさの科学とビジネス展開の最前線．都甲潔，柏柳誠 編，シーエムシー出版；2017:27-43 頁．
- 3) Kitada Y., Yahagi R., Okuda-Akabane K. : Effect of stimulation of the laryngopharynx with water and salt solutions: Characteristics of water receptors in the laryngopharyngeal mucosa. Chem. Senses 2010; 35:743-749.
- 4) Travers S.P., Nicklas K. : Taste bud distribution in the rat pharynx and larynx. Anat. Rec. 1990;227:73-79.

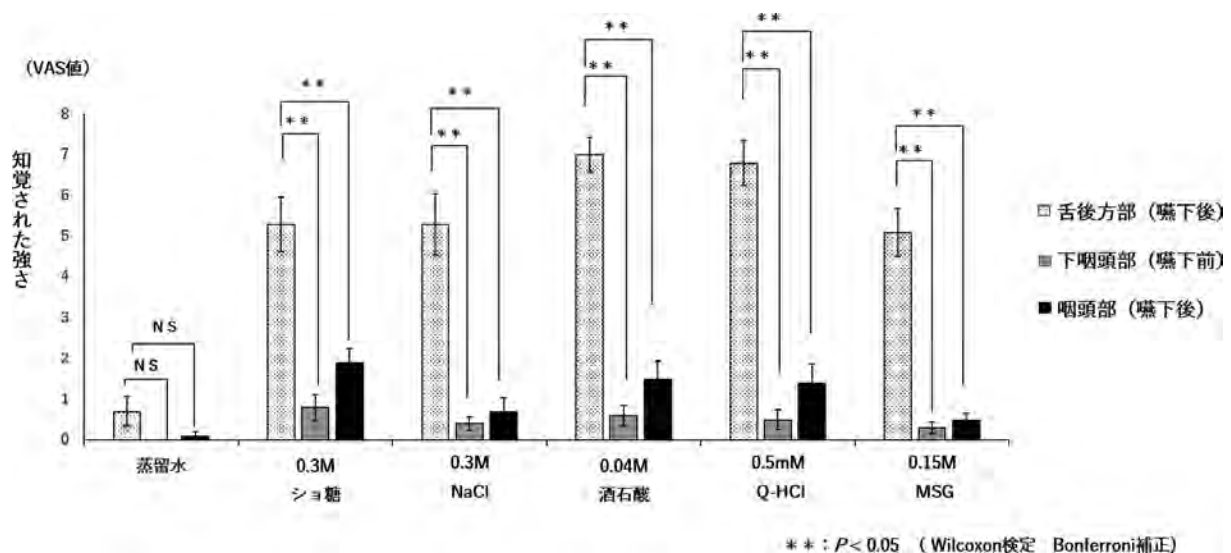


図2. 舌後方部、下咽頭部および咽頭部における知覚された強さの比較

用いた味覚刺激液で知覚された強さは舌後方部と比較すると下咽頭部および咽頭部は有意に小さかった。咽頭部の刺激溶液の注入の順序はランダムに行った。



hhe
human health care

患者様の想いを見つめて、 薬は生まれる。

顕微鏡を覗く日も、薬をお届けする日も、見つめています。
病気とたたかう人の、言葉にできない痛みや不安。生きることへの希望。
私たちは、医師のように普段からお会いすることはできませんが、
そのぶん、患者様の想いにまっすぐ向き合っていたいと思います。
治療を続けるその人を、勇気づける存在であるために。
病気を見つめるだけではなく、想いを見つめて、薬は生まれる。
「ヒューマン・ヘルスケア」。それが、私たちの原点です。

ヒューマン・ヘルスケア企業 エーザイ



AFUTUREFREEOFLP
Global Logo

エーザイはWHOのリンパ系フィラリア病制圧活動を支援しています。

たった一度の
いのちと
歩く。

協和発酵キリン株式会社
<http://www.kyowa-kirin.co.jp>

私たちの志

ここに在る責任と幸福。

私たちの志は、いつもおかげの恵みの中にあり、
世の中に在るべきものと信じています。そして、
私たちが、この世に在るべきものと信じています。

そのために、私たちが努力を怠りません。

自分たちを信じよう。自分たちの力を、自分たちの

志にまっすぐ向き合おう。どこにも平等な心で、

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

世界を創ろう。そして、世界を創ろう。

KYOWA KIRIN

私たちの志

検索

2015年12月作成



代謝賦活剤・抗めまい剤

薬価基準収載

アデホス^{コーワ}顆粒10%

ADETPHOS^{KOWA} GRANULE 10%

(ATP顆粒剤)

効能・効果、用法・用量、使用上の注意については
添付文書をご参照ください。



製造販売元(資料請求先)

興和株式会社

東京都中央区日本橋本町三丁目4-14

販売元

興和創薬株式会社

東京都中央区日本橋本町三丁目4-14

2018年2月作成

減感作療法薬(アレルギー免疫療法薬)

アシテア[®]ダニ舌下錠

100単位(IR)/300単位(IR)

Actair 処方箋医薬品^(注1)

(注1) 注意—医師等の処方箋により使用すること

薬価基準収載

「効能・効果」、「用法・用量」、「警告・禁忌を含む使用上の注意」等
については添付文書をご参照ください。

®: 登録商標

提携

STALLERGENES GREER

製造販売元【資料請求先】

シオノギ製薬

大阪市中央区道修町3-1-8
医薬情報センター ☎0120-956-734

ACT-KO-0001 (V01) 審302175 2016年12月作成

Hisamitsu®



経皮吸収型 アレルギー性鼻炎治療剤
処方箋医薬品[※] 注) 注意—医師等の処方箋により使用すること

[薬価基準収載]

アレサガテープ 4mg
8mg
ALLESAGA® TAPE エメダスチンフマル酸塩経皮吸収型製剤

新発売

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等については、添付文書をご参照ください。

製造販売元: **久光製薬株式会社**
〒841-0017 鳥栖市田代大官町408番地

資料請求先: 久光製薬株式会社 学術部 お客様相談室
〒100-6330 東京都千代田区丸の内二丁目4番1号
フリーダイヤル 0120-381332 FAX: (03) 5293-1723
受付時間 / 9:00-17:50 (土日・祝日・会社休日を除く)

2018年3月作成



アレルギー性疾患治療剤
処方箋医薬品 (注意—医師等の処方箋により使用すること) **薬価基準収載**

B ビラノア錠 20mg
Bilanoa® tablet 20mg ビラスチン錠

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等については添付文書をご参照ください。

製造販売元 **TAIHO** 大鵬薬品工業株式会社
資料請求先 (医薬品情報課) 〒101-8444 東京都千代田区神田錦町1-27
TEL.0120-20-4527 <https://www.taiho.co.jp/>

提携先 **FAES FARMA** スペイン

2017年11月作成

明日をもっとすこやかに
meiji



アレルギー性疾患治療剤
処方箋医薬品 (注意—医師等の処方箋により使用すること) 薬価基準収載

B ビラノア錠 20mg
Bilanoa® tablet 20mg ビラスチン錠

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等については添付文書をご参照ください。

販売元
Meiji Seika ファルマ株式会社
東京都中央区京橋 2-4-16
<http://www.meiji-seika-pharma.co.jp/>

製造販売元
大鵬薬品工業株式会社
東京都千代田区神田錦町1-27

提携先  **FAES FARMA** スペイン

作成：2018.1



生きる喜びを、もっと
Do more, feel better, live longer.

GSKは、より多くの人々に
「生きる喜びを、もっと」を届けることを
存在意義とする科学に根差した
グローバルヘルスケアカンパニーです。

<http://jp.gsk.com>

グラクソ・スミスクライン株式会社

制作実績

奈良県立医科大学
耳鼻咽喉・頭頸部外科学 様



スマートフォン対応は お済みですか？

全アクセスの半分以上がスマートフォンからのアクセスと言われる時代。
患者様、医大生にむけ、よりアクセスしやすく見やすいホームページを！

お問い合わせは

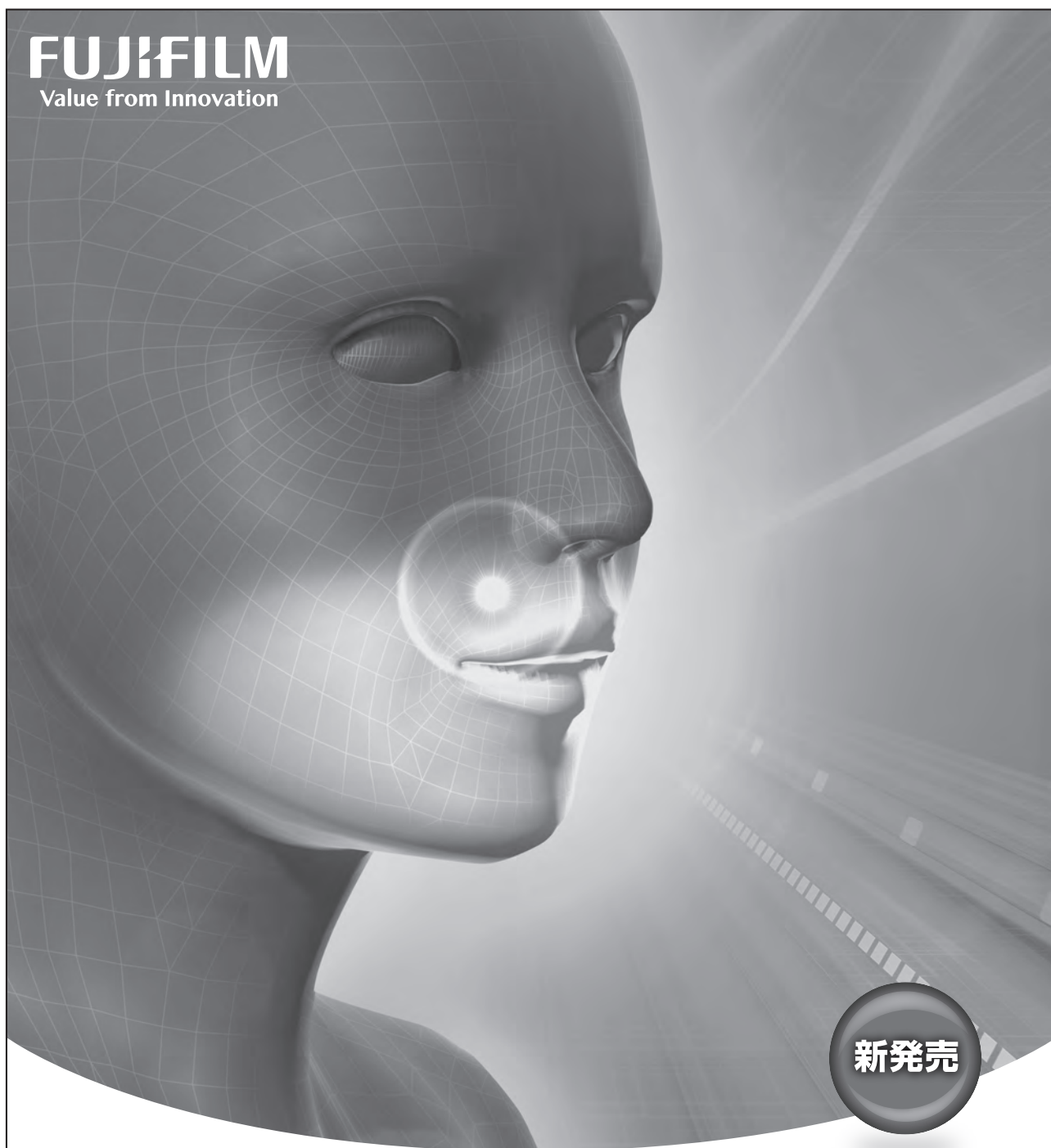
tel. 06-6443-2122 <https://www.ryu-raku.co.jp/contact/>



有限会社 流楽 〒550-0006 大阪市西区江之子島1-7-3 奥内阿波座駅前ビル607



FUJIFILM
Value from Innovation



新発売



口腔粘膜付着型 口腔咽頭カンジダ症治療剤

薬価基準収載

ORA VI オラビ[®]錠口腔用50mg

ORA VI[®] Mucoadhesive Tablets 50mg ミコナゾール付着錠

処方箋医薬品^{注)}

注) 注意-医師等の処方箋により使用すること

「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌を含む使用上の注意」等につきましては、添付文書をご参照ください。

販売元

富士フイルム 富山化学株式会社

資料請求先：〒104-0031 東京都中央区京橋 2-14-1 兼松ビル
ホームページ：http://ftc.fujifilm.co.jp/

TEL03(5250)2620

製造販売元

株式会社そーせい

東京都千代田区麹町二丁目1番地

2019年2月作成

MakiChié

よろこびと。
笑顔と。
補聴器と。

ADRO[®]搭載機器なら、より自然に近い音



ADRO[®] (アドロ) は人工内耳、補聴器に搭載されている音声最適化機能です。音環境の変化に応じて聞きやすい音量に自動的に調整することで自然に近い音を実現できるよう設計されています。

Adaptive Dynamic Range Optimization

ADRO[®] | アドロ

マキチエ株式会社

〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-2-3 営業時間：平日 9：00 ～ 17：00(土日祝日を除く)
お問い合わせ 03-3277-2544 ホームページ <http://makichie.co.jp>

令和元年5月

発行

〒573-1010 大阪府枚方市新町二丁目五番一号

関西医科大学 耳鼻咽喉科・頭頸部外科教室内

耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会

TEL 072-804-0101

FAX 072-804-2069

発行者

岩井 大

印刷所

水三島紙工株式会社

〒536-0006 大阪市城東区野江 1-16-4

TEL 06-6932-1261

FAX 06-6935-2055