

含有する内耳障害治療剤

PCT/JP2005/006202

2005年（H17年）3月24日

発明者：藤岡正人、他4名

権利者：慶応大学・中外製薬

蝸牛感覚上皮細胞の再生メカニズムの解明

研究協力者	務台英樹	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員 長寿科学振興財団リサーチレジデント
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚平衡覚研究部長
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

当研究室において確立されたミトコンドリア毒 3NP 投与による急性難聴モデルの病態解析より、当難聴動物モデルにおいては、内耳感覚細胞も傷害されるため、この感覚細胞の再生の可能性にも興味をもたれた。生後1日から14日齢にかけて蝸牛上皮中の前駆細胞数が著しく低下することから、これと同時期に遺伝子転写が負に調節される遺伝子 Pou3f3/Brn1 を蝸牛上皮中に見出した。同遺伝子欠損動物の詳細な解析より、本遺伝子は感覚細胞へ分化転換能をもつ支持細胞特異的に発現しており、支持細胞機能との関連が示唆された。

A. 研究目的

本研究は、内耳幹細胞再生の分子機構の解明を目的とする。

哺乳類平衡覚上皮には潜在的な有毛細胞再生能力があることが近年判明した。騒音性難聴、薬剤性難聴における傷害からの回復には、蝸牛有毛細胞前駆細胞の存在が重要である。しかしこの再生能は生後発達に伴い消失する。本研究では、蝸牛内での有毛細胞前駆細胞の浮遊培養系の結果から、細胞増殖能低下に関連する候補遺伝子を探索し、その組織内分布と分子機能の解明を試みた。

B. 研究方法

蝸牛感覚上皮支持細胞特異的遺伝子の同定：遺伝子探索法は独自の方法を用いており、論文投稿準備中のため省略する。P1 から 14 日齢にかけ発現が低下する遺伝子として Pou3f3/Brn 1 を同定した。胎生 16 日より P14 までの内耳における遺伝子発現を、特異的抗体と細胞マーカーを共染色し解析した。また、野田グループ（理化学研究所・癌研究所）の作成した Pou3f3 欠損マウス内耳の形態と、E19 マウス蝸牛上皮を用いた幹細胞浮遊初代培養および細胞分化誘導実験も現在進行中である。

(倫理的面への配慮)

動物実験はヘルシンキ宣言、東京医療センター動物実験指針などを遵守し、動物愛護上の諸規定に十分配慮し行なった。

C. 研究結果

生後ラット蝸牛上皮中から神経増殖分化に重要と考えられる転写因子 Pou3f3 が発現していることを見出した。本遺伝子の哺乳類内耳での発現の報告は今までに知見がない。Pou3f3 遺伝子は生後発達と共に発現が減少していた。免疫組織学的解析により、Pou3f3 が間葉系細胞のほぼ全域で発現する一方、蝸牛上皮では支持細胞に局限していることも明らかにした。感覚上皮支持細胞は有毛細胞への再増殖および分化転換能をもつことが報告され、有毛細胞再生の標的として期待されている。現在本遺伝子欠損動物の表現型解析を進行中である。

D. 考察

POU ホメオボックスを持つ転写因子のうち、Pou3f4/Brn4, Pou4f3/Brn3.1 の二種類の難聴遺伝子としての報告がある。今回発見された Pou3f3 は、内耳に発現することが明らかになった第三の POU 遺伝子であり、有毛細胞再生の標的である支持細胞における分子機能の解明が強く期待される。現在投稿論文を執筆中である。

E. 結論

発達期ラット蝸牛から、支持細胞および間葉系細胞に局限して発現し、発達経時的に発現が減少する転写因子 Pou3f3 を同定した。Pou3f3 遺伝子が特異的に発現する蝸牛支持細胞は有毛細胞と共通の前駆細胞をもち有毛細胞への分化転換能をもつこと、生後 1 日齢から 14 日齢にかけて、蝸牛上皮細胞の増殖能が著しく低下することを合わせて考えると、興味深い。本遺伝子の機能解明により、聴覚感覚細胞再生治療に向けての手がかりが得られることが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

なし (現在 2 報執筆中)

2 学会発表

務台英樹、孫コウイ、藤井正人、松永達雄：蝸牛外側壁線維細胞の生後発達に伴うタイプ特異的マーカーの出現、第 51 回聴覚医学学会総会

務台英樹、藤井正人、松永達雄：転写因子 Pou3f3/Brn1 の内耳発達における発現解析、第 16 回日本耳科学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

急性内耳エネルギー不全におけるカスパーゼの役割と平衡障害の検討

研究協力者	水足邦雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長
分担研究者	小川 郁	慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授

研究要旨

急性内耳エネルギー不全モデルでのカスパーゼ阻害薬の難聴保護効果を明らかにし、同時に平衡障害の定量的評価と責任病巣の組織学的検討を行った。その結果、カスパーゼ阻害薬は急性内耳エネルギー不全モデルにおいて蝸牛外側壁を組織学的に保護し、さらに低音から中音域の難聴をほぼ完全に予防することができた。また同モデルでは眼振により観察可能な平衡障害を呈し、その平衡障害の責任病巣は感覚上皮の感覚毛であることが明らかになった。

A. 研究目的

急性内耳エネルギー不全モデルでの難聴発症のメカニズムにおけるカスパーゼの関与を明らかにし、同時にカスパーゼ阻害による難聴の予防効果を検討する。また、同モデルにおける平衡障害の定量的評価と責任病巣の組織学的検討を行う。

B. 研究方法

Sprague-Dawley ラット（6週齢、雄）を用いて実験を行った。3-NPの投与はこれまでの報告通り、全身麻酔下に耳後部切開をおき中耳骨胞を開放、正円窓窩を明視化におき同部に3-NPをマイクロチューブにて300mM, 2 μ l 局所投与した。投与後ゼラチンスポンジにて固定をして縫合した。アポトーシスの阻害には、アポトーシスカスケードの

下流に位置するカスパーゼを広範に阻害する pan-caspase inhibitor である、z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketon (Z-VAD-FMK)を用いた。Z-VAD-FMKは腹腔内から3日間連続で全身投与し、3-NPはZ-VAD-FMK投与2日目に局所投与した。コントロールとしてZ-VAD-FMKの溶媒であるDMSOを用いた。また聴力評価はAuditory Brainstem Response (ABR)にて術前、及び術後経時的に行った。3-NP投与28日後に全身麻酔下に解剖を行い内耳を摘出、組織学的検討を行った。

また、同モデルにおける眼振所見を赤外線カメラを用いて経時的に追跡し、その定量評価を行い、またその責任病巣を走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡を用いて組織学的に明らかにした。

(倫理的面への配慮)

国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行なった。

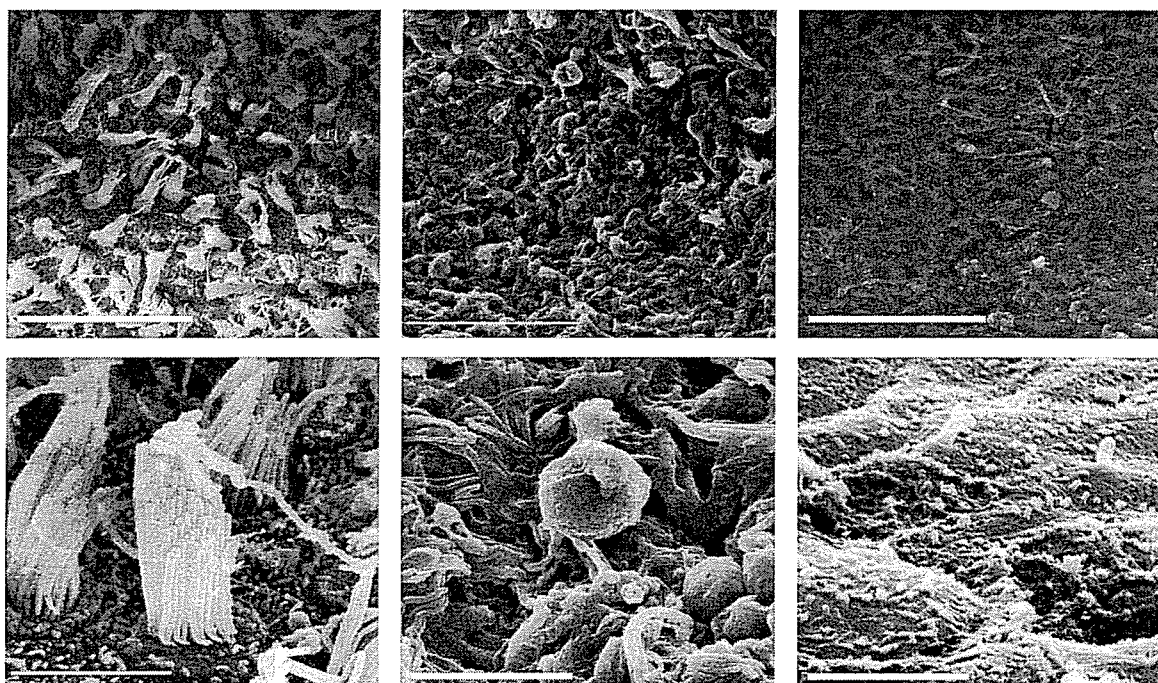
C. 研究結果

8kHzにおいて、コントロール群では3-NP投与2時間後に約50dBの難聴を生じ、1日後に約70dBでピークとなる。また、その後徐々に聴力は回復し21日後にはほぼ術前聴力に回復する。一方Z-VAD-FMK投与群では、術後1日目のピークが約50dBと抑制されており、また術後7日後に術前聴力に回復する。

20kHzでは、コントロール群は術後2時間で約70dBの難聴となり術後1日目に約85dBとピークとなる。その後緩やかに回復するが、術後28日でも約55dBの難聴が残存する。一方Z-VAD-FMK投与群では、術後1日目に聴力が約70dBと抑制されており、また術後14日目にはほぼ術前聴力に回復し、著明な治療効果が認められた。

組織学的には、コントロール群では蝸牛基底回転の外側壁の線維細胞に著明な細胞脱落を認めた。一方Z-VAD-FMK投与群では、ほとんど細胞脱落を認めず、著明な外側壁線維細胞の保護効果を認めた。

また、急性内耳エネルギー不全により、投与するミトコンドリア阻害薬の濃度依存性に急性平衡障害が生じた。すなわち高濃度の薬剤投与により永続的な平衡機能廃絶が観察され、低濃度では平衡機能が残存することが判明した。その主な責任病巣は感覚上皮の有毛細胞であった。特に低濃度のミトコンドリア阻害薬の投与によって有毛細胞の中でも感覚毛に特異的な変性が見られ本病態の主要な責任病巣であることが示唆された(図1)。



control

3-NP 300mM

3-NP 500mM

図1

D. 考察

本モデルでは、これまでの研究で蝸牛外側壁の線維細胞がアポトーシスをきたすことが示唆されていたが、今回の実験で難聴の治療が可能であったことより、本モデルにおける難聴出現のメカニズムに蝸牛外側壁線維細胞のアポトーシスが強く関与していることが、聴力と組織学的検討の両者によって示された。また、これまで急性感音難聴に対する有効な治療薬は明らかにされていないが、本実験においてカスパーゼ阻害薬の治療薬としての可能性が示唆された。さらに、急性感音難聴に随伴する平衡障害に関する研究はあまり報告されていないが、本研究により平衡障害は、蝸牛の障害とは異なるメカニズムで生じており、蝸牛における治療戦略とは異なる方法が必要であることが示唆された。

E. 結論

カスパーゼ阻害薬にて急性内耳エネルギー不全モデルにおける低音から中音域の難聴をほぼ完全に予防することができた。また平衡障害の責任病巣は感覚上皮の感覚毛であることが明らかになった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

「Caspase inhibitor facilitates recovery of hearing by protecting the cochlear lateral wall from acute cochlear mitochondrial dysfunction.」

投稿中

2 学会発表

- ・平成 18 年 10 月 20 日、第 16 回日本耳科学会総会学術講演会

「急性内耳エネルギー不全による平衡機能障害と有毛細胞の微細構造変化」

- ・平成 19 年 2 月 12 日、Thirtieth ARO Midwinter Meeting

「Acute Inner Ear Energy Failure Causes Vestibular Hair Cell Damage and Balance Disorder.」

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

内耳エネルギー不全モデルに対するアポトーシス阻害剤の内耳保護効果の検討

研究協力者	瀧口洋一郎	北里研究所病院耳鼻咽喉科
分担研究者	小川 郁	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室教授
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

内耳エネルギー不全による永久的聴力閾値上昇モデルに対しアポトーシス阻害剤の内耳保護効果を検討した。アポトーシス阻害剤には、pan-caspase inhibitor である z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone (z-VAD-fmk) を使用した。投与方法は、モデル動物作成直後・1日後・2日後に経静脈的に全身投与した。その結果、8kHz では聴力改善効果が得られたが 20kHz では改善効果をもとめなかった。病理組織学的には、蝸牛外側壁線維細胞の障害の顕著な改善をもとめたが基底回転基底側では障害が残存した。永久的聴力閾値上昇の発現には蝸牛外側壁線維細胞の関与が大きいことが示唆された。

A. 研究目的

これまで当研究室において、ミトコンドリアトキシシン 3-nitropropionic acid(3-NP)を用いた急性内耳エネルギー不全モデルラットを作成し、その投与濃度により一過性聴力閾値上昇モデル(TTS モデル)・永久的聴力閾値上昇モデル(PTS モデル)を作り分けることが可能となった。このモデルの難聴発現の病態として蝸牛外側壁のアポトーシスが考えられている。これまでの報告で TTS モデルにおいてアポトーシス阻害剤を全身投与し聴力改善を生じたことが報告され病理組織学的にも保護効果が得られていることが報告された。今回我々は PTS モデルに対しアポトーシス阻害剤をモデル作成直後・1日後・2日後に経静脈的に全身投与しその効果を検討し、病理組織学的検討も併せて行った。

B. 研究方法

動物は、Sprague-Dawley Rat（体重 160-200g; 6 週齢; 雄）を用いて実験を行った。PTS モデルは、これまで当研究室での報告通り、ミトコンドリアトキシシンである 3-nitropropionic acid(3-NP) 500mM をマイクロチューブにて 3 μ l 正円窓窩に局所投与して作成した。アポトーシス阻害剤は pan-caspase inhibitor である z-Val-Ala-Asp(Ome)-fluoromethylketone(z-VAD-fmk)を用いた。Z-VAD-fmk は 3-NP 局所投与直後、1日後、2日後にそれぞれ尾静脈より経静脈的に投与した。聴力評価は、Auditory Brainstem Response(ABR)にて、術前及び術後経時的に行った。3-NP 局所投与後 39 日目に全身麻酔下に内耳を摘出し病理組織学的検討を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

8kHz では 3-NP 投与後 1 日後には聴力がスケールアウトとなったが、6 日目より徐々に聴力は改善し 20 日目には閾値変化が 40dB 程度にまで回復した (図 1)。20kHz

では 1 日目にスケールアウトになり聴力の改善はみとめられなかった (図 2)。組織学的には、蝸牛頂回転・中回転では外側壁線維細胞の障害は認められずコルチ器の障害も認めなかった。基底回転頂側では一部の線維細胞の変性を認めたがコルチ器の変化は認められなかった。基底回転基底側では外側壁線維細胞の障害とコルチ器の変性を認めた。

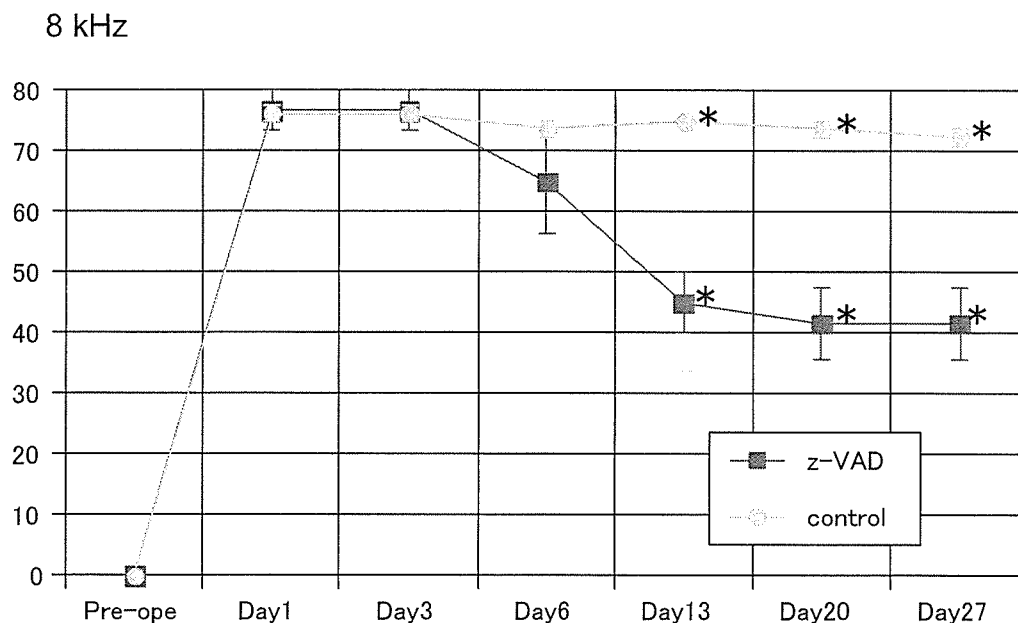


図 1

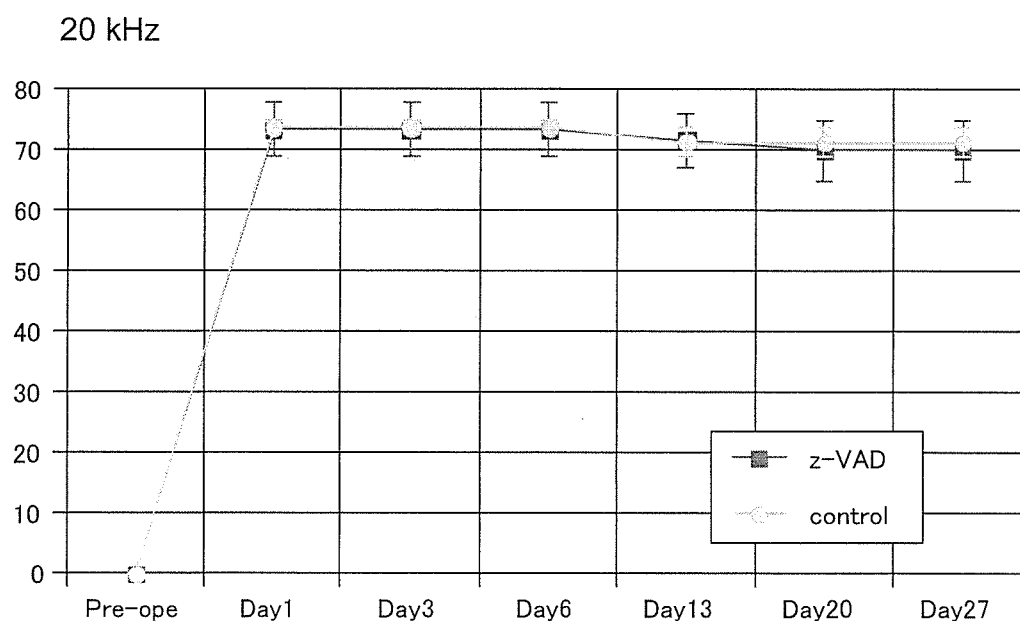


図 2

D. 考察

蝸牛外側壁線維細胞はギャップジャンクションを介してカリウムイオンのリサイクルに関わり内リンパ液の組成維持に関与している部位である。蝸牛外側壁線維細胞が傷害されると内リンパのイオン組成の変化が生じ内リンパ電位の低下を生じると考えられている。我々の難聴モデルではこれらが広範に傷害されていることが既に報告されており、蝸牛外側壁線維細胞の障害が難聴発現に大きく関与していると考えられている。

これまで、TTS モデルにおいては線維細胞障害発現の機序としてアポトーシスが大きく関与していると報告されており、PTS モデルにおいても障害発現にアポトーシスが関与している可能性が示唆されてきた。今回アポトーシス阻害剤として z-VAD-fmk を用いた。Z-VAD-fmk はアポトーシスカスケードの下流に位置するカスパーゼを広範に阻害する pan-caspase inhibitor である。PTS モデルに対しアポトーシス阻害剤を投与した結果、基底回転頂側から上方では外側壁線維細胞障害は殆どみられなくなる一方基底回転基底側ではコルチ器の障害と共に外側壁線維細胞の障害が残存した。病理学的に本剤投与により細胞障害が抑制されたことから、PTS モデルにおいても線維細胞障害発現のメカニズムとしてアポトーシスの関与が考えられ、またそのアポトーシス誘導にはカスパーゼが関与していることが示された。

また聴力変化では、8kHz では軽度の聴力改善をみとめる一方 20kHz ではスケールアウトのまま改善を認めなかった。ラットの場合、8kHz は蝸牛中回転に対応し、20kHz は

蝸牛基底回転頂側に対応するが、この難聴残存の原因はコルチ器の障害のみに由来するとは考えにくく、蝸牛外側壁線維細胞の障害に伴う内リンパ組成の変化が難聴残存に大きく関与しているものと考えられる。つまり、障害が残存している蝸牛基底回転基底側では内リンパのイオン組成に大きな変化が生じる一方、障害が残存していないより上方の部位では内リンパのイオン組成を戻そうとする働きが生じていると考えられる。そのため、障害部により近い 20kHz の聴力はほとんど改善がないにも関わらず、より上方の 8kHz では軽度の聴力改善が得られたのではないかと推察する。

E. 結論

PTS モデルラットに対し、アポトーシス阻害剤の経静脈的投与による内耳保護効果を検討した。病理組織学的には顕著な障害抑制をみとめたが、聴力の改善は軽度であった。蝸牛外側壁線維細胞障害の発現にアポトーシスが関与していることが示されるとともに永久的聴力閾値上昇の発現に蝸牛外側壁線維細胞の関与が大きいことが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

瀧口洋一郎、松永達雄、水足邦雄、藤波義明、藤井正人、小川郁、「急性内耳エネルギー不全による永久的聴力閾値上昇に対するアポトーシス阻害剤の聴力改善効果」、

第 16 回日本耳科学会総会学術講演会、青
森、2006 年 10 月 19 日-21 日

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
分担研究報告書

蝸牛線維細胞と骨髄間葉系幹細胞の相互作用の解明

研究協力者	孫 廣煒	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	幸池浩子	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚平衡覚研究部長
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

培養系を利用して、骨髄間葉系幹細胞（骨髄 MSC）と蝸牛線維細胞の間で分化と増殖に関する相互作用を調べた。骨髄 MSC の Conditioned Medium (CM) の添加により、蝸牛線維細胞の増殖を促進し、蝸牛線維細胞の特異的マーカー（S-100、NKCC1）の発現を減少し、間葉系幹細胞のマーカー（Vimentin）陽性細胞を増加した。一方、蝸牛線維細胞培養上清は、骨髄 MSC の Na-K-ATPase 陽性細胞への分化を促進したことが確認された。この結果により、骨髄 MSC と蝸牛線維細胞の間で分化と増殖への相互作用が示唆される。骨髄 MSC 移植による蝸牛の機能的な回復は、骨髄 MSC から蝸牛線維細胞への分化による作用機序以外にも、骨髄 MSC が蝸牛線維細胞の増殖を促進している可能性が考えられる。今後、本相互作用の分子機構を解明することは、骨髄 MSC 移植による難聴治療の臨床応用に役立つものと考えられる。

A. 研究目的

蝸牛線維細胞は内耳液のイオン組成を維持するため、重要な役割を果たしており、さらに難聴の発症、聴力の回復、および聴覚の維持にも大きく関与している (Science1999: 285: 1408-1411; Neuroreport 2004: 15:1597-1600; Audiol Neurootol 2005; 10: 220-233)。蝸牛線維細胞が高度に傷害された場合には、残された細胞からの再生が期待できないため、移植などにより外部から細胞

自体を補う必要がある。蝸牛線維細胞は発生時期において耳胞の周りの間葉系細胞から分化することが知られており、間葉系幹細胞 [Mesenchymal stem cell (MSC)] が移植に適している可能性が高いと考えられる。

骨髄間葉系幹細胞（骨髄 MSC）は多分化能を持つ細胞であり、成人の骨髄からでも容易に分離することが可能であり、軟骨、筋肉、脂肪など様々な細胞に分化できることが知られている。さらに、骨髄 MSC は培養によ

り増殖させることが可能で、移植用に必要十分な量の細胞を安定に供給できる。当研究室は3NPモデルラットの蝸牛に骨髄MSCを移植したところ、一部の幹細胞は傷害部位に生着した上、分化を示すマーカーを発現し、聴力においても有意な回復が見られた(Kamiya K. et al, 42nd Workshop on Inner Ear Biology, 2005)。しかし、生着した移植細胞の性質と聴力回復のメカニズムはまだ不明のままである。

骨髄間葉系幹細胞移植による難聴の再生医療の実現化のためには、*in vitro*で骨髄間葉系幹細胞から蝸牛線維細胞への分化、そして周囲に残存する蝸牛線維細胞にどのような影響を与えるのかを解明することが不可欠である。本研究ではこの点の解明を目的とする。

B. 研究方法

1. 細胞の準備：蝸牛線維細胞は6週齢のC3Hマウスから採取し、10%FBS添加MEM培地で培養する。6週齢のC3Hマウスの大腿骨から骨髄細胞を採取し、10%FBS添加RPMI 1640培地で培養する。5回継代した付着細胞を骨髄MSCとして利用する。
2. 骨髄MSCの線維細胞への影響：骨髄MSCからの培養上清液を線維細胞に添加して、細胞の増殖、性質について検討した。
3. 骨髄MSCから線維細胞への分化：線維細胞の培養上清液を骨髄MSCに添加して、線維細胞への分化誘導について検討した。

(倫理的面への配慮)

全ての処置に置いて動物に苦痛を与えな

いよう配慮し、国立病院機構東京医療センター動物実験指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 蝸牛線維細胞は10%血清存在下で培養すると、細胞増殖を示し、各種類の線維細胞の存在が認められる。
2. 骨髄MSCの培養上清添加による線維細胞への影響
 - ① 10%血清入りの培地で培養された細胞よりMSCの上清を添加した方がより線維細胞の増殖を促進させることが判明した(図1)。
 - ② 骨髄MSCの培養上清の添加により、NKCC1,S100陽性細胞の割合は減少したが、Vimentin陽性の細胞の割合は上昇し、Vimentinの染色強度も増大した。C3H成熟マウスの蝸牛外側壁において、Vimentinは2型以外の線維細胞で陽性であった。Vimentinは間葉系のマーカーとしてもよく用いられている。マウスでは、生後初期の蝸牛外側壁の細胞にはVimentin陽性細胞を存在することが報告されている。これらのことも踏まえて、今回増殖を示したVimentin陽性の細胞集団はどのような性質を持っているか未だ不明である(図2)。
3. 蝸牛線維細胞培養上清添加による骨髄MSCへの影響
 - ① 無添加群と比べて、蝸牛線維細胞の上清添加は骨髄MSCの増殖に影響しない(図3)。
 - ② 蝸牛線維細胞培養上清は、骨髄MSCのNa-K-ATPase陽性細胞への分化を促進した。継代5回目の骨髄MSCに

は、2、4 型線維細胞のマーカーである Na-K-ATPase を使って細胞染色を行い、Na-K-ATPase 陽性細胞を存在しないことが証明された。この骨髄 MSC を分化誘導条件で 20 日間培養したところ、Na-K-ATPase 陽性細胞が存在することが確認された。さらに、血清のみで培養された骨髄 MSC にはおよそ 10% の細胞しか Na-K-ATPase 抗体を陽性にならないが、

蝸牛線維細胞培養上清を添加した場合には、8 日目に約 20% の細胞が Na-K-ATPase 抗体に陽性となり、20 日目には約 60% の細胞で Na-K-ATPase 抗体が陽性になった。この結果は、蝸牛線維細胞と同じ培養条件で培養することにより、一部の MSC は自発的に蝸牛線維細胞へと分化するが、蝸牛線維細胞 CM の添加により効率よく誘導できることが示唆される (図 4)。

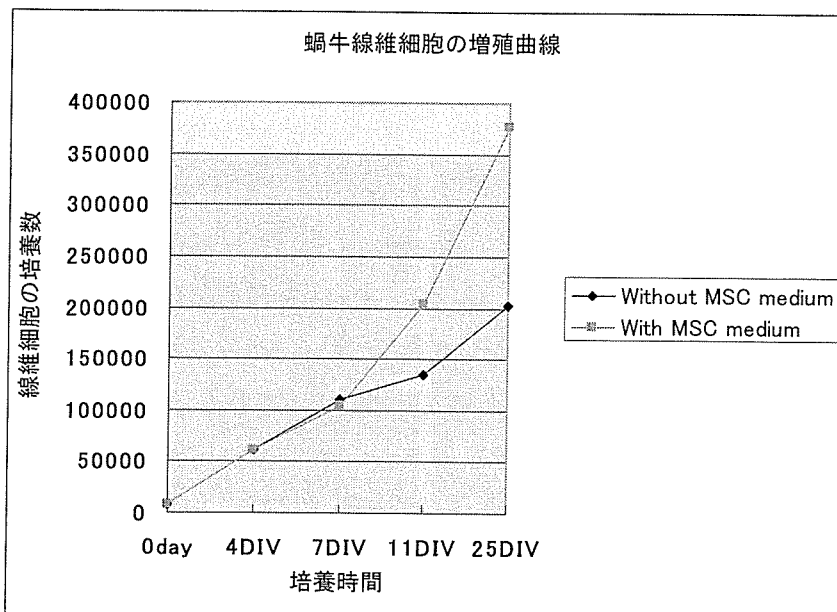


図 1

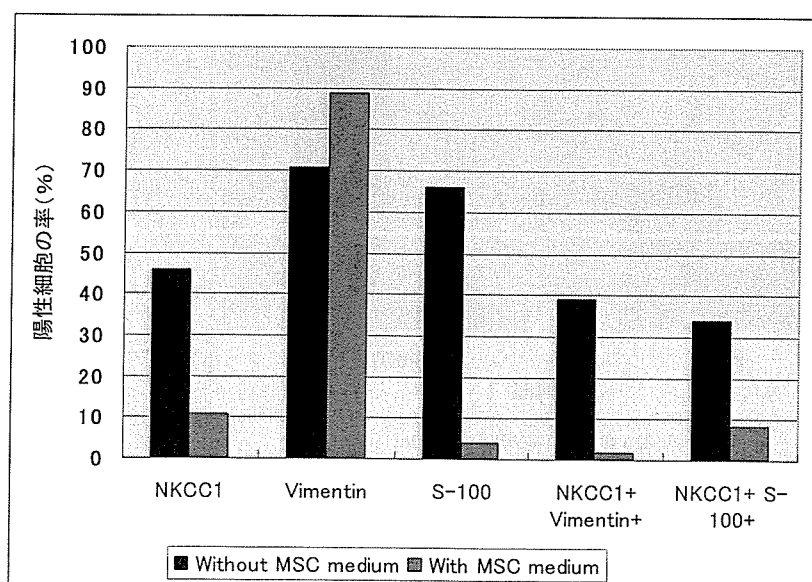
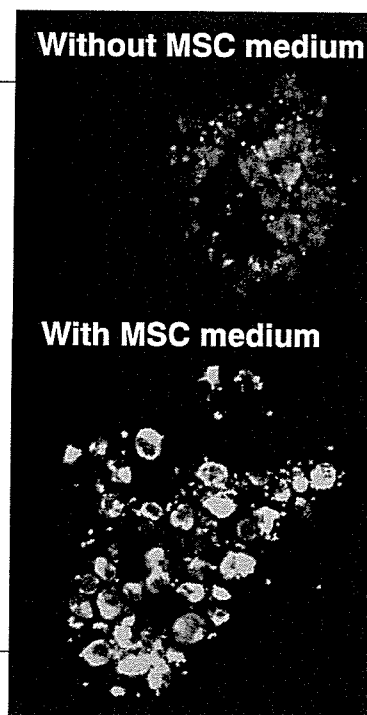


図 2



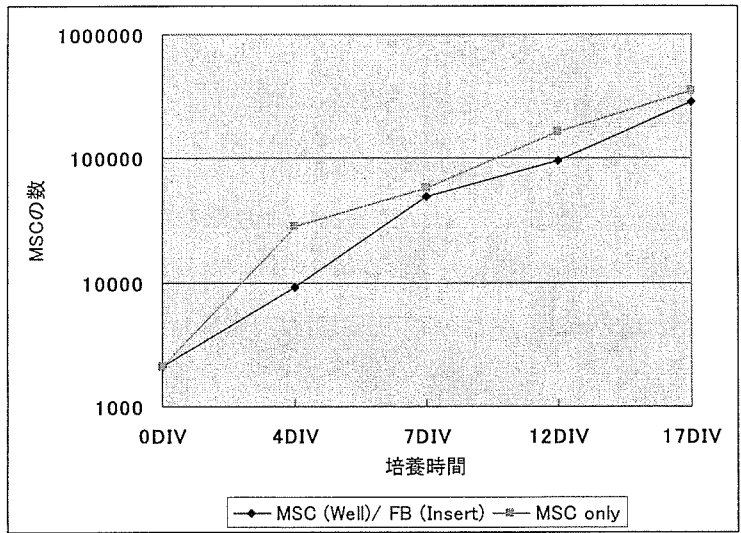


図 3

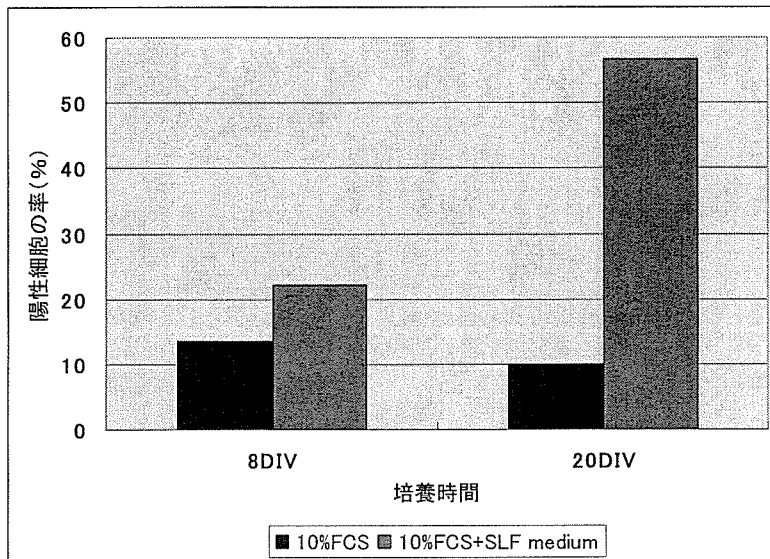
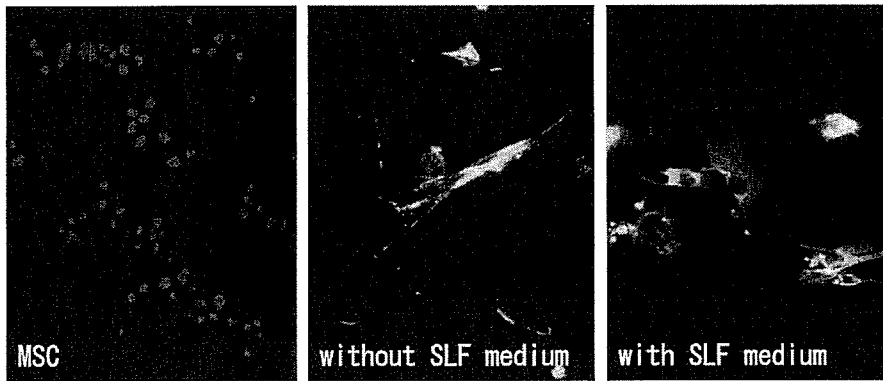


図 4

D. 考察

今回の研究結果より、線維細胞が障害を受けた内耳への骨髄MSCの移植による聴力回復のメカニズムとして、移植され生着した骨髄MSCからの因子が残存した蝸牛線維細胞の増殖を刺激して、ラセン靭帯を修復する可能性と、線維細胞からの因子により移植された骨髄MSCが線維細胞へ分化誘導されて消失した蝸牛線維細胞を置換した可能性が考えられる。

E. 結論

本研究により、骨髄MSC培養上清は、蝸牛線維細胞の増殖を促進し、S-100、NKCC1陽性細胞の率を減少し、Vimentin陽性細胞を増加した。蝸牛線維細胞培養上清は、骨髄MSCのNa-K-ATPase陽性細胞への分化を促進した。今後、この培養システムを用いて、線維細胞の分化、増殖に必要な因子の同定を試みる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

孫 廣煒、藤井 正人、松永達雄

「骨髄間葉系幹細胞の蝸牛線維細胞への影響に関する研究」

第16回日本耳科学会総会学術講演会、青森、2006年10月19-21日

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
神崎仁、 佐藤美奈子、 松永達雄、 熊埜御堂浩、 神崎晶、 小川郁	突発性難聴の可逆性について	Audiology Japan	49(6)	782-788	2006
松永達雄	メニエール病と蝸牛線維細胞障害	Equilibrium Res.	65(2)	129	2006

突発性難聴の可逆性について

神崎 仁¹⁾, 佐藤美奈子²⁾, 松永 達雄³⁾
熊埜御堂浩¹⁾, 神崎 晶²⁾, 小川 郁²⁾
¹⁾国際医療福祉大学附属熱海病院耳鼻咽喉科
²⁾慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科
³⁾東京医療センター聴覚障害研究室

要旨：突発性難聴の原因，メカニズムはなお不明であり，予後予測の精度も必ずしも高くない。本稿では，重症度分類の Grade 2 と 3 の症例に限定して，治癒率，改善率を調べ，治癒率に影響する因子を検討し，本疾患における報告システムの必要性を提案した。治癒率を主に発症後 7 日以内と発症後 8～14 日以内の 2 群に分類して検討した。発症後 7 日以内に受診した例の治癒率は 52.9%（文献報告 37～60%）であった。Grade 2 と 3 の症例では有意差はなかった。発症後 8～14 日以内になると 36.6%であった（文献報告 20～25%）。7 日目の改善率が 50%以上になった場合，聴力固定時の改善率が 75%以上になる率が高く，これらの例には自然治癒例が含まれている可能性が示唆された。

以上から症例全体の治癒率は，①発症後 7 日以内の症例数，②同じく 8～14 日の症例数，③ Grade 3 a（めまいあり）の症例数，④治療開始 7 日目の改善率，⑤自然治癒率に依存していると考えられた。

－キーワード－

突発性難聴，難聴の可逆性，自然治癒，治癒率，重症度分類

はじめに

突発性難聴（以下突難と略す）の特徴は原因不明で，突然聞こえなくなることであるが，さらに感音難聴にも拘らず，一部の例は完全に，一部は部分的に聴力が改善することである。難聴の原因，メカニズムは依然として不明であり，予後の予測の精度も必ずしも高くない。本稿では自験例を厚生労働省の急性高度難聴研究班（以下研究班と略す）が作成した重症度分類の Grade 2 と 3 の症例に限定して，治癒率，改善率を調べ，治癒率に影響する因子を検討し，突難の報告システムの必要性を提案した。またこれらの成績から自然治癒の可能性を検討し，さらに可逆性難聴の動物モデルの病態から突難の可逆

性を類推し，加えて聴力改善の予後予測の精度が低い理由などについて考察を加えた。

対象と方法

対象症例はすべて研究班の重症度分類で Grade 2（5 分法で 40dB 以上 60dB 未満）と Grade 3（60 dB 以上 90dB 未満）の症例に限った。

1) 発症後 7 日以内に治療した症例

A. 治癒率，改善率

対象：難聴発症後 7 日以内に治療を開始し，初診時聴力が Grade 2 と Grade 3 の症例 136 例。

発症 1 日目に治療を開始した例を第 1 日群とし，以下同様に第 2 日群から第 7 日群とした。治癒の判

表1 発症後 病日と治癒率(N=136)

	第1病日	第2病日	第3病日	第4病日	第5病日	第6病日	第7病日	平均
治癒率(%)	37	50	47	62	59	56	57	52.9%
症例数	8	34	32	29	17	9	7	136
改善率(%)	78.9±28.9	77.7±33.0	77.7±27.3	80.9±31.6	81.9±37.3	78.1±28.0	80.4±16.6	79.2±30.2

定は厚生労働省突発性難聴調査研究班の聴力回復の判定基準(1974)を用いた。また、各群の聴力改善率(治療開始時と固定時聴力の差)/(治療開始時患側と健側聴力の差)を求めた。

重症度分類は厚生労働省急性高度感音難聴研究班のものを用いた。

各群の治療開始時聴力レベル、めまい症例の割合はカイ二乗検定で各群間に有意差はなかった。

B. Grade 2 と Grade 3 症例の治癒率の比較

対象：症例はAと別のシリーズである。発症後7日以内の症例で初診時聴力はGrade 2とGrade 3の215例。

C. めまいの有無：BのシリーズでGrade 2 (71例)とGrade 3 (144例)症例の治癒率の比較

対象：発症後7日以内に治療したGrade 2 a (13例)とGrade 2 b (58例)症例, Grade 3 a (32例)とGrade 3 b (112例)症例。

D. 改善速度

対象：A, Bと別のシリーズで発症後7日以内に治療した症例(129例)。治療後7日目の改善率を用いて改善速度を検討した。

改善率が1週間以内に50%以上になる例, 25~50%, 25%以下に留まる例の聴力固定時の改善率から回復速度を検討した。

2) 発症後8~14日に治療した最近のGrade 2 (13例)とGrade 3 (17例)症例の計30例の治癒率

3) 発症後14日以内に治療した1), 2)とは別のシリーズでGrade 2 (69例)とGrade 3 (40例)の計109例の治癒率を検討した

1)~3)において治療法はステロイド, ウロキナーゼ, ATPなどの単剤または併用療法をおこなった。いずれの群でも特定の薬物を用いることはなかった。

結 果

1) 発症後7日以内に治療した症例

(A) 治癒率, 改善率

治癒率は136例中72例(52.9%)であった。

治癒, 著明回復, 回復, 不変の割合は分散分析にて各群間に有意差を認めなかった。改善率は全症例の平均値が79.2±30.2%(M±SD)で各群間に優位差を認めなかった(表1)。

(B) Grade 2 と Grade 3 の症例の治癒率

治癒率を比較すると, Grade 2では59%, Grade 3では54%で有意差はなかった。

(C) Grade 2 と Grade 3 の症例のめまいの有無での治癒率の比較

Grade 2 aは13例で治癒率は46.2%, Grade 2 bは58例で治癒率は62.1%で統計学的に有意差はなかった。Grade 3 aの治癒率は32例中37.5%, Grade 3 bの治癒率は112例中58.9%で有意差を認めた。

(D) 治療開始後7日目の改善率

7日目の改善率が50%以上になる例では聴力固定時の改善率が75%以上なる率が高い(93%)。一方, 1週目では50%以下, 25%以下でも固定時改善率が75%以上になる例がそれぞれ44%, 25%みられた(表2)。

治療開始後7日以内の改善率より3群に分類した。

A群：50%以上の改善率を示し聴力固定時75%以上の改善率を示した群(急速回復群)：129例中65例(50%)

B群：50%以下の改善率を示すが, 聴力固定時75%以上の改善率を示した群(緩徐回復群)：129例中20例(16%)

C群：50%以下の改善率を示し, 聴力固定時75%以下の改善率を示した群(回復不良群)：129例中44例(34%)

2) 発症後8~14日に治療した症例の治癒率

表2 発症後7日以内に治療開始した症例の改善率

治療後7日目の改善率(%)	聴力固定時/改善率(%)			N
	>75%	50~75%	<50%	
>50%	65(93)	5(7)	0(0)	70
25~50%	12(44)	9(33)	6(22)	27
<25%	8(25)	8(25)	16(50)	32
計	85	22	22	129

Grade 2 の13例 中7例 (53.8%), Grade 3 の17例中4例 (23.5%)が治癒した。合計30例中11例(36.6%)が治癒した。Grade 2 a では6例中5例(83%), Grade 3 a では9例中3例 (33%)が治癒した。

3) 発症後14日以内に治療開始した症例の治癒率

Grade 2 と Grade 3 症例109例中 Grade 2 では40%, Grade 3 では27.5%と差があった。

考 察

1. 発症後7日以内の治癒率

発症後7日以内の治癒率はA, Bの結果でみるようにGrade 2, 3全体とGrade 2と3に分けてもほとんど差がなく, 53~59%であった。発症後7日以内では発症後受診までの日数と治癒率, 改善率に差がなかったことから, 7日以内は治療開始が早ければ治癒率, 改善率が必ずよいわけではないことを示していると思われる。また, Grade 2と3の治癒率にも差がなかった。

もし, 発症後数日のうちに治療により改善する例が多ければ, 発症後7日目に治療を開始した例の予後は発症後2~3日目に治療を開始した例より治癒率が悪いと考えられるが, そうではなかった。このことは発症7日以内の例では発症後7日前後より自然治癒がおこっている可能性があることを示唆していると思われる。めまいの有無についてはGrade 3 a と3 b に有意差がみられたが, a, bを含めるとGrade 2とGrade 3ではBの結果のように差がなかった。

7日以内に治療を行った症例の治癒率は報告により37~60%(37%¹⁾, 41%²⁾, 47%³⁾, 51%⁴⁾, 55%⁵⁾, 60%⁴⁾と幅がある。これは対象症例の聴力レベルが報告により, 60dB以上⁵⁾と限定されていたり, 90dB以上の例を含めた症例の選定に規定のないものであったり, 記載されていたものは少ないが対象症

例中の3 a の例の割合によるものなどによると推定される。

2. 聴力改善の速度

急速回復型(A群)ではかなり自然治癒があると考えられる。A群が50%存在するという数字も7日目までに治療を開始した治癒率(52.9%)とほぼ同じであることから, 発症後7日以内に急速に回復し治癒する症例の中, かなりの例が自然治癒していると推測される。このような考察は中村ら⁶⁾によってもなされている。

緩徐回復型(B群)では7日目までの改善率は50%以下であったが, その後急速に改善したと思われる例で, slow recoveryを示す自然治癒例と考えるか, 治療効果と考えるか, 両者の影響と考えるか難しいところである。

C群は回復不良な例で34%という数字は従来知られている1/3は回復不良という数字にほぼ一致する。

3. 発症後8~14日に治療した症例の治癒率

発症後8~14日に治療を開始した症例の治癒率は36.6%であったが, 例数が少なかったため, 今後の検討が必要である。文献的には20~25%(20%⁴⁾, 22%¹⁾, 25%⁷⁾と不良である。このことは聴力障害が同じ重症度に属しても発症後7日前後から聴力の回復が始まり, 回復しない例は聴力検査では示されない障害の存在のためにslow recoveryを示すか, 回復不良となると思われる。

4. 発症後14日以内に治療を開始した症例

Grade 2とGrade 3の症例では治癒率に差がみられたが, めまいの有無との関係については調べていないためと思われる。発症後14日以内の症例の治癒率を文献的に検討すると7日以内の症例と同様に対象の聴力レベルが報告により様々に規定のないもの

表3 治癒率の予測(Grade 2, Grade 3)

受診から治療までの日数	受診数(例)	治癒率(%)	治癒数(例)
< 7	250	50	125
8 ~ 14	80	25	20
15 ~ 21	40	5	2
22 ~ 28	30	3	1
計	400	34.5	138

から、40~60dBの症例のみを対象とした報告までみられる⁹⁾。

また、発症後7日以内の例と8~14日の例とそれぞれにめまい症例が含まれるので、治癒率(18%⁹⁾、24%⁹⁾、32%¹⁰⁾、35%⁹⁾、36%¹¹⁾、38%¹⁰⁾、43%¹²⁾、48%⁹⁾、49%⁹⁾、63%⁹⁾)はこれらの因子の割合に影響されると思われる。

5. 自然治癒について

Grade 4は予後不良なので今回の対象から除き、初診時聴力がGrade 2と3の症例に限った。

文献的には無治療による自然治癒率は発症後14日以内の例では38% (プラセボ10/28例)、90dB以上の例を除くと53% (36/68例)であった¹³⁾。30dB以内の例を含めると88% (29/33例)、30dB以上の例では47% (14/30例)であった¹⁴⁾。治癒にいたらないが聴力の自然改善例を含めると自然回復率は70%近くになると推測されるが、本稿では治癒例のみを対象にした。自然治癒率は14日以内の例で53%というMattoxらの数字は文献報告を含めても治療例の治癒率40%前後と比べて非常に良い。

6. 治癒率(Grade 2, 3)に影響を及ぼす因子

発症後14日以内のGrade 2と3の症例の治癒率に関与する因子は、①発症後7日以内の症例数の割合、②同じく8~14日の症例数の割合、③Grade 3a(めまいあり)の割合、④治療開始7日目の改善率、⑤自然治癒率などである。

7. 治癒率の予測(表3)

治癒率の推測値を用いて、仮に1カ月以内に治療した突発性難聴400例の治癒率を大胆に推測すると表3のようになる。ここで発症後のそれぞれの日数内の症例数は自験例や文献より推測した。発症後日

数毎の治癒率は前述したものを用いた。15~21日と22~28日の治癒率は文献よりの推測である。その結果治癒率は発症後30日以内の例で34.5%である。90dB以上の例を含めると、若干悪化して約30%になり、従来の文献の成績¹⁵⁾と一致すると考える。治癒率は発症後の期間ごとの症例数や3aの例数の割合などに影響されるので施設によって若干の違いは当然おこるであろう。

8. 国際的な報告システムの必要性

治療効果を評価し国際的に比較するためには統一した報告システムを用いない限り難しい。報告システムについては国際的にも統一されたものがないので、国際学会に提案し作成する必要がある。診断基準に聴力レベルの基準が必要であるが、報告により異なっている。外国では連続する2周波数で30dB以上、連続する3周波数で30dB以上とするものなど研究者によって異なる。この点、我が国の研究班の診断基準はよくできているが、聴力レベルについての規定がないので混乱を招いている。それは「高度難聴であること」の説明として「必ずしも「高度」である必要はない」という「解説」があるためではないかと思われる。今後検討の上、5分法で35dB以上、あるいは40dB以上にするか、grade 1を別に扱うか、除くかを早急に検討する必要があると考える。また、治療成績の評価をするために評価の報告システムを作成すべきである。その際は、発症後治療までの期間を我々の試みたように、例えば7日以内、8~14日、15~21日のようにわけること、聴力レベルをgrade別、めまいの有無によりわけること(aとb)、聴力回復の判定基準、聴力改善率を用いることなどが含まれるよう提案する。文献を調べても上記の記載がなされているものは意外に少なかった。