

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤（C）

研究期間：平成 21 年 4 月～平成 24 年 3 月

課題番号：21592162

研究課題名（和文） サイトメガロウイルスによる聴覚障害メカニズムの解明

研究課題名（英文） Cytomegalovirus-induced sensorineural hearing loss in murine model

研究代表者

公立大学法人福島県立医科大学 医学部・准教授 小川 洋(OGAWA HIROSHI)

研究者番号：70264554

研究成果の概要（和文）：

サイトメガロウイルスによる聴力障害は、先天性聴覚障害をきたす原因として難聴遺伝子変異に伴う聴覚障害について頻度が高い。欧米ではサイトメガロウイルスによる胎内感染、それに伴う感染症は克服すべき疾患として注目を浴びている。ウイルス感染によって聴覚障害をきたすためにその発症メカニズムを解明することはサイトメガロウイルス難聴の発症を予防するもしくは治療戦略を構築する上で不可欠である。ヒトの場合、胎内でサイトメガロウイルスに感染すると 10%程度に聴力障害をきたすことが疫学的な調査から解明された。われわれはマウスを用いた実験系でほぼ確実に聴覚障害を生じるモデルの作製に成功し、さらに動物実験モデルにおいて免疫染色によりウイルスの局在性を調べることに成功した。ウイルス抗原陽性部位はラセン神経節であったが、聴力悪化が認められた脳内接種を受けたマウスの蝸牛においてウイルス接種 2 週以降では今回の染色法では感染陽性細胞が確認されなかった。光学顕微鏡レベルでは細胞の著しい破壊は確認されなかった。感染陽性細胞が免疫染色で確認されないにもかかわらず、聴力障害が進行することに関して研究を進めるためにレーザーマイクロダイセクションの手法を導入し、直接感染モデルの側頭骨からそれぞれの解剖学的な区域から微小材料を採取し、直接サイトメガロウイルスの DNA を評価することを試みたが、本方法によりサイトメガロウイルスの局在を明らかにすることはできなかった。

研究成果の概要（英文）：

Congenital cytomegalovirus (CMV) infection is the leading of sensorineural hearing loss (SNHL) in children. While the importance of CMV-induced SNHL has been described, the mechanisms surrounding its pathogenesis and the role of inflammatory responses remain unclear. This study presents a neonatal mouse model of profound SNHL caused by directly injecting the virus into cerebral ventricles. Infected cells were detected in the spiral ganglion neurons in immunostain. But after 2 weeks the infected cells were not detected in the infected mice. No significant inflammatory changes in the cochleae of the mice were observed under the light microscope analysis. The question remains why the CMV-related hearing loss is progressive in this murine model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			

年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：ウイルス難聴、先天性難聴、難聴モデル、マウスサイトメガロウイルス

1. 研究開始当初の背景

先天性の高度感音難聴は 1000 人に一人生まれるとされる頻度の高い病態である。ある報告によれば両側高度感音難聴者のおよそ 50%は難聴遺伝子が関与しているといわれている。一方われわれが研究を進めてきた先天性サイトメガロウイルス感染による難聴は、両側高度感音難聴患者のおよそ 20%程度に関与してことがわかってきた。ウイルス感染により聴覚障害が引き起こされることは多くの研究者により報告がなされてきた。しかし、内耳にウイルスが感染することにより聴覚障害が引き起こされることはわかっていたが、内耳にウイルスが存在しているからといって必ずしも聴覚障害をきたすわけではないことも報告されてきた。聴覚障害をきたすウイルスの中でも、サイトメガロウイルスは先天感染により聴力障害をきたす最も頻度の高いウイルスであり、国内外において、モルモットやマウスを使った聴覚障害モデルの研究がなされてきた。しかし、これらの動物モデルにおいて、聴力評価を行うことができたものであっても内耳にサイトメガロウイルスが感染していても、100%聴覚障害をきたす訳ではなく、報告によっては内耳に感染しても聴覚障害をきたさなかったという報告もなされている。欧米の報告において、先天性サイトメガロウイルスに感染した患者における聴覚障害をきたす頻度は顕性感染においておよそ 40%、不顕性感染のおよそ 10%とされている。ウイルスによる難聴は遺伝子による難聴と異なり、病態の解明が進むことにより、その発症を抑えることが可能と考えられる。従って、サイトメガロウイルスが感染した動物実験モデルで、聴覚障害を生じた例と生じなかった例において組織学、機能的解析を行うことは、聴覚障害の発症機序の解明となり、予後診断の開発、治療法の開発に向けて大きな一歩を踏み出すことになる。

2. 研究の目的

サイトメガロウイルスに感染させ、確実に聴力障害を生じさせたマウスにおける蝸牛、聴神経、脳幹を含む連続標本を作成し、免疫組織学的手法によりサイトメガロウイルスの局在を明らかにすること、および組織の形態学的変化を明らかにすること。

3. 研究の方法

①マウスにおけるサイトメガロウイルス感染モデルの作成：出生後直ちに脳内にサイトメガロウイルスを接種し、サイトメガロウイルス脳内接種モデルを作成する。また腹腔内にサイトメガロウイルスを接種し、腹腔内接種モデルを作成する。

②ABR による聴覚評価：これらの動物モデルは脳波聴力検査により聴力の評価を行う。動物に対して、ジエチルエーテルで吸入麻酔後、フェントバルビタール（商品名：ネンブタール）を 30mg/kg で腹腔内投与し電極を刺入し、音刺激を与え、ABR を測定する。

③病理組織学的評価：それぞれのモデルにおいて接種後 2W, 4W, 6W の状態において断頭し、側頭骨標本（連続切片標本）を作製。免疫組織学的手法を用いてウイルスの局在を明らかにする。

4. 研究成果

マウス CMV ウイルス (MCMV) を、生後 24 時間以内のマウス (Balb/c) へ脳内接種した。陰性対照としてウイルスを腹腔内接種、または PBS を脳内接種した。それぞれのマウスの聴力検査を ABR 検査により施行した。ウイルス接種マウスは還流固定・脱灰・ホルマリン固定・薄切を行った。マウス脳内、蝸牛内における MCMV 抗原陽性部位の同定は、MCMV IE3 に対する特異的抗体を用いた染色により行った。約半数のマウスが死滅するウイルス量の脳内接種により、接種 3 週間後では 1/3 に片側難聴、1/3 に両側難聴をきたした。難聴は時間経過とともに進行し、6 週間までには全例に両側難聴が認められた。ウイルス抗原は接種 1 週間後でラセン神経節に認められたが 2 週以降は認められなかった。陰性対照群では、6 週目において腹腔内ウイルス接種では 23 匹中 1 匹に両側難聴が認められたが、PBS を脳内投与した例では 6 匹全例において難聴は認められなかった。MCMV を生後 24 時間以内のマウスへ脳内接種することにより、全例で難聴が引き起こされることが確認できた。MCMV の腹腔内接種や PBS の脳内接種では難聴は引き起こされず、本実験での難聴は MCMV によるものと考えられる。ウイルス抗原陽性部位はラセン神経節であったが、ウイルス接種 2 週以降では認められなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計5件)

1)小川 洋, 先天性サイトメガロウイルスと聴覚障害, 日本耳鼻咽喉科学会誌,112,2009,814-817

2)小川洋, 馬場陽子, 山田奈保子, 鈴木雪恵, 松井隆道, 野本美香, 小針香菜, 鈴木綾, 村岡理恵, 佐場野優一, 大森孝一, 【重複障害のある難聴児への聴覚言語獲得支援】 障害の評価と補聴器・人工内耳の適応, 音声言語医学,51(2),2010,199-202

3)小川洋, 生田和史, 岡野渉, 他サイトメガロウイルスによる聴覚障害動物モデルの作製, 頭頸部自律神経 25, 2011, 17-19

4)小川 洋, 病原体をマスターする ウイルス感染症 サイトメガロウイルス, 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 83, 2011, 159-164

5)小川 洋, サイトメガロウイルス感染症とサイトメガロウイルスワクチン, 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 84, 2012, 137-142

〔学会発表〕(計5件)

1)小川 洋, 人工内耳手術時得られた外リンパ液におけるサイトメガロウイルスの存在について, 第19回日本耳科学会, 平成21年10月9日

2)生田 和史, サイトメガロウイルス感染モデルマウスを用いた聴覚障害の解析, 第57回日本ウイルス学会学術集会, 平成21年10月26日

3)小川 洋, サイトメガロウイルス(CMV)による聴覚障害発症機序について, 第111回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会, 平成22年5月20日

4)Hiroshi Ogawa, Takamichi Matsui, Yoko Baba, Tatsuo Suzutani, Koichi Omori, Detection of Cytomegalovirus DNA in the perilymphatic Fluid, Sixth Internal Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010/11/6

5)Hiroshi Ogawa, Takamichi Matsui, Tetsuo Suzutani, Koichi Omori, Quantitative analysis of cytomegalovirus DNA in the perilymphatic fluid, 11th Japan-Taiwan conference on Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 2011/12/8

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

なし

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 洋(福島県立医科大学医学部・准教授)

研究者番号: 70264554

(2)研究分担者

(3)連携研究者

錫谷達夫(福島県立医科大学医学部・教授)

研究者番号: 40196895

松井隆道(福島県立医科大学医学部・助教)

研究者番号: 40404876

生田和史(福島県立医科大学医学部・教授)

研究者番号: 60512184

