

DDSを用いた内耳疾患の治療

中川隆之*

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害であるが、治療法はきわめてかぎられている。解決すべき問題に、適切に内耳へ薬物を移行させる技術開発がある。この問題の解決手段として、中耳の正円窓膜を介した薬物の内耳局所投与に、ドラッグデリバリーシステムの応用が試みられている。ポリグリコール乳酸に薬物を封入したナノパーティクルは、正円窓膜を通過することができることから、ステロイドなどの内耳への徐放に応用が可能と考えられる。また、ゼラチンハイドロゲルは、内耳に神経栄養因子や細胞増殖因子を徐放できる簡便なシステムとして、臨床応用が期待されている。

はじめに

感音難聴は、最も頻度の高い身体障害の1つとされている。感音難聴の多くは、内耳の蝸牛障害に起因する。音響刺激は、空気の疎密波として、鼓膜を振動させる。鼓膜の振動は、3つの耳小骨を介して蝸牛に振動を伝える。耳小骨の振動は、蝸牛の感覚上皮を振動させ、感覚上皮の感覚細胞(有毛細胞)が振動エネルギーを神経信号に変換し、蝸牛軸に存在する蝸牛の一次神経節であるラセン神経節細胞を興奮させ、中枢に伝達される(図1)。感音難聴の原因としては、音響外傷、耳毒性薬物、遺伝子異常、老化がある。また、メニエール病などの内リンパ水腫に関連する難治性疾患も感音難聴を引き起こす。聾もしくは高度難聴は新生児の1000~2000人に1人認められ、2000人に1人は成

人するまでに高度難聴を発症する。70歳を超えた人口の6割には、高度難聴が存在する。このような背景があるにもかかわらず、感音難聴に対する治療オプションはごくかぎられているのが現状である。この現状を打破すべく、多くの基礎的研究がなされ、いくつかの治療薬としてのポテンシャルをもつ薬物が同定されている。しかしながら、臨床応用に至った基礎的研究成果は、ほとんどない。その大きな理由のひとつとして、内耳に適切に薬物を到達させる手段の欠如が挙げられてきた。

全身投与された薬物が蝸牛の存在する内耳に到達しにくい原因は、おおまかに2つある。1つは、内耳に到達する血流量がきわめて少ないという点である¹⁾。もう1つは、血液と内耳のあいだに「血液-内耳関門」が存在することである²⁾。血液-脳脊髄液関門と同様に、多くの薬物は血液-内耳関門を通過することができない。以上の問題を解決するためには、2つのストラテジーが考えられる。1つは、薬物に化学的な修飾を加え、内耳に到達しやすくする工夫である。薬物の内耳へのターゲティングともいえる。この方法では、血液-内耳関門を通る性質をもたせ、なおかつ内耳に特異的に集積する正確をもたせることが求められる。も

〔キーワード〕

感音難聴

正円窓

ゼラチン

ポリグリコール乳酸

ナノパーティクル

*NAKAGAWA Takayuki/京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科頭頸部外科

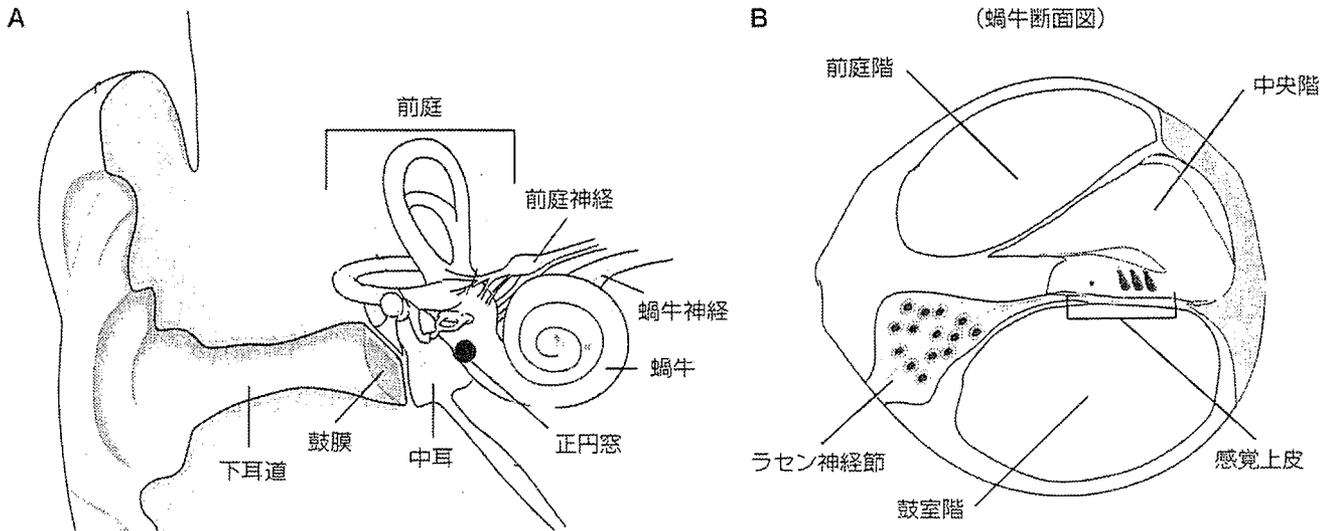


図 1. 内耳, 蝸牛の解剖

- A: 内耳は, 蝸牛と前庭からなり, 中耳のさらに深部に存在し, そのほとんどは骨に囲まれている. 正円窓のみ膜様構造で内耳と中耳は接している.
- B: 蝸牛の断面図を示す. 蝸牛は, 前庭階, 中央階, 鼓室階という3つのコンパートメントからなる. 中央階と鼓室階の境界に感覚上皮をのせる基底板が存在し, ラセン神経節は蝸牛軸に存在する.

う1つは, 内耳に直接的に薬物を投与する薬物局所投与技術の開発である. この場合, より低侵襲な外科的操作で, 安定した薬物の内耳への送達が可能で手法が望ましい.

本稿では, 後者の内耳薬物局所投与という方法へのドラッグデリバリーシステム(DDS)の応用に関する最近の知見について紹介したい.

1. これまでに用いられてきた内耳局所投与方法

蝸牛を含めた内耳は, ほとんどが骨で囲まれており, 外部から遮断された構造を有しているが, 蝸牛の正円窓という部分のみ膜様の構造物で, 中耳腔と接している(図1). この正円窓膜を介して薬物を内耳に投与しようとする試みは, 決して新しいアイデアではなく, 経鼓膜的に中耳腔に薬物を注入する方法が古くからおこなわれてきた³⁾⁴⁾. 方法は, 鼓膜を注射針で貫通し, 中耳腔に薬液を注入するというシンプルなもの, 耳鼻咽喉科医にとっては基本的な手技であり, 容易な方法である. 急性中耳炎の基本的治療法として, 鼓膜切開,

排膿する方法があるが, これに準ずるものである. 過去には, この方法を用いてステロイドを局所投与する方法が, 感音難聴治療としておこなわれてきた. いくつかの報告では, その有用性が報告されているが⁵⁾, この方法では, 治療効果を予見することが困難であることが指摘されている⁶⁾. 経鼓膜的な中耳への薬物注入は, 簡単で安全な方法であるが, 内耳に移行する薬物量のコントロールや持続的投与は不可能といえる.

より制御された持続的投与方法として, 浸透圧ポンプを用いた投与方法が開発されている⁷⁾⁸⁾. この方法は, カテーテルの先端部を正円窓膜付近に留置し, 耳介後部に埋め込んだ浸透圧ポンプから持続的に薬液が正円窓膜上に投与されるというものであり, 薬物の投与量や投与期間を厳密に制御できるという利点をもつ. しかし, この方法では, 一般的な鼓室形成術と同等の手術侵襲がポンプとカテーテルの留置に求められ, さらに, 治療後にこれらのデバイスを摘出する必要がある. 一部の報告では, この方法によるステロイドの投与の急性高度難聴に対する有効性が報告されている

が⁷⁾⁸⁾、広く普及するには至っていない。

2. DDSの内耳治療への応用

一方、最近のテクノロジーの進歩により、DDSは急速な進歩をみせている。現在開発されているDDSのいくつかは、薬物投与だけではなく、遺伝子導入にも応用できる可能性が高く、内耳の遺伝子治療への応用との観点からも注目すべきテクノロジーといえる。DDSにおいて、薬物を徐放するための材料として、人工合成物と天然材料の2種類が用いられている。人工合成物の代表的なものとして、シリコンポリマーを挙げることができる。シリコンポリマーは、経皮吸収目的の徐放に使われる代表的な材料であり、気管支拡張薬、局所麻酔薬、さらには、禁煙目的のニコチン投与などに応用されている最もなじみのあるDDSといえる。生分解性ポリマーとして最も広く用いられている素材としては、ポリ乳酸(PLA)、ポリグリコール乳酸(PLGA)が知られる。これらの材料は、手術で用いる吸収糸などとして臨床使用されており、組織工学の分野でも広く用いられている。天然素材では、ゼラチンやヒアルロン酸が用いられている。それぞれ、正円窓膜を介した内耳への薬物投与への応用が試みられているが、内耳への薬物の徐放動態には違いがある(図2)。シリコンポリマーでは、単純な拡散により、含有されている薬物が徐放され、正円窓膜を通過して蝸牛内に入る。PLGAナノパーティクルでは、ナノパーティクルとして蝸牛内に入り、蝸牛内でのPLGAの加水分解に伴い、含有されている薬物が徐放される。ゼラチンハイドロゲルでは、ゼラチンポリマーが中耳腔で分解させるのに伴い、ポリマーに静電的に結合していた薬物が徐放され、蝸牛内に入っていく。それぞれ、ポリマーと薬物を結合させるメカニズム、方法が異なるため、使用できる薬物もこれに応じて異なる。以下の項で、シリコンポリマー、PLGAナノパーティクル、ゼラチンハイドロゲルの内耳薬物投与への応用について、詳説する。

3. シリコンポリマー

シリコンは、安定した物質で生体内で分解されない。手術後のドレナージチューブに用いられている。薬物の徐放に関しては、マトリックス状のシリコンが汎用されている。シリコンゲルの中に薬物が含まれ、薬物は拡散により徐放される。この方法で徐放される薬物は、脂溶性で分子量が低いものが好ましい。内耳への応用としては、ステロイドを含有させたシリコンポリマーについての報告がなされている⁹⁾。ステロイドを含有したシート状のシリコンの正円窓膜上への留置による、蝸牛外リンパ液へのステロイドの徐放が確認されている。また、このシリコンの留置が、蝸牛に組織および機能的障害を与えないことが示されている。しかしながら、薬物の徐放期間が終了しても、シリコンは中耳腔に残存したままとなる。このため、単回投与は可能だが、反復投与ではシリコンシートを除去する必要が生じる。また、正円窓膜に正確に接着させるという点でも安定性にかける。

4. PLGA ナノパーティクル

PLGAは、生体分解性素材として、医療に広く用いられている素材である。近年のPLGAナノパーティクル精製技術の進歩により、比較的幅広い薬物をPLGAナノパーティクル化することが可能になっている。われわれ¹⁰⁾は、PLGAナノパーティクルの内耳への薬物投与システムとしての有効性をモルモットを用いて検討した。蛍光色素であるローダミンを含有するPLGAナノパーティクルを用い、正円窓膜の透過性を検討した。ローダミン含有PLGAナノパーティクルを正円窓膜上に留置し、24時間後の蝸牛内の分布を組織学的に調べたところ、蝸牛の広い範囲にローダミン含有ナノパーティクルが認められた。これにより、PLGAナノパーティクルは正円窓膜を通過することが可能であり、蝸牛外リンパ液中を拡散することがわかった。したがって、突発性難聴治療

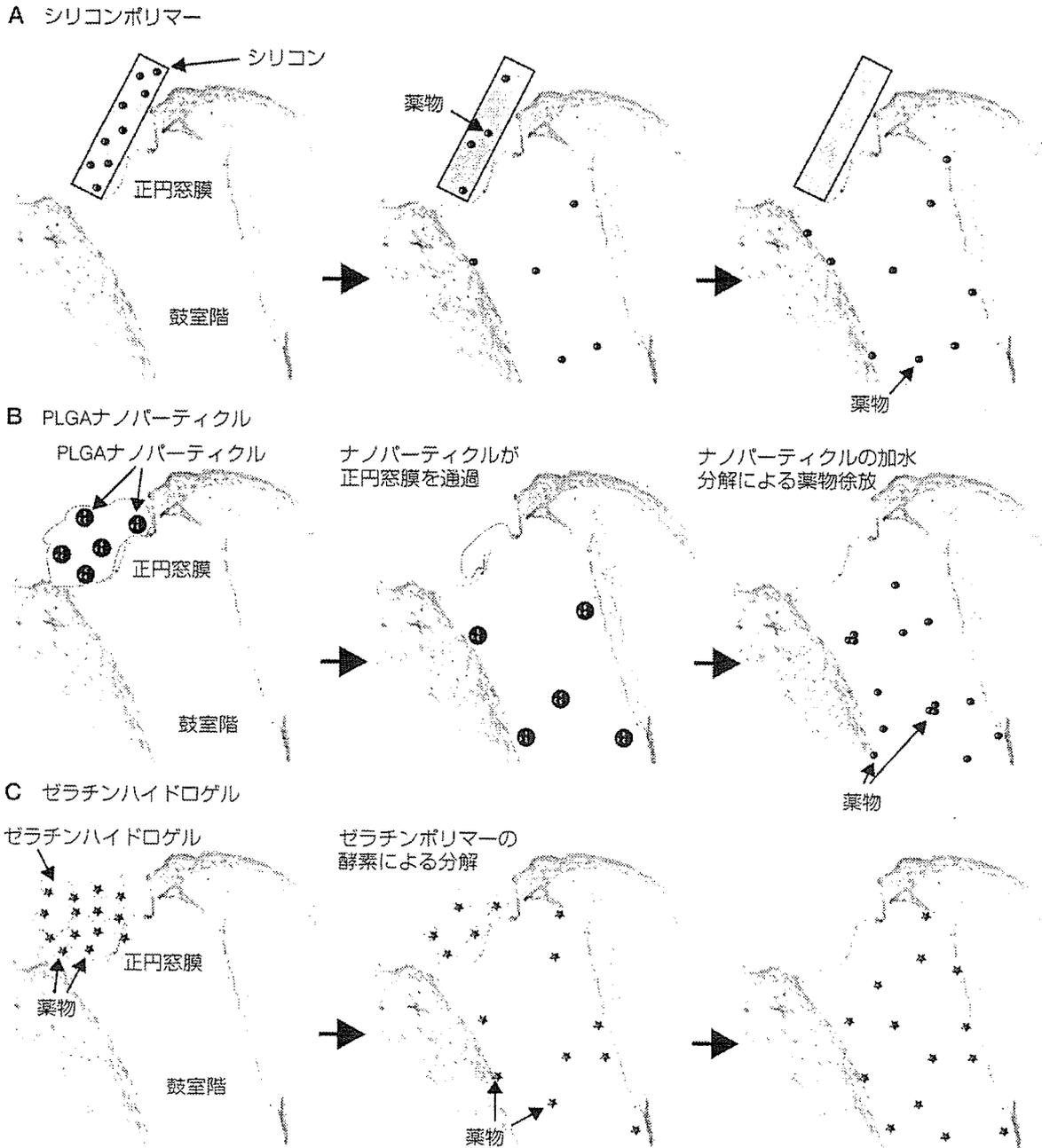


図 2. 内耳 DDS の薬物徐放機構 (Nakagawa T *et al*¹¹⁾より改変引用)

A : シリコンポリマー. 正円窓膜上に留置されたシリコンから, 拡散により薬物が蝸牛鼓室階に徐放される.

B : PLGA ナノパーティクル. ナノパーティクルが正円窓膜を通過し, 蝸牛鼓室階内で加水分解され, 薬物が徐放される.

C : ゼラチンハイドロゲル. 正円窓膜上でゼラチンが酵素分解され, 薬物が徐放され, 蝸牛鼓室階に移動する.

に用いられているステロイドやメニエール病に用いられているアミノ配糖体などを PLGA ナノパーティクルに封入することにより、蝸牛への徐放が可能となると考えられる。今後、実際の薬物投与での有効性の検討が待たれる。また、このローダミン含有 PLGA ナノパーティクルを正円窓膜から蝸牛内に注入した場合、大量のパーティクルが蝸牛全体に認められ、一部は蝸牛組織内に移行しているものも認められた。PLGA ナノパーティクルに遺伝子プラスミドを封入し、正円窓膜から注入することにより、蝸牛内の細胞に遺伝子導入をおこなえる可能性がある。すでに、経正円窓膜的にリポフェクションで遺伝子を蝸牛内の細胞に導入できることが示されている¹²⁾。したがって、理論的には、PLGA ナノパーティクルを用いて、蝸牛内細胞への遺伝子導入も可能と考えられる。

5. ゼラチンハイドロゲル

ゼラチンハイドロゲルは、ゼラチンをカチオン化あるいはアニオン化させ、逆の静電特性をもつ薬物と結合し、ポリマーを形成する。ゼラチンが生体内で加水分解されるのにしたがって、静電的に結合していた薬物を徐放する DDS である。ゼラチンハイドロゲルによる DDS の特徴は、薬物の担体となる物質と薬物のポリマー形成が容易な点にある。すなわち、薬物とその薬物の静電特性に対応したゼラチンハイドロゲルを投与 30~60 分前に室温で含浸させるのみであり、蛋白やペプチドの変性をきたすことはなく、細胞増殖因子や神経栄養因子などのポリペプチドの投与に用いることができる。この特徴に着目し、われわれ¹³⁾¹⁴⁾は、脳由来神経栄養因子(BDNF)およびインスリン様細胞成長因子(IGF)1 の経正円窓膜的投与にゼラチンハイドロゲルの応用を試みた。BDNF 含浸させたハイドロゲルをモルモット正円窓膜上に留置し、経時的に蝸牛外リンパ液中の BDNF 濃度を調べたところ、1 週間以上の徐放効果が確認された。また、ゼラチンハイドロゲルによる BDNF

投与で蝸牛ラセン神経節の保護効果を検証したところ、組織学的、機能的な保護効果が認められた。IGF 1 については、音響外傷に対する蝸牛保護効果を検討した。その結果、ゼラチンハイドロゲルによる IGF 1 投与により、音響外傷による感音難聴を防止することができ、組織学的に蝸牛有毛細胞の細胞死を防御できることが判明した。以上の結果から、ゼラチンハイドロゲルは蝸牛への細胞増殖因子や神経栄養因子などのポリペプチドの投与方法として優れた方法であることがわかった。現在、ゼラチンハイドロゲルを用いて、IGF 1 投与による急性高度難聴治療の臨床応用の準備をおこなっている。

おわりに

近年の内耳障害、ことに感音難聴に関する基礎的研究成果には目をみはるものがあり、将来の遺伝子治療や細胞治療などの新しい治療法の開発を期待させる。しかしながら、このような新しい治療法の臨床応用に際しても、いかにして内耳に分子あるいは薬物を到達させるのかという問題がある。本稿で述べた内耳 DDS は、このような新しい治療法の研究開発にも応用可能であり、内耳障害治療に対する応用実験の展開が期待される。また、感音難聴の薬物治療の分野における早期の臨床応用が望まれる。

文 献

- 1) Angelborg C *et al* : The microsphere method for studies of inner ear blood flow. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **50** : 355-362, 1998
- 2) Juhn SK *et al* : Blood-labyrinth barrier and fluid dynamics of the inner ear. *Int Tinnitus J* **7** : 72-83, 2001
- 3) Ersner MS : Transtympanic injection of anesthetics for the treatment of Menière's Syndrome. *AMA Arch Otorhinolaryngol* **54** : 43-52, 1951
- 4) Schuknecht HF : Ablation therapy for the relief of Meniere's disease. *Laryngoscope* **66** :

- 859-870, 1956
- 5) Guan-Min H *et al* : Effectiveness of intratympanic dexamethasone injection in sudden-deafness patients as salvage treatment. *Laryngoscope* **114** : 1184-1189, 2004
 - 6) Salt AN *et al* : Local inner-ear drug delivery and pharmacokinetics. *Drug Discov Today* **10** : 1299-1306, 2005
 - 7) Lefebvre PP *et al* : Steroid perfusion of the inner ear for sudden sensorineural hearing loss after failure of conventional therapy : a pilot study. *Acta Otolaryngol* **122** : 698-702, 2002
 - 8) Plontke S *et al* : Outcomes research analysis of continuous intratympanic glucocorticoid delivery in patients with acute severe to profound hearing loss : basis for planning randomized controlled trials. *Acta Otolaryngol* **125** : 830-839, 2005
 - 9) Arnold W *et al* : Novel slow- and fast-type drug release round-window microimplants for local drug application to the cochlea : An experimental study in guinea pigs. *Audiol Neurotol* **10** : 53-63, 2005
 - 10) Tamura T *et al* : Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* **115** : 2000-2005, 2005
 - 11) Nakagawa T *et al* : Drug delivery systems for the treatment of sensorineural hearing loss. *Acta Otolaryngol* in press
 - 12) Maeda Y *et al* : *In vitro* and *in vivo* suppression of GJB 2 expression by RNA interference. *Hum Mol Genet* **14** : 1641-1650, 2005
 - 13) Endo T *et al* : A novel strategy for treatment of inner ears using a biodegradable gel. *Laryngoscope* **115** : 2016-2020, 2005
 - 14) Iwai K *et al* : Cochlear protection by local IGF-1 application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* **116** : 526-533, 2006

Abstract

The effects of transient cochlear ischemia on spiral ganglion cells (SGCs) were studied in Mongolian gerbils. Ischemic insult was induced by occluding the bilateral vertebral arteries of gerbils for 15 min. Seven days after ischemia, the percentage of SGCs decreased to 67.5% from the preischemic baseline in the basal turn. Evaluation with immunohistochemical staining showed TUNEL-positive reactions in the SGCs with fragmented nuclei.

In addition, we investigated the protective effects of ginsenoside Rb1 (gRb1) against ischemic injury to SGCs. Seven days after ischemia, the auditory brainstem response threshold shift was significantly reduced and the percentage of SGCs decreased to 90.2% from the preischemic baseline in the basal turn in the gRb1-treated group. These findings suggest that gRb1 prevented hearing loss caused by ischemic injury to SGCs in Mongolian gerbils.

Key words: Transient cochlear ischemia; Spiral ganglion cells; Ginsenoside Rb1; TUNELstaining; Bcl-xL protein

Ischemic injury is a major cause of acute sensorineural hearing loss [1–3]. We thus evaluated the pathology of transient cochlear ischemia in Mongolian gerbils. In these animals, the posterior cerebral communicating arteries are lacking and the labyrinthine arteries are nourished solely by the vertebral arteries. We previously showed that inner hair cells are more vulnerable to damage via the apoptotic process than outer hair cells and that transient ischemia for 5 min caused delayed cell death in the spiral ganglion [4–8]. However, the mechanism of neuronal damage to spiral ganglion cells (SGCs) has not been clarified.

Ginseng root is widely prescribed in Asian countries for a variety of ailments. Ginsenoside Rb1 (gRb1) is the main ingredient of ginseng root. In the brain, gRb1 has been shown to prevent apoptotic cell death via regulation of the Bcl-xL protein, which inhibits apoptosis by preventing the release of cytochrome c in the cell death pathway [9]. In the present study, we investigated the effects of transient cochlear ischemia on SGCs and evaluated whether postischemic intravenous infusion of gRb1 in this setting could prevent SGC degeneration.

The following study was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation of Ehime University School of Medicine, Japan. Adult male Mongolian gerbils weighing 60–80 g were used as subjects. Transient cochlear ischemia was induced in the animals by temporarily occluding the vertebral arteries bilaterally in the neck, as described by Hata et al. [10].

The hearing ability of animals that treated with gRb1 was assessed by sequential recording of ABR. Measurements were made before and 4 and 7 days (n=6 each) after the ischemia insult. The ABR in response to an 8,000-Hz tone burst (0.5-ms rise/fall time and 10-ms duration) was measured using a signal processor (NEC Synax 1200; NEC Medical Systems, Tokyo, Japan). This frequency was selected because we previously found that the higher-frequency region of the cochlea was more vulnerable to ischemic injury than the middle or lower-frequency regions [8]. The average ABR thresholds in control and gRb1-treated group were analyzed using a two-tailed Mann-Whitney *U*-test.

Ginsenoside Rb1 was isolated and purified from the crude saponin fraction in the rhizome of Korean red ginseng (*Panax ginseng*, C.A. Meyer) by repeated-column chromatography on silica gel with CHCl₃–MeOH–H₂O (65:35:10) and on octadecylsilyl (ODS) silica with MeOH–H₂O (1:1–7:3) [11]. GRb1 was then dissolved in isotonic saline. A total of 200 μ L of gRb1 solution (50 μ g/200 μ L) was injected into the left femoral veins of the gRb1 group (n = 3) and 200 μ L of saline was injected into the left femoral veins of the control group (n = 3) 1 h after ischemia.

To determine SGC survival, the six gerbils were anesthetized deeply, killed 7 days after ischemia, and fixed by cardiac perfusion (4% paraformaldehyde in phosphate buffer). After decalcification in EDTA and embedding in paraffin, 6- μm sections were cut from the gerbils in a paramodiolar plane. Every fourth section was mounted on a glass slide and stained with hematoxylin–eosin. Six sections were randomly selected from the 10 most mid-modiolar sections from each animal and used in the quantitative analysis of the SGCs. Counting was performed in a double-blind fashion. All neurons meeting the size and shape criteria to be considered type I SGCs within each profile of Rosenthal's canal in the basal turn were counted. The outline of the Rosenthal's canal profile was then traced to generate a SGC density, expressed as the density of SGC in an area of 10,000 μm^2 . The baseline average number of SGCs was counted from six animals without ischemia. This baseline average was used to calculate the percentage of lost SGCs 7 days after ischemia. Statistical assessment of the differences in the SGC densities between the study groups was performed with analysis of variance and Student's *t* test.

Double-stranded DNA breaks were detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) using specimens from six gerbils 1 day after ischemia. An apoptosis in situ detection kit (Roche, Mannheim, Germany) was used for the TUNEL staining. Deparaffinized sections were washed with distilled water and treated with proteinase K for 5 min at 37°C. After washing three times with 0.01 M phosphate-buffered saline (PBS), the sections were treated with TdT solution for 10 min at 37°C. To block endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide for 5 min at room temperature. Peroxidase-conjugated antibody was applied for 10 min at 37°C. After washing with 0.01 M PBS, nick end-labeling was visualized with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution.

For the Bcl-xL immunostaining, six gerbils were used 1 day after ischemia. The sections from both the gRb1 and control groups were deparaffinized and exposed to 5% normal horse serum (NHS) in PBS for 1 h. The sections were subsequently incubated for 12 h with rabbit anti-Bcl-xL antibody (1:2000 dilution; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), flooded for 1 h with biotin-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:400 dilution; DAKO Cytomation Co., Kyoto, Japan) in 1% NHS-PBS, and incubated in biotinylated tyramine solution containing 0.01% H_2O_2 . The sites of bound primary antibodies were visualized after incubating the sections with ABC reagent (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Sections from each animal were immunostained in the same run for between-group comparisons.

The fine structure of the SGCs was evaluated with transmission electron microscopy (TEM). Four animals were killed 1 day after ischemia. Immediately following removal of

both otic bullae during deep anesthesia, the cochleae were perfused with 2.5% glutaraldehyde. The cochleae were then removed, immersed for 8 h in the same fixative at 4°C, and dissected in PBS (pH 7.4). Pieces of the organ of Corti were used for whole-mount staining and TEM analysis. The specimens were postfixed with 2% osmium tetroxide for 1 h at room temperature. Following dehydration, the specimens were embedded in epoxy resin. Sections were cut with an ultramicrotome and stained with uranyl acetate and lead citrate. The cochleae were then observed with a TEM (H300; Hitachi, Tokyo, Japan).

The average increase in the ABR threshold was 22.5 ± 2.9 dB on the seventh day after inducing ischemia with saline treatment. In contrast, the ABR threshold increased to 14.2 ± 3.8 dB in ischemic animals treated with gRb1. The average increase in the ABR threshold 7 days after inducing ischemia was significantly lower in animals treated with gRb1 than in saline-treated animals ($P < 0.05$) (Fig1).

Figure 2 shows the representative sections of Rosenthal's canal in the base of the cochlea from a control subject (Fig. 2a) and a gRb1-treated subject (Fig. 2b). Seven days after ischemia, the mean percentage decrease in SGCs was 30.6 ± 2.1 , 16.0 ± 7.8 , and $7.5 \pm 1.8\%$ at the basal, second, and apical turns, respectively. These results show that SGCs at the basal turn were more vulnerable than those at the second and apical turns. Therefore, we investigated the effect of gRb1 on ischemic damage to SGCs in the basal turn.

Before ischemia, the average number of SGCs in the basal turn was $28.1/10,000 \mu\text{m}^2$. Seven days after ischemia, the average number of SGCs in the basal turn was $25.8/10,000 \mu\text{m}^2$ in the gRb1 group and $19.3/10,000 \mu\text{m}^2$ in the control group. The mean percentage loss of SGCs in the gRb1 group was $8.0 \pm 4.7\%$, which was significantly smaller than the $30.6 \pm 2.1\%$ loss observed in the control group ($P < 0.05$; Fig. 3). Injection of gRb1 resulted in enhanced survival of SGCs 7 days after ischemia.

Ischemia induced TUNEL-positive reactions in SGCs with fragmented nuclei (Fig. 4a). Few TUNEL-positive cells were observed in the basal turn of the cochleae in animals administered gRb1 (Fig. 4b). The mean percentage of TUNEL-positive cells in the specimens 1 day after ischemia was $24.4 \pm 7.8\%$ for animals treated with saline and $4.1 \pm 2.9\%$ for animals treated with gRb1.

After Bcl-xL immunostaining, strongly stained cells were present throughout the basal turn in the gRb1 group (Fig 5c). Weak immunopositive cells were detected in the control group (Fig. 5b) or in specimens not exposed to the antibodies (data not shown). The results of the immunostaining for Bcl-xL were classified by two evaluators, who were blind to the treatment the animals had received, into four categories: no, mild, moderate,

and strong staining. Table 1 summarizes the results of the immunostaining for Bcl-xL into four categories.

The ultrastructure of the SGCs was analyzed in the cochlear sections. Under electron microscopy, we observed the appearance of nuclear fragmentation and irregularly shaped nuclei in the control group (Fig. 6a), whereas most of the cells in the gRb1-treated group had regularly shaped nuclei (Fig. 6b). We further distinguished SGCs as types I and II under electron microscopy. Dysmorphologic nuclei were observed in 36.9% of type I SGCs and 18.5% of type II SGCs. We postulate that type I SGCs were more vulnerable than type II SGCs.

As primary auditory neurons, SGCs play an important role in hearing. In patients with severe sensorineural hearing loss, the only therapeutic intervention is a cochlear implant, which electrically stimulates residual primary auditory neurons to provide the patients with auditory cues required for speech perception. Most studies in humans and animals have shown that spiral ganglion neurons are lost following the loss of hair cells, particularly as a result of ototoxic drugs, noise exposure, and aging [12–14]. Results from these studies suggest that degeneration of the auditory nerve is a slow process that occurs over months or years. In contrast, the application of ouabain, which binds to Na⁺, K⁺-ATPase and blocks its activity in the cochlea, has been reported to result in a rapid loss of SGCs via apoptotic cell death [15,16]. However, the mechanism of ischemic injury has not been elucidated. We induced ischemic injury in gerbils for 15 min and observed an agglomeration of chromatin and aberrant nuclei via electron microscopy 1 day after ischemia. Additionally, apoptotic cells were detected by the TUNEL method. These findings indicate that ischemic injury is caused by apoptotic cell death in SGCs. The percentage of SGCs decreased to 68.5% from the preischemic baseline in the basal turn 7 days after ischemic injury. This is the first study to report how ischemic injury induces apoptotic cell death in SGCs and the degree of degeneration that ensues.

Ginseng root is an important component of treatment in many Asian countries and consists of two major ingredients: crude ginseng saponin and nonsaponin fractions. To date, more than 40 saponins have been isolated from ginseng root and identified chemically. The saponins can be classified into three major groups according to their chemical structures: protopanaxadiol, protopanaxatriol, and oleanolic acid. Ginsenoside Rb1 (gRb1), ginsenoside Rg1, and ginsenoside Ro are representative substances [17]. Zhang et al. reported that gRb1 rescued cortical neurons in the ischemic penumbra and reduced the cortical infarct volume by approximately 50%. Their report demonstrated that gRb1 deregulated the expression of Bcl-xL, which is known to suppress activation of procaspase-9 by forming a complex with Apaf-1. This, in turn, prevents the release of

cytochrome c from mitochondria, thereby maintaining cell viability and cell survival [9]. In the present study, postischemic administration of gRb1 preserved the configuration of the spiral ganglion and decreased the number of TUNEL-positive cells with obvious expression of Bcl-xL 1 day after ischemia. We postulated that gRb1 may suppress apoptotic cell death in SGCs by activating the Bcl-xL signaling pathway. We observed decreased degeneration of SGCs in the basal turn of gRb1-treated animals 7 days after ischemia compared to untreated controls. Our results suggest that the administration of gRb1 prevented apoptotic cell death signaling in SGCs and minimized injury resulting from cochlear ischemia.

Many substances and drug delivery systems specific to the inner ear are in development, with some under evaluation in animal experiments or clinical studies. Intravenous administration of gRb1 has been shown to rescue cortical neurons in ischemic injury [9]. Our findings suggest that gRb1 may be effective in the treatment of sensorineural hearing loss. Further research is required to reveal the protective effect of gRb1 against long-term damage to SGCs caused by cochlear ischemia.

We performed a histological examination of the cochleae to determine SGC degeneration caused by transient cochlear ischemia. Seven days after ischemia, the number of SGCs decreased in the basal turn. In addition, we investigated the neuroprotective effect of gRb1 against ischemic injury and our results demonstrated a significant protective effect against SGC degeneration via the suppression of the apoptotic cell death pathway. Therefore, gRb1 may be effective for the treatment of sensorineural hearing loss that eventually follows transient ischemia of the cochlea.

References

1. R. Gussen, Sudden deafness of vascular origin: a human temporal bone study, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 85 (1976) 94-100.
2. R.R. Cole, R.A. Jahrsdoerfer, Sudden hearing loss: an update, *Am. J. Otol.* (1988) 211-215.
3. J.S. Kim, I. Lopez, P.L. DiPatre, F. Liu, A. Ishiyama, R.W. Baloh, Internal auditory artery infarction: clinicopathologic correlation, *Neurology* 52 (1999) 40-44.
4. N. Hakuba, K. Koga, M. Shudou, F. Watanabe, A. Mitani, K. Gyo, Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils, *J. Comp. Neurol.* 418 (2000) 217-226.
5. F. Watanabe, K. Koga, N. Hakuba, K. Gyo, Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils, *Neuroscience* 102 (2001) 639-645.
6. J. Hyodo, N. Hakuba, K. Koga, F. Watanabe, M. Shudou, M. Taniguchi M, Hypothermia reduces glutamate efflux in perilymph following transient cochlear ischemia, *Neuroreport* 12 (2001) 1983-1987.
7. M. Taniguchi, N. Hakuba, K. Koga, F. Watanabe, J. Hyodo, K. Gyo, Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils, *Neuroreport* 13 (2002) 2459-2462.
8. K. Koga, N. Hakuba, F. Watanabe, M. Shudou, T. Nakagawa, K. Gyo, Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti: an experimental study in gerbils, *J. Comp. Neurol.* 456 (2003) 105-111.
9. B. Zhang, R. Hata, P. Zhu, K. Sato, T.C. Wen, L. Yang L, Prevention of ischemic neuronal death by intravenous infusion of a ginseng saponin, ginsenoside Rb(1), that upregulates Bcl-x(L) expression, *J. Cereb. Blood Flow. Metab.* 26 (2006) 708-721.
10. R. Hata, M. Matsumoto, T. Hatakeyama, T. Ohtsuki, N. Handa, N. Niinobe N, Differential vulnerability in the hindbrain neurons and local cerebral blood flow during bilateral vertebral occlusion in gerbils, *Neuroscience* 56 (1993) 423-439.
11. H. Samukawa, H. Yamashita, H. Matsuda, M. Kubo, Simultaneous analysis of saponins in Ginseng Radix by high performance liquid chromatography, *Chem. Pharm. Bull* 43 (1995) 137-141.
12. N.Y. Kiang, M.C. Liberman, R.A. Levine, Auditory-nerve activity in cats exposed to ototoxic drugs and high-intensity sounds, *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 85 (1976) 752-768.
13. B.M. Ryal, B.Ten Eyck, E.W. Westbrook, Ganglion cell loss continues during hair cell regeneration, *Hear. Res.* 43 (1989) 81-90.
14. E.M. Keithley, M.L. Feldman, Spiral ganglion cell counts in an age-graded series of

rat cochleas, *J. Comp. Neurol.* 188 (1979) 429-442.

15. R.A. Schmiedt, H.O. Okamura, H. Lang, B.A. Schulte, Ouabain application to the round window of the gerbil cochlea: a model of auditory neuropathy and apoptosis, *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 3 (2002) 223-233.

16. H. Lang, B.A. Schulte, R.A. Schmiedt, Ouabain induces apoptotic cell death in type I spiral ganglion neurons, but not type II neurons, *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* 6 (2005) 63-74.

17. S. Shibata, O. Tanaka, J. Shoji, H. Saito, *Chemistry and pharmacology of Panax. Economic and medicinal plant research*, Philadelphia: World Scientific (1994) 217-284.

Legends

Fig. 1. Changes in the auditory brainstem response (ABR) threshold following transient cochlear ischemia. The ABR was measured in response to an 8000-Hz tone burst. The ABR threshold before ischemia was defined as 0dB. * $P < 0.05$ versus the control.

Fig. 2. Representative sections of Rosenthal's canal in the base of the cochlea from a control subject (a) and a gRb1-treated subject (b). A clear difference was observed in the survival of these subjects. Scale bar = 60 μm .

Fig. 3. The percentage decrease of SGCs in the basal turn 7 days after ischemic injury. SGC degeneration was significantly lower in the gRb1-treated group compared to the control group ($P < 0.01$).

Fig. 4. Light microscopic photograph of TUNEL staining in the spiral ganglion. TUNEL-positive cells were observed in the spiral ganglion of control animals (a), whereas no TUNEL-positive cells were observed in gRb1-treated animals (b). Scale bar = 60 μm .

Fig. 5. Immunostaining for Bcl-xL before ischemia (a), 1 day after ischemia in the spiral ganglion of controls (b) and gRb1-treated animals (c). Ginsenoside Rb1 increased the expression of Bcl-xL 1 day after ischemia in the spiral ganglion. Scale bar = 60 μm .

Fig. 6. Electron micrographs of the spiral ganglion 1 day after ischemia in controls (a) and gRb1-treated animals (b). (a) The SGC of the control animal has an indented nucleus with condensed chromatin (arrow). (b) The SGC of the gRb1-treated animal appears normal. Scale bar = 5 μm .

Table 1. Summary of immunostaining for Bcl-xL

0: no staining; +: mild staining; ++: moderate staining; +++: strong staining; +gRb1: animals given ginsenoside Rb1; control: before the induction of ischemia; D1: 1 day after the induction of ischemia.

