

※ 4.

メニエール病患者における VEMP の検討

(耳鼻咽喉科学)

○鈴木 伸弘, 市村 彰英, 竹之内 剛,
鈴木 衛

1992年にオーストラリアの Colebatch と Halmagyi によって、音刺激により頸筋に誘発される反応が報告された。この反応は vestibular evoked myogenic potentials (以下 VEMP) と名付けられ、様々な臨床研究や基礎研究により球形囊斑—前庭脊髄路系の活動を反映していることが明らかになってきている。今回、我々はこの VEMP をメニエール病患者に施行し、同検査がメニエール病の予後や病勢の判定因子となりうるかを検討した。

【結果、考察】メニエール病の本態である内リンパ水腫については未だ不明の点が多く残されているが、形態学的には Pars inferior 由来の蝸牛と球形囊斑に多く見られるとされている。今回はメニエール病患者 15 人 16 耳に対して球形囊斑の機能を反映するとされる VEMP を施行したが、5 例に異常を認めた。異常 5 例中 3 例は罹病期間が 10 年以上と長く、めまい発作も最悪時には 1 か月に 1~2 回起こし、難聴も中等度以上に進行している症例であった。他の 2 例をみると、それぞれ罹病期間は 30 か月と 21 か月であったが、前者は難聴が 85 dB と進行していた。後者は 31.25 dB と難聴はそれほど進行していなかったが、両者とも何らかの蝸牛症状やめまい感を常に有する症例であった。ただ、再検を要すると思われたのは後者の年齢が 71 歳の高齢症例であり、記録された VEMP が疑陰性の可能性も考えられる。Colebatch らは被検者の胸鎖乳突筋の張力は VEMP 波形の振幅に影響を与えると報告している。我々は VEMP 正常を、明白な再現性のある 2 相性波と定義したので、筋力が低下している高齢者では、VEMP 疑陰性と判定してしまう危険性があることも否めない。この個々の筋力の違いや、神経伝達速度の違いによる VEMP 出現有無の判定は今後の検討課題となるであろう。一方、VEMP 正常 11 例の中に罹病期間が 10 年以上の症例が 2 例含まれていたが、これらの症例の聴力が 16.3 dB、36.3 dB と比較的保存されているのは注目すべき点と思われる。つまりメニエール病患者において、VEMP は罹病

期間が長く、めまい発作も頻回にあり、中等度以上に難聴が進行している重症例では異常を示す傾向が高く、一方で罹病期間が長くとも、聴力が比較的保存されているような症例では VEMP は正常であることより、VEMP は内リンパ水腫の病勢を反映している可能性がある。また、左右別々に検査を行えるという点で、現在臨床の場ではほぼ唯一の前庭機能検査であるカロリックテストとの関係を見ると、VEMP の結果との解離がみられた。このことは Murofushi らが前庭神経炎における VEMP 出現の有無はカロリックテストの結果に依存しないという報告と一致した。これは前者が上前庭神経由来の外側半規管、後者が下前庭神経由来の球形囊斑の機能検査であることを考えれば当然のことと思われる。今後両方の検査を行うことで聴神経腫瘍ばかりでなく、耳性めまい症の部位診断にも役立つものと期待される。

5.

ムンプスウイルスの細胞融合に関与する
遺伝子領域

(小児科)

○宇塚里奈, 高見 剛, 柏木保代, 河島尚志,
武隈孝治, 星加明德

【目的】ムンプスウイルスの細胞融合には、HN 蛋白と F 蛋白の共働作用が必要であることが知られている。細胞融合を修飾している遺伝子領域を知るために、星野ワクチン株 (KO-3) を HeLa 細胞で 18 代継代した 18HL、胚細胞で 6 代継代した 6CE、星野株ワクチン接種後の副反応例から分離された仙波株、二宮株を用い細胞融合能を観察した。

【方法】各株の F、HN 蛋白翻訳領域をそれぞれ PCR で増幅し、Blue script ベクターに挿入し、プラスミッドを構築。各遺伝子の塩基配列を決定した。細胞融合の有無は、T7RN Apolymerase 発現ワクシニアウイルス (vvTf7-3) を感染させた HeLa 細胞に、構築したプラスミッドを co-transfection させた後、ABC 染色を行い、観察した。

【結果】①各株から構築した HN 遺伝子では、KO-3 株と比較して 18HL 株で 1 カ所、6CE 株で 4 カ所のアミノ酸変異を認めた。仙波株、二宮株では変異は

認めなかった。②F遺伝子では、18HL株で1カ所、仙波株で1カ所、二宮株で6カ所、6CE株で4カ所の変異を認めた。③18HL-F、18HL-HN、二宮-F、6CE-HNのプラスミッドは、細胞融合誘導が認められなかった。④各株のアミノ酸変異を伴う領域をそれぞれ制限酵素を用いKO3-HN、KO3-Fと交換し、キメラプラスミッドを構築した。F領域ではAA41、90、159、175、217、266位に変異のあるものでは細胞融合が消失していた。HN領域ではAA78、477、521位に変異のあるものでは細胞融合が消失していた。

【考察】HeLa細胞におけるムンプスウイルスの細胞融合活性は、F領域AA41、90、159、175、217、266位とHN領域AA78、477、521位が重要であると考えられた。

6.

健常人血清による人免疫不全ウイルス抗原発現と宿主細胞内NF- κ B活性の抑制

(微生物学講座)

○平吹 登, ルナール純子, 水野文雄

人免疫不全ウイルス(HIV)感染CD4⁺T細胞がウイルス特有の細胞障害を免れて持続感染へ至る機序を探るため、我々はHIV感染細胞を取巻く環境因子—人血清(NHS)—に注目している。現在まで、*in vitro*の実験系で、NHS存在下では感染細胞の生残が容易である事を報告して来た。そして、HIV複製時におけるNHSの一作用として、ウイルス固有Tat-TAR遺伝子レスポンスを抑制する結果について先の本学会で示した。今回は、このTat-TARレスポンス以外に宿主細胞内転写制御因子・NF- κ B活性に対するNHSの作用を想定して実験した。

まず、HIV抗原発現状態をNHS添加と対照のFCS添加培養細胞で比較した。培養開始から7日を経過するとNHS添加も対照のFCS添加培養も共に蛍光抗体染色で100%の細胞がHIVの感染を受ける。しかし、一細胞当たりのウイルス抗原量をレーザーサイトメーターで調べると、NHS添加群にはかなりの減少を認めた。

続いて、このNHSによるHIV抗原発現の減少を、ウイルス複製と宿主細胞内NF- κ B活性の面から、

ウエスタンブロット法で検討した。

NHS添加培養細胞から調整した核タンパク中のNF- κ B量は、FCS添加培養細胞のそれより少なく、培養開始7日では明瞭な差となった。

また、HIV持続感性細胞中のNF- κ B活性も培養開始7日の細胞とほぼ同様に低かった。

NHSはウイルス側Tat-TARレスポンス、且つ宿主側NF- κ B関連転写活性などを修飾することで、HIV感染様式を急性に終演させないで持続感染型へと導くのかかもしれない。

※7.

第VIII因子A2ドメインにおけるミスセンス変異蛋白の解析

(臨床病理)

○天野景裕, 山中 晃, 福武勝幸

【目的】第VIII因子活性発現におけるA2ドメインの役割を明らかにするために、Cross reacting material (CRM)-positive血友病A患者にて報告されているA2ドメイン内のミスセンス変異第VIII因子の発現実験による検討を行った。

【方法および成績】野生株第VIII因子合成プラスミッドpMT2VIIIをtemplateとして5例のCRM-positive(R527W, S558F, I566T, V634A, V634M)と1例のCRM-reduced(Delta F652/3)の変異第VIII因子遺伝子を含むプラスミッドを作製した。プラスミッドをCOS細胞にトランスフェクションさせ60時間後に得た培養上清中の第VIII因子の特異活性は、各々、患者の報告例と同様であり、上記の1アミノ酸の変異が患者の血友病としての発現型の原因であることを確認した。³⁵S標識によるPulse-chase実験ではCRM-positive全例は野生株と同様の合成、分泌を認め、Delta F652/3では分泌低下と細胞内分解を認めた。分泌された変異第VIII因子のSDS-PAGE解析ではトロニン分解フラグメントはI566T以外は全て野生株と同様だったが、I566TのA2フラグメントは低易動度を示した。これはN-glycanaseによる正常化から、新たなN-linked glycosylation部位への糖鎖の附加によるものと考えられた。第VIII因子の活性化第IX因子(FIXa)との結合部位である558-565の合成ペプチドを各変異体