

3. Bcl-2の免疫染色 (図3)

コルチ器では内有毛細胞、外有毛細胞、ダイテルス細胞にBcl-2の発現を認めた。sham-op群の免疫染色強度を基準にすると、内有毛細胞の免疫染色強度は、虚血-生食群が 1.019 ± 0.009 であったのに対し、虚血-PDP 2.0mg/kg群は 1.089 ± 0.029 であり、PDP 2.0mg/kg投与によりBcl-2の発現は増加した。

考 察

プロサポシンは正常ラットの蝸牛内にも存在する。蝸牛を採取してプロサポシンに対する免疫染色を行うと、コルチ器では内有毛細胞、ダイテルス細胞、外柱細胞、ヘンゼン細胞に、血管条では辺縁細胞や基底細胞に、またラセン神経節ではI型神経細胞に免疫反応が認められた¹⁹⁾ (図4)。注目すべきは、染色標本の電子顕微鏡所見で血管条表面の分泌顆粒内にプロサポシンの免疫反応がみられたことで、これはプロサポシンが内リンパ腔へ分泌されていることを意味する。また、プロサポシンmRNAのシグナルが血管条やラセン神経節に強く発現しており、プロサポシン合成がこれらの部位で盛んであることを示唆している。これらの所見から、プロサポシンは蝸牛の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられている。

これまでの研究からPDPが血液-脳脊髄関門を通過することは知られているが²⁰⁾、血液-迷路関門についての報告はない。今回の実験で、PDPの皮下投与が

有効であったことから、PDPは容易に血液-迷路関門を通過するものと思われ、投与方法としても臨床的意義が高い。

一過性内耳虚血による細胞障害においては、フリーラジカルやグルタミン酸、NOなど様々な有害刺激が作用しアポトーシスが惹起されると考えられる。PDPは神経栄養因子としてアポトーシス抑制効果を有しているが、そのメカニズムはMAPK経路のRaf-MEK-ERK-p90RSK/Erk-1シグナルカスケードを活性化させることによるという説^{21) 22)} や、Akt経路を介しcaspase-3、-7、-9の発現・活性を抑制することによるという説²³⁾ がある。

Bcl-2はミトコンドリアで産生される重要なアポトーシス抑制因子の一つである。Bcl-2の発現増加によりcaspaseは抑制され神経細胞死は防御される²⁴⁾。今回の実験では虚血4日後の虚血-PDP 2.0mg/kg群の内有毛細胞にBcl-2の発現増加を認めた。神経栄養因子の一つである線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) はERK/MEKシグナル経路を介して、アポトーシス抑制因子であるBcl-2の発現増加とアポトーシス誘導タンパクであるBaxやcaspaseの発現抑制を誘導する^{25) 26)}。PDPもFGF-2と同様のメカニズムでBcl-2発現を増加させられると思われるが、詳細については今後の検討課題であろう。

本研究の結果、虚血後のPDP投与により内耳障害が防御されABR閾値上昇が抑制されたことから、PDPは内耳障害に対して有効な治療薬となる可能性が示唆された。

(寺下健洋)

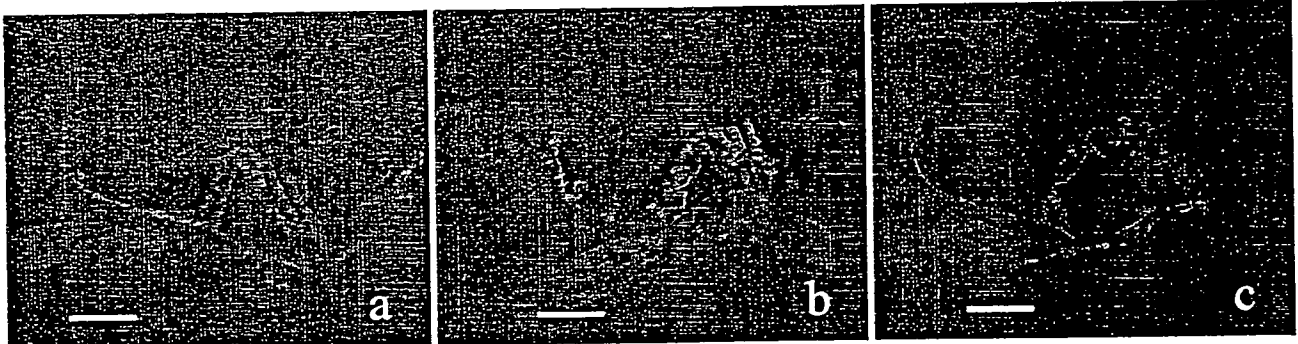


図3 コルチ器におけるBcl-2の免疫染色像

内有毛細胞や外有毛細胞、ダイテルス細胞にBcl-2の発現が認められた。
(a) sham-op群、(b) 虚血-PDP 2.0mg/kg 投与群、(c) 虚血-生食群。(scale bar=50μm)

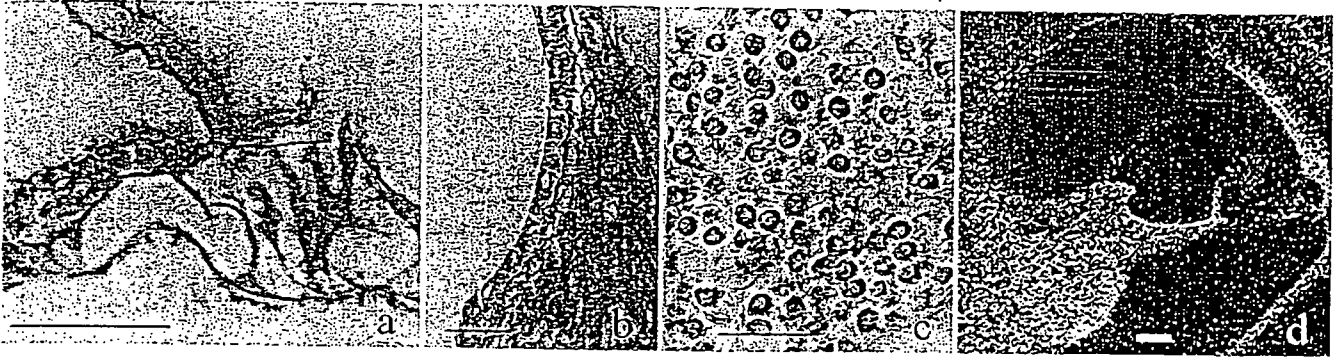


図4 ラット蝸牛におけるプロサポシンの局在

(a) コルチ器では内有毛細胞、ダイテルス細胞、外柱細胞、ヘンゼン細胞に、(b) 血管条では辺縁細胞、基底細胞に、(c) ラセン神経節ではI型神経細胞に、強いプロサポシンの免疫反応を認めた。(d) in situ hybridizationでは、血管条やラセン神経節において強いシグナル発現がみられたが、コルチ器では弱かった。
(scale bar=50 μ m)

参考文献

- 1) O'Brien JS, Kishimoto Y : Saposin proteins : Structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J* 1991 ; 5 : 301-308.
- 2) Kishimoto Y, Hiraiwa M, O'Brien JS : Saposins : structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res* 1992 ; 33 : 1255-1267.
- 3) Hiraiwa M, O'Brien JS, Kishimoto Y, Galdzicka M, Fluharty AL, et al : Isolation, characterization and proteolysis of human prosaposin, the precursor of saposins (sphingolipid activator proteins). *Arch Biochem Biophys* 1993 ; 304 : 110-116.
- 4) Kondoh K, Sano A, Kakimoto Y, Matsuda S, Sakanaka M : The distribution of prosaposin like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol* 1993 ; 334 : 590-602.
- 5) Sano A, Hineno T, Mizuno T, Kondoh K, Ueno S, et al : Sphingolipid hydrolase activator proteins and their precursors. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 ; 165 : 1191-1197.
- 6) 小谷泰教, 佐野 輝 : プロサポシンの神経栄養因子作用. *神経科学* 1996 ; 35 : 758-766.
- 7) Hiraiwa M, Campana WM, Wang CY, Otero DA, O'Brien JS : A retro-inverso Prosaptide D5 promotes a myelination process in developing rats. *Brain Res Dev Brain Res* 2001 ; 28 : 73-76.
- 8) 細田能希, 齊藤正一郎, 小林直人, 寺下健洋, 松田正司, 他 : ラット神経系内のプロサポシンの分布. *愛媛医学* 2005 ; 24 : 29-34.
- 9) Hiraiwa M, Taylor EM, Campana WM, Darin SJ, O'Brien JS : Cell death prevention, mitogen-activated protein kinase stimulation, and increased sulfatide concentrations in Schwann cells and oligodendrocytes by prosaposin and prosaptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 4778-4781.
- 10) 近藤啓次, 佐野 輝 : 先天代謝異常症候群. *日本臨床* 1998 ; 19 : 414-416.
- 11) Bradova V, Smid F, Ulrich-Bott B, Roggendorf W, Paton BC, et al : Prosaposin deficiency : further characterization of the sphingolipid activator protein deficient sibs. *Hum Genet* 1993 ; 92 : 143-152.
- 12) Levy H, Or A, Eyal N, Wilder S, Widgerson M, et al : Molecular Aspects of Gaucher Disease. *Dev Neurosci* 1991 ; 13 : 352-362.
- 13) Kotani Y, Matsuda S, Wen TC, Sakanaka M, Tanaka J, et al : A hydrophilic peptide comprising 18 amino acid residues of the prosaposin sequence has neurotrophic activity in vitro and in vivo. *J Neurochem* 1996 ; 66 : 2197-2200.
- 14) O'Brien JS, Carson GS, Seo HC, Hiraiwa M, Weiler S, et al : Identification of the neurotrophic factor sequence of prosaposin. *FASEB J* 1995 ; 9 : 681-685.
- 15) Sano A, Matsuda S, Wen TC, Kotani Y, Kondoh K, et al : Protective effects of prosaposin against ischemia-induced learning disability and neuronal loss. *Biochem Biophys Res Commun* 1994 ; 204 : 994-1000.
- 16) Kotani Y, Matsuda S, Sakanaka M, Kondoh K, Ueno S, et al : Prosaposin facilitates sciatic nerve regeneration in vivo. *J Neurochem* 1996 ; 66 : 2019-2025.
- 17) Calcutt NA, Campana WM, Eskeland NL, Mohiuddin L, Dines KC, et al : Prosaposin gene expression and the efficacy of a prosaposin-derived peptide in preventing structural and functional disorders of peripheral nerve in diabetic rats. *J Neuropathol Exp Neurol* 1999 ; 58 : 628-636.
- 18) Liu J, Wang CY, O'Brien JS : Prosaptide D5, a retro-inverso 11-mer peptidomimetic, rescued dopaminergic neurons in a model of Parkinson's disease. *FASEB J* 2001 ; 15 : 1080-1082.
- 19) Terashita T, Saito S, Miyawaki K, Hyodo M, Kobayashi N, et al : Localization of prosaposin in rat cochlea. *Neurosci Res* 2007 ; 57 : 372-378.
- 20) Taylor EM, Otero DA, Banks WA, O'Brien JS : Retro-inverso prosaptide peptides retain bioactivity, are stable in vivo, and are blood-brain barrier permeable. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 ; 295 : 190-194.
- 21) Campana WM, Hiraiwa M, O'Brien JS : Prosaptide activates

the MAPK pathway by a G-protein-dependent mechanism essential for enhanced sulfatide synthesis by Schwann cells. *FASEB J* 1998 ; 12 : 307-314.

- 22) Koochekpour S, Sartor O, Lee TJ, Zieske A, Patten DY, et al : Prosaptide TX14A stimulates growth, migration, and invasion and activates the Raf-MEK-ERK-RSK-Elk-1 signaling pathway in prostate cancer cells. *Prostate* 2004 ; 61 : 114-123.
- 23) Lee TJ, Sartor O, Luftig RB, Koochekpour S : Saposin C promotes survival and prevents apoptosis via PI3K/Akt-dependent pathway in prostate cancer cells. *Mol Cancer* 2004 ; 3 : 31.
- 24) Martinou JC, Dubois-Dauphin M, Staple JK, Rodriguez I, Frankowski H, et al : Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron* 1994 ; 13 : 1017-1030.
- 25) Rios-Munoz W, Soto I, Duprey-Diaz MV, Blagburn J, Blanco RE : Fibroblast growth factor 2 applied to the optic nerve after axotomy increases Bcl-2 and decreases Bax in ganglion cells by activating the extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Neurochem* 2005 ; 93 : 1422-1433.
- 26) Pardo OE, Arcaro A, Salerno G, Raguz S, Downward J, et al : Fibroblast growth factor-2 induces translational regulation of Bcl-XL and Bcl-2 via a MEK-dependent pathway : correlation with resistance to etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002 ; 277 : 12040-12046.

IV. 内耳障害の防御と治療

3. インシュリン様細胞増殖因子1 (IGF-1)

【要約】ゼラチンハイドロゲルはイオン結合による薬剤保持機能を有する生体吸収性材料であり、生体内では分解されて徐々に薬剤を放出することから、一度投与すれば長期にわたる薬効が期待できる。新しいメカニズムによるdrug delivery system (DDS) の一つとして注目されている。本研究ではゼラチンハイドロゲルにインスリン様細胞成長因子1 (IGF-1) を結合させ、これを一過性内耳虚血動物の鼓室内に投与し、内耳障害の防御効果を検討した。虚血負荷30分後に耳胞を開放して正円窓上にゲルを留置したところ、7日後には内有毛細胞の脱落やABR 閾値上昇は有意に抑制された。突発性難聴の原因は不明であるが、虚血の関与が疑われる症例は少なくない。IGF-1含有ゼラチンハイドロゲルを鼓室に投与する方法は、簡便で副作用も少なく突発性難聴の有望な治療法になりうる。

はじめに

内耳障害の治療にはステロイドやエダラボン、プロスタグランジンE1等の薬剤が使用されるが、通常、投与は経口や経静脈的に行われる。しかし、人では内耳の血流量は心拍出量の百万分の一に過ぎず、血液-内耳関門も存在するため、全身投与した薬剤が内耳に到達するのは微量に留まる¹⁾。とりわけ虚血が原因であれば内耳血流障害が背景にあるので、投与薬剤のほとんどは内耳に到達しない。このような場合、薬剤投与の経路として正円窓ルートが重要となる。

インシュリン様細胞増殖因子 (Insulin like growth factor-1、以下IGF-1) は、ソマトメジンCと呼ばれる70個のアミノ酸からなる単鎖ポリペプチドで、アミノ酸配列がインスリンと極めて類似した細胞増殖因子の一つである。IGF-1はgrowth hormone (GH) による刺激で主に肝臓で産生されるが、内耳を含め生体のほぼ全ての細胞がレセプターを有している。IGF-1の作用は有糸分裂の誘導とされ、細胞の成長・発達に不可欠なポリペプチドである²⁾。IGF-1には内耳の保護、再生誘導効果があることも報告されており^{3) 4)}、急性感音難聴の新しい治療薬として期待されている。

一般に細胞増殖因子は高分子蛋白であり、生体内では代謝が速く不安定であり、薬剤として効果を発揮するためには頻回投与が必要である。しかし、正円窓への頻回投与は鼓膜が存在するため手技的に煩雑であり、患者の負担も大きい。現在、内耳疾患に対するdrug delivery system (以下DDS) として、ミニポンプの埋め込み^{5) 6)}、ウイルスベクターによる遺伝子導入^{7) 8)}、生体吸収性ゼラチンハイドロゲル投与^{9) 10) 11)}などが報告されている。ミニポンプ法は、皮下に埋め込んだポンプの先端を正円窓窩に挿入し、薬物を投与する方法であるが、中耳や内耳に大きな手術操作を加える必要があり、手技的にも困難なため普及には至っていない。遺伝子導入法はベクターとしてアデノウイルスを用いる方法が実験的に確立されているが、投与されたウイルスのリスクが完全には否定できない。ゼラチンハイドロゲルは、細胞増殖因子とイオン結合したゼラチンが徐々に分解・吸収されることで、増殖因子を徐放する。このゼラチンハイドロゲルは、投与手技が簡便で安全性も確立されており^{12) 13) 14)}、現在、臨床応用が最も期待されている方法である。

本研究では一過性内耳虚血の動物モデルにおいて、IGF-1ゼラチンハイドロゲルを正円窓上に留置し、その内耳障害保護効果を検討した。

対象と方法

1. 対象および内耳虚血モデルの作製方法

実験動物には生後12-24週、体重60-80 gの雄のスナネズミ12匹 (IGF-1投与群6匹、コントロール群6匹) を用いた。虚血負荷には、これまでと同様の方法を用いた。両側の椎骨動脈の虚血時間は15分とした。

2. IGF-1

IGF-1には遺伝子組み換え技術により製造された recombinant human IGF-1 (ソマゾン®、アステラス製薬) を使用した。生理食塩水に溶解したIGF-1 (100 μg/10 μl) を、生体吸収性ゼラチンハイドロゲル1 mgに添加し、24時間含浸した。IGF-1の濃度は、騒音性難聴マウスの研究結果¹¹⁾ を参考に設定した。

3. 生体吸収性ゼラチンハイドロゲル

生体吸収性ゼラチンハイドロゲルは京都大学再生研究所の田畑泰彦教授らが開発したものであり、同大学耳鼻咽喉科の中川隆之博士より供給を受けた。ゼラチン水溶液にグルタルアルデヒドを加えて化学架橋し、凍結乾燥した。徐放速度が変化可能なグルタルアルデヒド濃度は60ml/Lとした¹⁵⁾。この濃度でBDNFやbFGFをハイドロゲルに加え生体内に投与したところ、1週間で徐放することが確認されている^{11) 16)}。

4. IGF-1含有ゼラチンハイドロゲルの投与方法

内耳虚血を負荷した30分後、ハロセン吸入麻酔下にて耳胞を開放し、ハイドロゲル1 mg (IGF-1量100 μg) を正円窓上に留置した (図1)。IGF-1含有ハイドロゲルを投与した群をIGF-1投与群、蒸留

水を含むしたハイドロゲルを投与した群をコントロール群とした。

5. ABR測定

刺激音には8 kHzのトーンバーストを用い、加算回数は300回とした。ABR測定は虚血前、虚血1日後、4日後、7日後に行い、IGF-1投与群およびコントロール群の2群間で域値の変化を比較した。

6. 組織学的検討

虚血7日後に断頭し、速やかに蝸牛骨胞を摘出した。前庭窓、蝸牛窓を開放し、蝸牛頂回転に設けた小孔より4%パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行った。さらに同液にて2時間浸漬固定後、surface preparationにて基底回転のコルチ器を採取してRhodamine-phalloidin染色を行い、光学顕微鏡下に観察して内毛細胞の脱落割合 (%) を算定した。

結果

IGF-1含有ゼラチンハイドロゲルを投与したスナネズミには明らかな副作用は生じず、処置後7日目までのABRおよび組織学的検討を遂行できた。ABRの測定結果を図2に示す。聴力域値はIGF-1投与群が1日後: 23.3±6.2dB、4日後: 31.6±3.7dB、7日後: 24.1±6.0dBであったのに対し、コントロール群は1日後: 47.5±6.9dB、4日後: 43.3±6.2dB、7日後: 35.0±7.0dBと、いずれの検査日においても上昇していた。これらの結果は統計学的にも有意差がみられ、IGF-1投与は虚血によるABR閾値上昇を抑制することが確認された。

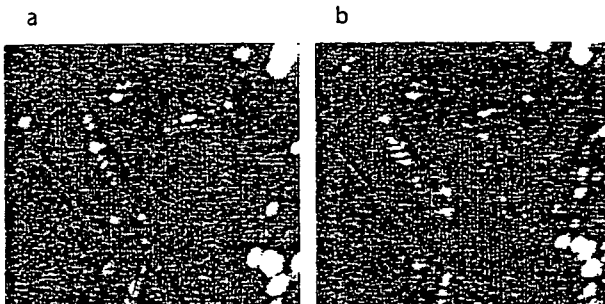


図1 IGF-1ハイドロゲルの正円窓上への留置

(a) 留置前, (b) 留置後

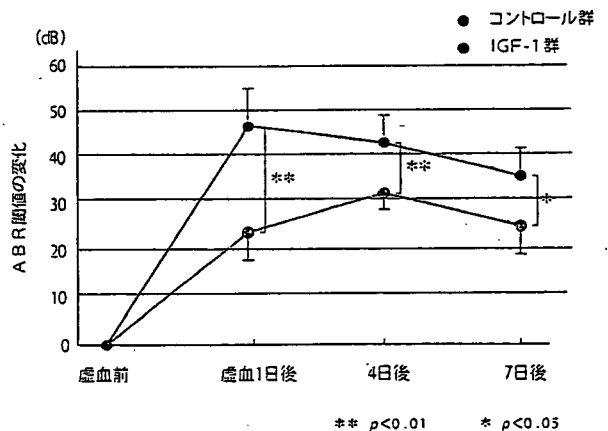


図2 ABR閾値の推移 (n=6)

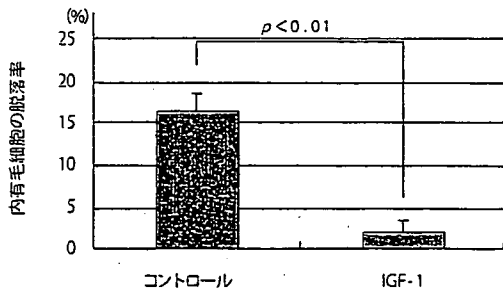


図3 虚血7日後における内毛細胞の脱落率 (各n=6)

組織学的研究の結果を図3に示す。内毛細胞の脱落を定量化した結果、コントロール群で顕著にみられた内毛細胞の脱落が、IGF-1投与群では抑制されていた。虚血7日後の内毛細胞の脱落割合は、IGF-1投与群で $2.6 \pm 1.3\%$ 、コントロール群で $16.5 \pm 1.7\%$ と、統計学的に有意差を認めた。

考 察

IGF-1含有ゼラチンハイドロゲルの内耳障害防御効果については、すでにIwaiら¹⁷⁾が騒音性難聴モデルにおいて報告している。彼らは、騒音負荷の3日前にIGF-1含有ゼラチンハイドロゲルを正円窓上に置いた群では、生食含有ゲルを置いた群と比べ、ABR閾値上昇や外毛細胞脱落が有意に抑制されることを示し、正円窓を介してコルチ器に到達したIGF-1が音響障害を防御したと推論している。本研究では虚血障害を対象とし、一過性虚血負荷の30分後に投与したが、IGF-1含有ハイドロゲルは内毛細胞脱落の進行を抑制し、聴力障害を軽減した。IGF-1は騒音性難聴だけでなく虚血性内耳障害に対しても保護効果のあることが証明された。

IGF-1はインシュリン受容体異常症、脂肪萎縮性糖尿病、妖精症、成長ホルモン単独欠損症などの稀少疾患に対する治療薬として、1994年に厚生労働省より臨床使用が認可された細胞増殖因子である。内耳障害に対するIGF-1の作用機序は現在のところ不明であるが、推測されるメカニズムとしては、①アポトーシス抑制、②Glucose transporters (GLUTs)を介した機序が挙げられる。IGF-1はphosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) /Akt経路を介してアポト-

シス抑制因子のBcl-2 interacting mediator of cell death (Bim)を制御することで、アポトーシスを抑制する¹⁸⁾。一過性内耳虚血後の有毛細胞の脱落はアポトーシスが主因¹⁹⁾とされているので、これを抑制することで内耳は保護される。また、GLUTsは細胞膜にグルコース輸送蛋白を発現させ、グルコースの細胞内への取り込みを促進する²⁰⁾。脳領域において高血糖が虚血による神経障害を悪化させること^{21) 22)}、脳虚血障害によってGLUTs、特にGLUT-3の発現が変動することから^{23) 24) 25)}、GLUTsが虚血障害において重要な役割を果たすと考えられている。IGF-1はGLUTsの発現に影響を及ぼすことから、GLUTsを介した内耳保護効果も考えられる。

正円窓は3層構造をなす膜で中耳腔と内耳を隔て、エンドサイトーシスにより両者間の物質輸送が行われている。正円窓の通過度は物質の分子の大きさや電荷によって決定される。細胞増殖因子の一つであるbrain-derived neurotrophic factor (以下、BDNF)をハイドロゲルに含有させ正円窓に留置すると、3-7日間にわたり外リンパ中に高濃度のBDNFが検出される¹¹⁾。したがってBDNFと似た性状を有するIGF-1は、正円窓を通過し効果を発揮したものと考えられる。従来からの液状薬剤を鼓室内に投与する方法は、投与後すぐに鼓膜切開孔や耳管から薬剤が流出してしまい、内耳移行量は限られていた。ハイドロゲルはゼリー状であり、鼓室内正円窓窩に留まりやすい。また、約1週間かけて徐放するため、一度の処置で持続的な効果が得られる利点がある。ハイドロゲルはスナネズミでは耳胞を開放して留置したが、ヒトでは小さく鼓膜切開すれば注入可能である。今後は、最適なIGF-1の濃度やゼラチンハイドロゲルの量を検討し、臨床での応用を目指して研究を進める予定である。

(藤原崇志、羽藤直人)

参考文献

- 1) Juhn SK, Rybak LP. : Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. *Acta Otolaryngol* 1981 ; 91 : 529-34.
- 2) Varela-Nieto I, Morales-Garcia JA, Vigil P, et al. : Trophic effects of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the inner

- ear. *Hear Res* 2004 ; 196 : 19-25.
- 3) Staecker H, Van De Water TR : Factors controlling hair-cell regeneration/repair in the inner ear. *Curr Opin Neurobiol* 1998 ; 8 : 480-487
 - 4) Malgrange B, Rigo JM, Coucke P, et al. : Identification of factors that maintain mammalian outer hair cells in adult organ of Corti explants. *Hear Res* 2002 ; 170 : 48-58.
 - 5) Ylikoski J, Pirvola U, Suvanto J, et al. : Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res* 1998 ; 124 : 17-26.
 - 6) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, et al. : Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2002 Feb 5 ; 99 : 1657-60. Epub 2002 Jan 29.
 - 7) Yagi M, Magal E, Sheng Z, et al. : Hair cell protection from aminoglycoside ototoxicity by adenovirus-mediated overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Hum Gene Ther* 1999 ; 10 : 813-823.
 - 8) Koda M, Hashimoto M, Murakami M, et al. : Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord. *J Neurotrauma*. 2004 ; 21 : 329-37.
 - 9) Arnold W, Senn P, Hennig M, 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* 2005 ; 10 : 53-63.
 - 10) Tamura T, Kita T, Nakagawa T, et al. : Drug delivery to the cochlea using PLGA nanoparticles. *Laryngoscope* 2005 ; 115 : 2000-2005.
 - 11) Endo T, Nakagawa T, Kita T, et al. : A novel strategy for treatment of inner ears using a bio hydrogel. *Laryngoscope* 2005 ; 115 : 2016-2020.
 - 12) Tabata Y, Miyao M, Ozeki M, et al. : Controlled release of vascular endothelial growth factor by use of collagen hydrogels. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2000 ; 11 : 915-30.
 - 13) Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, et al. : Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels*. 2003 ; 18 : 93-9.
 - 14) Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y. : Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials*. 2003 ; 24 : 4375-83.
 - 15) Tabata Y, Nagano A, Ikada Y. : Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 1999 ; 5 : 127-131.
 - 16) Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, et al. : Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model. *Heart Vessels* 2003 ; 18 : 93-99.
 - 17) Iwai K, Nakagawa T, Endo T, et al. : Cochlear protection by local insulin-like growth factor-I application using biodegradable hydrogel. *Laryngoscope* 2006 ; 116 : 529-533.
 - 18) Linseman DA, Phelps RA, Bouchard RJ, et al. : Insulin-like growth factor- I blocks Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) induction and intrinsic death signaling in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 2002 ; 22 : 9287-9297.
 - 19) Taniguchi M, Hakuba N, Koga K, et al. : Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroreport* 2002 ; 13 : 2459-62.
 - 20) Bell GI, Kayano T, Buse JB, et al. : Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990 Mar ; 13 : 198-208.
 - 21) McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 1992 ; 41 : 557-570.
 - 22) Mooradian, A. D. Diabetic complications of the central nervous system. *Endocr Rev* 1988 ; 9 : 346-356.
 - 23) Gerhart DZ, Leino RL, Taylor WE, et al. : GLUT1 and GLUT3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia : an in situ hybridization study. *Mol Brain Res* 1994 ; 25 : 313-322.
 - 24) McCall AL, Moholt-Siebert M, VanBueren A, et al. : Expression of glucose transporters in rat brain following transient focal ischemic injury. *Brain Res* 1995 ; 670 : 29-38.
 - 25) McCall AL, Moholt-Siebert M, VanBueren A, et al. : Progressive hippocampal loss of immunoreactive GLUT3, the neuron-specific glucose transporter, after global forebrain ischemia in the rat. *Brain Res* 1995 ; 670 : 29-38.

IV. 内耳障害の防御と治療

4. 低体温

【要約】低体温には非特異的に細胞代謝を抑制し、細胞死プロセスの進行を防止することで不可逆的な障害を防ぐ効果がある。本研究では低体温が虚血性内耳障害に対しても同様のメカニズムで防御的に働くかを動物モデルで検討した。その結果、虚血中に低体温（32℃）を施した場合だけでなく、虚血1時間後に低体温を開始した場合でも、ABRや有毛細胞の障害は有意に抑制され、低体温には内耳保護効果のあることが示された。しかし低体温の効果は虚血中に施した方が顕著であり、この治療は早期に行うほど有効であった。低体温は外リンパ中のグルタミン酸濃度上昇を抑制し興奮毒性（excitotoxicity）を防御することで内有毛細胞を保護すると考えられた。

はじめに

身体を冷やすことで病気を治すことは民族を問わず古くより行われてきた。2世紀代の医師Aretaeusは頭部外傷の治療法として、頭蓋穿孔、利尿とともに低体温を挙げている¹⁾。これは当時より低温治療の効果が医学常識として認められていたことの証左といえる。しかし体温を極端に下げるとは生命に対するリスクもあり、近年の麻酔技術の発達をみるまで低体温療法は一般的な解熱と局所冷却に限られていた。1938年、Temple Fayが末期の悪性腫瘍患者に全身低体温療法を施行したところ著明な除痛が得られたと報告して以来、様々な分野で臨床応用に向けた低体温の研究が進められている。脳の虚血性障害は虚血中にわずかに数℃体温を下げるだけで完全に防御される^{2) 3) 4)}こと、また虚血後でも一定時間以内であれば低体温により脳組織は保護されること⁵⁾が基礎医学的研究で明らかとなり、臨床における低温療法の有効性を裏付ける根拠となっている。虚血による内耳障害のメカニズムは脳の障害と共通点が多い。そこで本研究では内耳虚血モデルを用いて、虚血中あるいは虚血後に低体温を施し、内耳障害防御効果を検討した。

虚血中低体温による内耳障害防御効果

1. 聴力および内耳組織への影響

1) 実験対象と方法

実験にはスナネズミを使用した。両側椎骨動脈に絹糸をかけて牽引することで15分間の血流遮断を行った⁶⁾。

実験中の直腸温は温度センサーを用いてモニターした。常温群では温熱灯で上方から動物を温めて直腸温を37℃に維持し、低体温群ではアイスバックを動物の躯体の両側に置いて直腸温を32℃に低下させた。虚血と低体温の有無により動物を虚血-低体温群、虚血-常温群、sham op-低体温群、sham op-常温群の4群に分類した。虚血-低体温群では直腸温を32℃に低下させた後に内耳に虚血を負荷し、血流再開通20分後まで32℃に維持した。その後、アイスバックを取り除き、温熱灯を用いて直腸温を37℃に復温させた。虚血-常温群では実験を通じて直腸温を37℃に維持した。なお、直腸温を32℃または37℃に維持した状態で、両側の椎骨動脈に絹糸を掛けるが、血流遮断を行わないものはsham op群とした。聴力は蝸電図のCAP (compound action potential) 閾値により評価した。

24匹（虚血-低体温群と虚血-常温群はそれぞれ8匹、sham op-低体温群とsham op-常温群はそれぞれ

4匹)の動物に対して虚血前(あるいはsham op前)、虚血中(同)、血流再開(同)の30分、1、4、7日後に蝸電図の測定を行った。刺激音には周波数8kHzのトーンバーストを用い、誘発された反応を300回加算した。10dBステップで刺激音圧を変化させ、閾値付近では5dBステップで変化させて聴力閾値を測定した。

虚血7日後に標本を採取し組織学的検討を行った。両側の耳胞を取り出し蝸牛の局所灌流固定を行った。後固定後、実体顕微鏡下に基底回転のほぼ全周のコルチ器を採取した。標本をRhodamine-phalloidin (0.25% Triton-X-100、1%ウシ血清アルブミン)で染色し、PBSで洗浄後、さらにHoechst 33342による染色を加え蛍光顕微鏡にて観察した。聴毛の観察にはグリーンフィルター(BP546, FT580, LP590)を、核の観察にはUVフィルター(BP365, FT395, LP397)を用い、蝸牛基底回転の内、外有毛細胞の生細胞と死細胞の数をカウントし、脱落細胞率を算出した。

2) 結果

蝸電図のCAP閾値の経時的変化を図1に示す。Sham op-常温群においては手術前後でCAP閾値に有意な変化を示さなかった。Sham op-低体温群においては低体温によりCAP閾値が10.0±2.8dB上昇したが復温により完全に回復した(図1a)。虚血群においては、虚血後直ちにCAPはスケールアウトとなり、最大刺激音圧(100dB SPL)においても反応は誘発されなかった(図1b)。血流を再開するとCAPは徐々に回復したが、虚血-常温群では虚血前値にまでは回

復せず、再開7日後においても虚血前に比べ16.2±8.3dBの閾値上昇が残った。一方、虚血-低体温群では血流再開30分後に虚血前値に回復し、その後も7日目まで閾値変化はみられなかった。

内・外有毛細胞の脱落率の推移を図2に示す。虚血7日後の基底回転における虚血-常温群の脱落率は、内有毛細胞が26.4±9.9%(図2a)、外有毛細胞が2.9±2.3%(図2b)であった。一方、低体温群における脱落率は内、外有毛細胞ともに0.3%以下であり、虚血-常温群と比較していずれも有意に低かった。Sham op-低体温、sham op-常温群では手術7日後の脱落率は内、外有毛細胞ともに0.3%以下であった。

2. 外リンパ中グルタミン酸濃度と透過型電子顕微鏡による有毛細胞の観察

1) 実験対象と方法

外リンパ中グルタミン酸濃度の測定は12匹12耳(虚血-低体温群と虚血-常温群それぞれ6匹)を対象に行った。蝸牛側壁に小孔を設け、透析膜つき微小プローブを挿入して固定した。一過性内耳虚血を負荷し、虚血20分前から120分後までの外リンパ中グルタミン酸濃度を5分間隔で測定した。

透過型電子顕微鏡(TEM)による検討では、虚血-低体温群と虚血-常温群それぞれ2耳の内有毛細胞を観察した。血流再開の5分後に中耳骨胞を開放し、蝸牛の灌流固定を行った。ついで蝸牛を摘出し、後

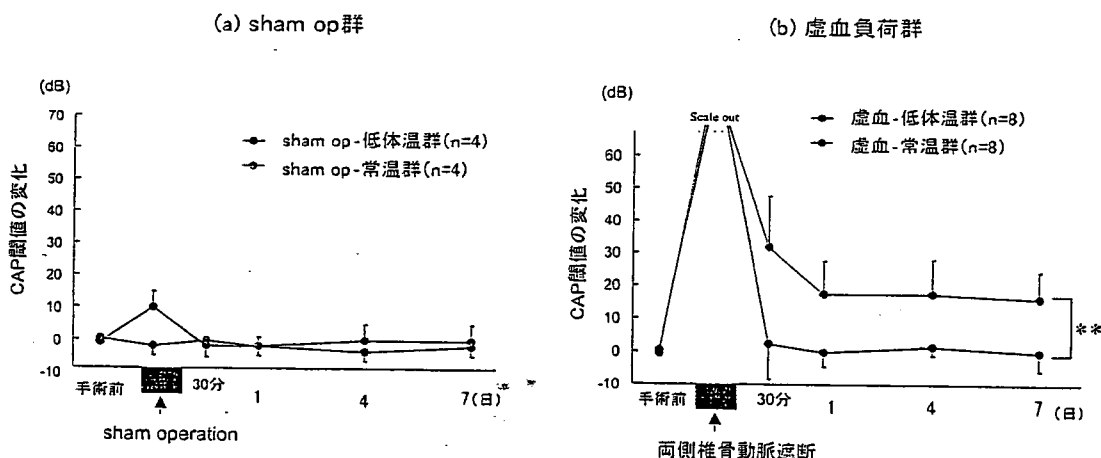


図1 CAP閾値の推移

虚血前のCAP閾値を0dBとし、その後のCAP閾値変化を示す。

(a)sham op群, (b)虚血負荷群。直腸温は低体温群では32℃、常温群では37℃に維持した。**: p<0.01

固定後にエポキシ包埋した。基底回転において蝸牛軸を含む切片を作製した。酢酸ウランとクエン酸塩による2重染色を施し、TEMにて基底回転の内・外有毛細胞を観察した。

2) 結果

常温群ではグルタミン酸濃度は虚血開始と同時に上昇し始め、虚血終了直前には $15\text{pmol}/\mu\text{l}$ 近くにまで上昇した。血流再開後にピークに達した後、徐々に低下したが、120分後も虚血前の約2倍の濃度であった。一方、低体温群では虚血中、血流再開後ともにグルタミン酸濃度に変化はなかった(図3)。

虚血-低体温群と虚血-常温群のTEM所見を図4に示す。虚血-常温群の内毛細胞ではシナプス後膜に空胞形成を認めた。一方、虚血-低体温群ではこのような変化はみられなかった。外毛細胞においては、虚血-低体温群と虚血-常温群のいずれにおいても明らかな変化は認められなかった。

虚血後低体温の内耳障害防御効果

1) 実験対象と方法

動物を虚血-低体温群、虚血-常温群、sham op-低体温群の3群に分類し、図5に示すプロトコルに従って実験を行った。虚血-低体温群では直腸温を 37°C に維持した後に内耳虚血を負荷し、血流再開1時間後より4時間後までの3時間、直腸温を 32°C に維持した。虚血-常温群では実験中、直腸温を 37°C に維持し

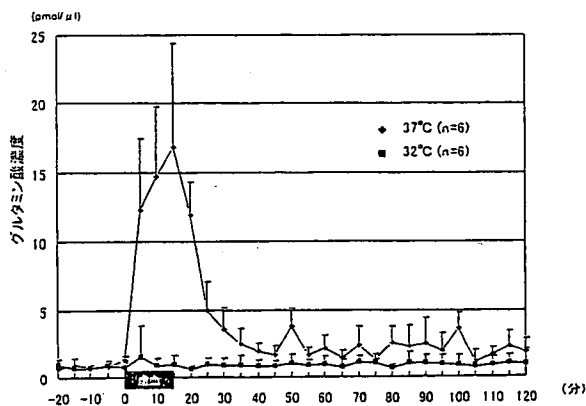


図3 外リンパ中グルタミン酸濃度の変化

虚血中に 32°C の低体温を負荷するとグルタミン酸濃度の上昇がおこらない。

た。Sham op-低体温群では直腸温を 37°C に維持した状態で、両側の椎骨動脈に絹糸を掛けるが血流遮断は行わず、sham opの1時間後より3時間、直腸温を 32°C に維持した。虚血後の体温モニターには小動物用体温コントローラを使用した(図6)。聴力評価には聴性脳幹反応(ABR)を用い、18匹36耳(虚血-低体温群と虚血-常温群はそれぞれ8匹16耳、sham op-低体温群は2匹4耳)の動物に対して虚血前(あるいはsham op前)、虚血(同)1、4、7日後に測定した。刺激音には 8kHz のトーンバーストを用い、得られた反応を300回加算して聴力閾値を測定した。7日後のABR測定後、速やかにコルチ器を摘出して固定・染色し、光学顕微鏡下に有毛細胞の脱落率を計測した。

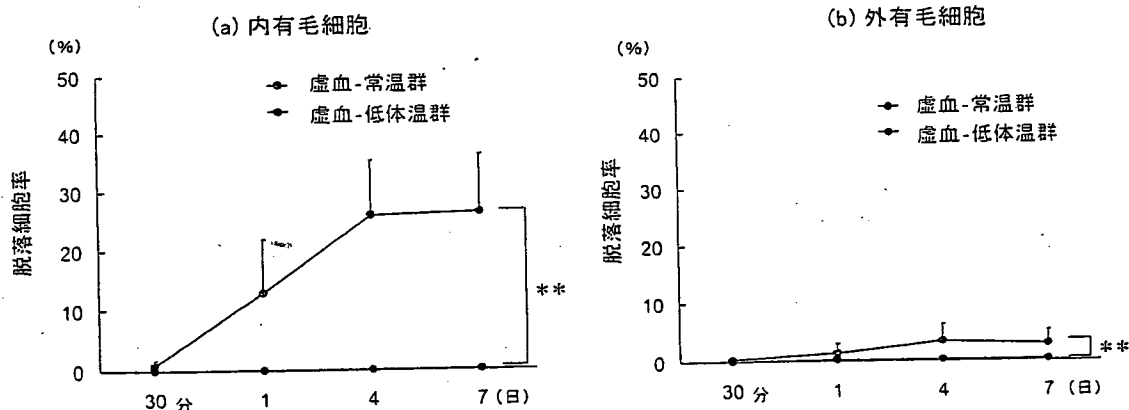


図2 有毛細胞脱落率の推移

(a) 内毛細胞, (b) 外毛細胞. **: $p < 0.01$

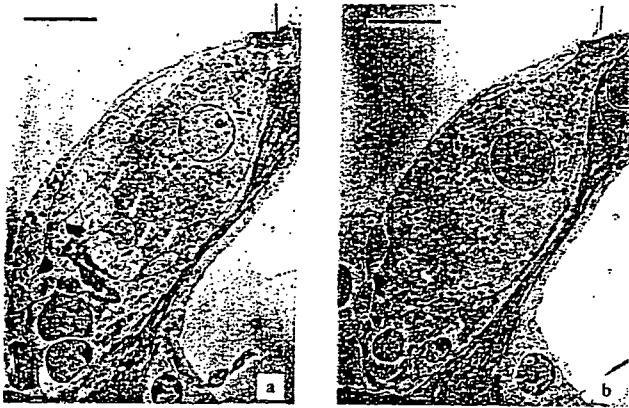


図4 内毛細胞の透過型電子顕微鏡像
(虚血30分後、基底回転)

常温群 (a) では内毛細胞のシナプス後膜に空胞形成 (矢印) がみられるが、低体温群 (b) では変化を認めない。
(scale bar = 5 μ m)

2) 結果

ABR閾値の経時的変化を図7に示す。1、4、7日後のいずれにおいても虚血-低体温群は虚血-常温群に比べ聴力閾値上昇が抑制されていた。7日後の聴力閾値上昇は虚血-低体温群が11.3 \pm 15.5dB、虚血-常温群が22.5 \pm 8.6dBであり、両者の間には有意差を認めた ($p < 0.05$)。Sham op-低体温群ではABR閾値の有意な変化は認められなかった。

蝸牛各回転ごとの有毛細胞の脱落率を図8に示す。いずれの回転においても低体温群は常温群に比べ内

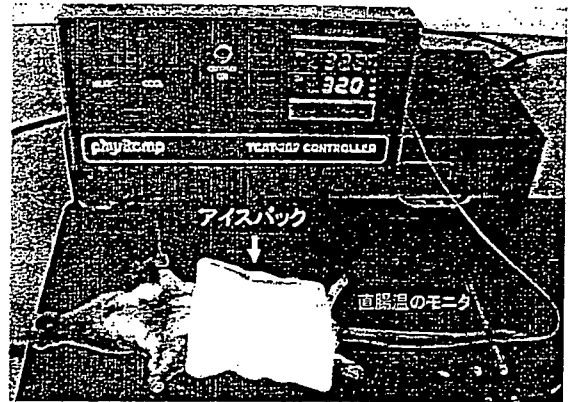


図6 低体温の負荷

虚血後、アイスバックを腹部に乗せ体温を低下させた。動物の体温はコントローラでモニターした。

有毛細胞の脱落率は少なかった。基底回転における内毛細胞の脱落率は虚血-低体温群が8.0 \pm 3.8%、虚血-常温群が16.5 \pm 3.5%であり、両者の間には統計学的な有意差を認めた ($p < 0.05$)。一方、Sham op-低体温群の脱落率は内・外有毛細胞とも、いずれの回転においても2%以下であった。

考 察

虚血障害に対する低体温の効果については、主に脳

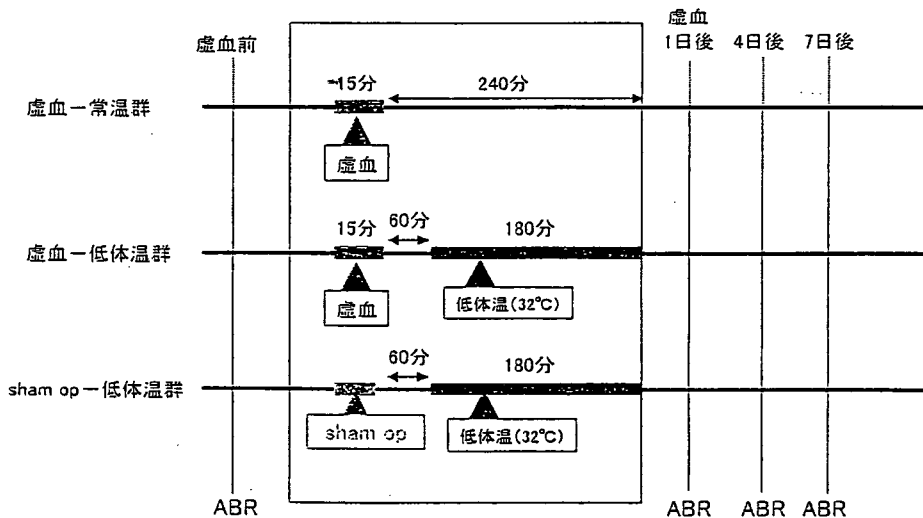


図5 虚血後低体温の実験プロトコル

低体温は虚血終了後、直腸温を32 $^{\circ}$ Cに保ち3時間維持する。

科学や救急医学の領域で研究が進められている。Bustoら²⁾はラットを用いた20分間の全脳虚血実験で、虚血中の脳温を36℃から34℃に下げると、海馬CA1錐体細胞や線条体背外側細胞の高エネルギーリン酸化合物（APTなど）の枯渇程度は常温の場合とほとんど変わらなかったが、細胞障害は劇的に減少したと報告している。Rosomoffら⁷⁾は、イヌの脳血流量をN₂O法と色素希釈法を用いて測定し、体温が35℃から25℃までの範囲では、体温を1℃低下させるごとに脳血流量は6.7%ずつ直線的に減少したと述べている。部位により違いはあるが、一般に血流量が約40%以下になった場合に虚血性細胞障害が起こるとされており⁸⁾、わずか数℃の体温低下では血流量の60%程度は保たれているはずであり、代謝抑制だけでは低体温の障害防御効果を説明できない。おそらく低体温が、細胞外へのグルタミン酸放出、フリーラジカル産生、細胞内へのカルシウム流入などを非特異的に抑制することで防御効果を示すものと思われる。

Fernandezら⁹⁾は低体温が内耳機能に及ぼす影響について動物実験により詳細な検討を行い、動物の体温を低下させるとCAP閾値は上昇するが、復温すると完全に回復すると報告している。この結果は今回の実験でも同様で、低体温がCAPに及ぼす影響は可逆的であった。その機序としてButlerら¹⁰⁾は低体温により蝸牛内直流電位（EP）が低下することを示し、血管条上皮細胞の代謝抑制を挙げている。

今回の実験で虚血によるグルタミン酸の細胞外放

出は低体温により抑制されることが示された。グルタミン酸が虚血性内耳障害の要因の一つであることは、すでに述べた通りであり、低体温の内耳防御効果は主にグルタミン酸放出抑制によるものと思われる^{11) 12) 13) 14) 15) 16)}。本実験で用いた低体温は32℃と比較的軽度であり、血流も60%程度は確保されていたと予想されるが、このような軽度虚血によっても十分な効果を示すことが明らかとなった。

柳瀬ら¹⁷⁾はスナネズミの一過性前脳虚血モデルを用い、低体温の開始時期・持続時間・程度の各パラメータを変えて虚血障害に対する低体温の効果を検討し、虚血後5時間以内に31～32℃の低体温を開始すると、海馬CA1領域のニューロン死は顕著に防御される（残存ニューロン数75%以上）ことを明らかにしている。内耳虚血の場合も低体温による防御効果は期待できるが、現在までこのような検討はなされておらず、本研究が初めての報告といえる。その結果、虚血中に低体温を負荷すれば内耳障害は完全に防御されたが、虚血1時間後に低体温とした場合は完全には障害を防止できなかった。現在、虚血6時間後に低体温を開始した群でも検討を行っているが、内耳障害の防御効果は見られていない。低体温が治療効果を示すのは障害早期に開始した場合に限られる。

本研究により虚血中および虚血1時間後に開始した低体温が一過性内耳虚血障害に対して保護効果を示すことが示されたが、虚血中の低体温は手術による内耳障害を回避する意味でも意義がある。たとえば

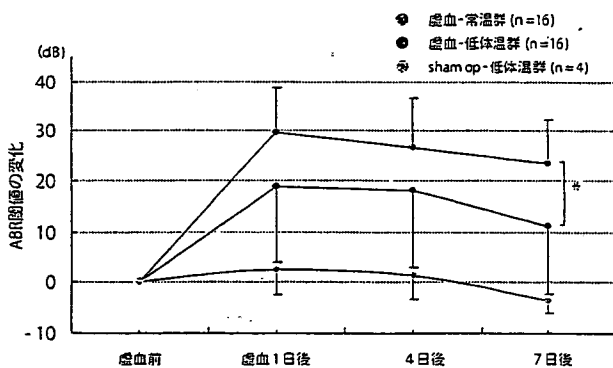


図7 ABR閾値の推移

虚血前のABR閾値を0dBとし、その後の変化を平均値で示した。* : $p < 0.05$

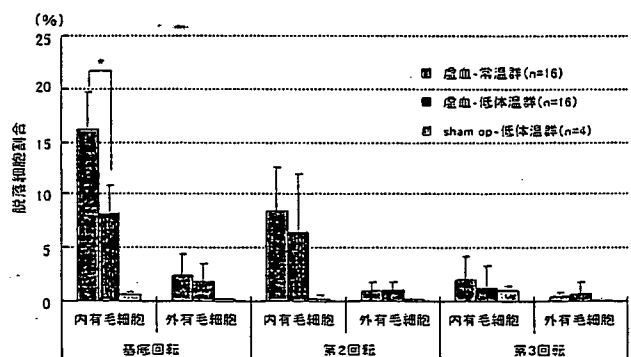


図8 蝸牛回転ごとの有毛細胞脱落率（虚血7日後）

* : $p < 0.05$

聴神経腫瘍手術に際し、蝸牛神経を保存したにもかかわらず聴力悪化をきたす例があるが、その原因の一つとして手術操作によって引き起こされる迷路動脈の血流障害¹⁹⁾が挙げられる。この場合、術中に内耳を低温に保つことができれば聴力保存成績は向上すると思われる。また、虚血後に低体温を行うことでも内耳保護効果があることは突発性難聴に対する臨床応用を考える上で極めて重要である。突発性難聴の発症早期に内耳の冷却療法を開始することで、聴力悪化を防ぐことができる可能性がある。低体温療法は心肺停止後の蘇生時や重症頭部外傷の治療など救急分野ではすでに汎用されており、多くの臨床例が報告されている^{19) 20) 21)}が、低体温の副作用として不整脈^{21) 22)}、高血糖²³⁾、血小板減少^{24) 25)}、免疫障害^{23) 26)}なども報告されている。適応決定に当たっては低体温療法の利点、欠点を十分に考慮した上で判断する必要がある。また臨床的には全身の低体温でなく局所のみ冷却効果に関する研究が必要で、これについては後述する。

(竹田将一郎)

参考文献

- 1) 早川 徹(私信), Frost EAM: Brain preservation. *Anesth Analg* 1981; 60: 821-832.
- 2) Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, et al: Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1987; 7: 729-738.
- 3) Welsh FA, Sims RE, Harris VA: Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Metab* 1990; 10: 557-563.
- 4) Dietrich WD, Busto R, Alonso O, Globus MY, Ginsberg MD: Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993; 13: 541-549.
- 5) Busto R, Dietrich WD, Globus MY-T, Ginsberg MD: Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci Lett* 1989; 101: 299-304.
- 6) Hata R, Matsumoto M, Hatakeyama T, Ohtsuki T, Handa N: Differential vulnerability in the hindbrain neurons and local cerebral blood flow during bilateral vertebral occlusion in gerbils. *Neuroscience* 1993; 56: 423-439.
- 7) Rosomoff HL, Holaday DA: Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am J Physiol* 1954; 179: 85-88.
- 8) Mitani A, Kataoka K: Critical levels of extracellular

- glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study. *Neuroscience* 1991; 42: 661-670.
- 9) Fernandez C, Singh H, Perlman H: Effect of short-term hypothermia on cochlear responses. *Acta Otolaryngol* 1958; 49: 189-205.
- 10) Butler RA, Konishi T, Fernandez C: Temperature coefficients of cochlear potentials. *Am J Physiol* 1960; 199: 688-692.
- 11) Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, Solomon RA, Trifiletti RR: Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1994; 35: 272-277.
- 12) Mitani A, Kadoya F, Kataoka K: Temperature dependence of hypoxia-induced calcium accumulation in gerbil hippocampal slices. *Brain Res* 1991; 562: 159-163.
- 13) Puel JL, Pujol R, Tribillac F, Ladrech S, Eybalin M: Excitatory amino acid antagonists protect cochlear auditory neurons from excitotoxicity. *J Comp Neurol* 1994; 341: 241-256.
- 14) Lefebvre PP, Weber T, Leprince P, Rigo JM, Delree P, et al: Kainate and NMDA toxicity for cultured developing and adult rat spinal ganglion neurons; further evidence for a glutamatergic excitatory neurotransmission at the inner hair cell synapse. *Brain Res* 1991; 555: 75-83.
- 15) Klinke R, Oertel W: Amino acids: putative afferent transmitter in the cochlea? *Exp Brain Res* 1977; 30: 145-148.
- 16) Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, et al: Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. *J Comp Neurol* 2000; 418: 217-226.
- 17) 柳瀬尚人、片岡喜由: 低体温療法の歴史的背景と基礎実験の成果。脳低温療法の基礎と臨床(総合医学社) 1998; 3-19.
- 18) Levine RA, Ojemann RG, Montgomery WW, McGaffigan PM: Monitoring auditory evoked potentials during acoustic neuroma surgery; insights into the mechanism of the hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984; 93: 116-123.
- 19) Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, et al: Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002; 346: 549-556.
- 20) Nagao K, Hayashi N, Kanmatsuse K, Arima K, Ohtsuki MD, et al: Cardiopulmonary cerebral resuscitation using emergency cardiopulmonary bypass, coronary reperfusion therapy and mild hypothermia in patients with cardiac arrest outside the hospital. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36: 776-783.
- 21) Polderman KH, Peerdeman SM, Girbes AR: Hypophosphatemia and hypomagnesemia induced by cooling in patients with severe head injury. *J Neurosurg* 2001; 94 (5): 697-705.
- 22) Aibiki M, Kawaguchi S, Maekawa N: Reversible hypophosphatemia during moderate hypothermia therapy for brain-injured patients. *Crit Care Med* 2001; 29: 1726-1730.
- 23) 丹正勝久、林 成之: 低温期、復温期の感染症対策及び栄養管理法。救急医学 1999; 23: 667-677.
- 24) Gubler KD, Gentilello LM, Hassantash SA, Maier RV: The impact of hypothermia on dilutional coagulopathy. *J Trauma* 1999; 36: 847-851.
- 25) Murry J: Coagulation in trauma. In "Trauma. A scientific Basis for Care" eds. Alpar EK, Gosling P, Arnord, London 1999; 121-131.
- 26) 雅楽川聡、林 成之: 脳低温療法と生体防御機構。"脳蘇生と低体温療法" 新井達潤 編, 真興交易医書出版部 1997; 73-84.

IV. 内耳障害の防御と治療

5. 遺伝子治療

【要約】 GDNF産生遺伝子による虚血性内耳障害防御効果を検討する目的で、アデノウイルス・ベクターに組み込んだGDNF産生遺伝子（以下Ad-GDNF）をスナネズミの鼓室階に正円窓經由で注入し、虚血後の聴力や内耳障害に対する影響を検討した。その結果、Ad-GDNF投与群では虚血後の蝸電図CAP閾値の上昇や内有毛細胞の脱落がほとんどみられず、内耳でのGDNF産生が虚血障害を防御したものと推察した。また、ウエスタンブロット法で内耳におけるGDNF発現量を測定したところ、投与後は徐々に増加して11日後に最高値に達し、その後は減少した。したがってGDNFの発現は一過性であり、GDNF産生遺伝子が染色体に組み込まれることはないと考えられた。頻回の局所投与が困難な部位の治療法として、持続的な薬効が期待できる遺伝子治療は有望と思われた。

はじめに

遺伝子治療とは「ある遺伝子を患者の体内に入れ、その遺伝子が作り出す蛋白質の生理作用により病気を治す」という新しい原理による治療技術であり、従来、不治とされていた疾患を治しうる画期的な治療法として注目されている。遺伝子導入の目的は、1) 欠けている遺伝子の働きを補足する、2) 有害遺伝子の作用を抑制する、3) 治療効果のある蛋白質を産生させる、など様々であり、対象疾患の病態に応じて使い分けられる。遺伝子治療はすでにアデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症、血友病、嚢胞性線維症などいくつかの疾患に応用され、画期的な成績が報告されており、現在、適応拡大に向けた取り組みが行われている。内耳疾患に対する研究も進み、Math 1 (Atoh 1) 遺伝子導入による聴毛再生が報告されるなど¹⁾、感音難聴の根本的な治療法へと発展するものと期待される。

GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) はTGF- β のスーパーファミリーに属する神経栄養因子の1つであり、様々な原因による神経障害に対して防御効果を示すことが知られている。これまでの研究から、内耳にはGDNFの受容体が存在すること、GDNFは音響外傷や中毒性難聴を防御する効果があ

ること^{2) 3)}などが報告されている。したがってGDNFを内耳に直接導入すれば、内耳障害が防御できると予想されるが、効果を得るためには直接投与が必要である。しかし内耳への反復投与操作は侵襲が大きく、かえって内耳障害を悪化させる可能性がある。そこでGDNF産生遺伝子を内耳に注入し局所で発現させる方法を着想した。本研究では、この治療戦略による内耳治療の可能性を検討する目的で、GDNF産生遺伝子の投与効果を検討した。ベクターには安全性が高いとされるアデノウイルスを用い、これにGDNF産生遺伝子を組み込んだもの（以下、Ad-GDNF）をスナネズミの内耳に注入し、GDNFの発現量と持続期間、虚血性難聴への影響、内耳保護効果などについて検討した⁴⁾。

方 法

1. GDNF-ウイルスベクターの蝸牛内投与

GDNF-ウイルス (Ad-GDNF) は東京都神経科学総合研究所より提供を受けた。このベクターは増殖機能を脱落させるためにE3、E1A、B領域を欠損させたアデノウイルス5型に、培養ヒト胎生アストロサイトより抽出したhGDNFのcDNA遺伝子を組み入れたものである。

実験動物にはスナネズミを用いた。全身麻酔下に耳胞を開放し、先端が100 μ m径のガラス毛細管を正円窓に挿入、Ad-GDNFあるいはAd-LacZ (LacZ遺伝子を組み込んだアデノウイルス)を含むリンゲル液 (アデノウイルスの濃度は各 10^{10} pfu/ml)、または人工外リンパ液を、インフュージョンポンプを用いて0.4 μ l/minの速さで5分間、鼓室階に注入した (総量は各2 μ l)。

2. X-gal染色

Ad-LacZの蝸牛内投与4日後に組織を採取し、X-gal染色を行うことで内耳におけるウイルスの定着部位を検討した。LacZは蛍光蛋白である β -ガラクトシターゼを発現させる遺伝子であり、X-gal染色で同定できる。

a) 蝸牛全体の観察：両側の耳胞を摘出して卵円窓と正円窓を開放し、蝸牛の灌流固定を行った。ついで後固定を加え、さらに0.5Mの $K_3Fe(CN)_6$ と $K_4Fe(CN)_6$ を含んだX-gal染色液中に標本を浸し、37 $^{\circ}$ Cの恒温槽にて12時間、 β -ガラクトシターゼの染色を行った。その後、実体顕微鏡下に蝸牛側壁をほぼ全周にわたり剝離し、青色に染色された β -ガラクトシターゼを観察した。

b) 凍結切片標本の観察：採取した標本はEDTAで3週間脱灰後に凍結し、クライオスタットで10 μ mの厚さの切片を作製した。これをX-gal染色液中に一晩浸漬し、光学顕微鏡にて観察した。

3. ウエスタンブロット法によるGDNF量の解析

鼓室階へのAd-GDNF注入4日後にウエスタンブロット法によるGDNF蛋白量測定を行った。蝸牛を摘出してホモゲナイズし、4 $^{\circ}$ Cで10分間、13,000回転で遠心分離した後、上清を採取して試料とした。BCA protein assay kitを用いて蛋白量を測定し、SDS-PAGE電気泳動を行った。ニトロセルロース膜に蛋白を転写し、抗GDNFウサギポリクローナル抗体にてブロッキングを行った。得られたデータをスキャンし、GDNFの濃度を無処置群や人工外リンパ群 (Artificial Perilymph: AP群)、Ad-LacZ群の結果と比較した。

さらに、虚血前後のAd-GDNFが産生するGDNF量の推移を検討するため、Ad-GDNFを虚血4日前に投与し、虚血直前、虚血4、7、11、14、28日後にウエスタンブロット法によりGDNF蛋白量を測定した。

4. 一過性内耳虚血の負荷

Ad-GDNF投与4日後に両側椎骨動脈血流を遮断することで一過性内耳虚血を負荷した。血流遮断は15分間とし、虚血負荷後は顕微鏡下に両側の椎骨動脈の血流再開を確認した。

5. 蝸電図の測定

聴力評価には蝸電図を用いた。刺激音は8 kHzのトーンバースト (立ち上がり、立ち下がり時間各0.5ms、持続時間10ms) とし、刺激音圧を10dBステップで変化させ、また閾値付近では5 dBステップで変化させることで、蝸牛神経複合活導電位 (compound action potential: CAP) の閾値を求めた。

虚血を行う場合は、虚血前、虚血1、4、7日後に測定し、虚血を行わない場合はウイルスベクターの投与前、投与4、8、11日後に測定した。

6. 有毛細胞の観察と脱落率の算出

蝸電図の測定後、蝸牛を摘出し組織学的検討を行った。灌流固定後、surface preparation法にて基底回転のコルチ器を採取し、Rhodamine-phalloidinとHoechst 33342による2重染色を行った。蛍光顕微鏡下に有毛細胞を観察し、内外有毛細胞別に脱落率を算出した。

結 果

1. 蝸牛に投与したウイルスの局在部位

図1にAd-LacZ投与4日後の所見を示す。基底回転から頂回転の全長にわたりコルチ器と蝸牛外側壁が青色に染色されていた。光学顕微鏡による観察では、ライスネル膜やラセン神経節、有毛細胞周囲が青色に染色された。蝸牛に投与したAd-LacZがこれらの部位に生着していることが示された。

2. GDNFの産生

投与4日後のAP群、Ad-LacZ群、Ad-GDNF群のウエスタンブロット法によるGDNF発現量を図2に示す。AP群とAd-LacZ群間にはGDNFの発現量に有意差はなかったが、Ad-GDNF群では無処置群の400%以上と有意に増加した。

Ad-GDNF群におけるGDNF発現量の推移をみると、11日後までは徐々に増加してピークに達し、その後は減少した (図3)。



図1 Ad-LacZ投与4日後のX-gal染色

青く染色されたAd-LacZ陽性細胞の分布を示す。陽性細胞は蝸牛基底回転から頂回転（a、b）にわたり広く認められる。部位別ではライスネル膜やラセン神経節、有毛細胞周囲に分布している（c、d）。

3. ウイルスベクターによる内耳障害

ウイルスベクター投与11日後のCAP閾値上昇は、AP群が0.8dB、Ad-LacZ群が1.7dB、Ad-GDNF群が1.7dBであり、いずれも聴力への影響は認められなかった。また、投与11日後の細胞脱落率は、内有毛

細胞でAP群が0.18%、Ad-LacZ群が0.16%、Ad-GDNF群が0.13%、また外有毛細胞でAP群が0.3%、Ad-LacZ群が0.32%、Ad-GDNF群が0.25%と、いずれも極めて低かった。これらの結果はウイルスベクターによる内耳障害は生じないことを示している。

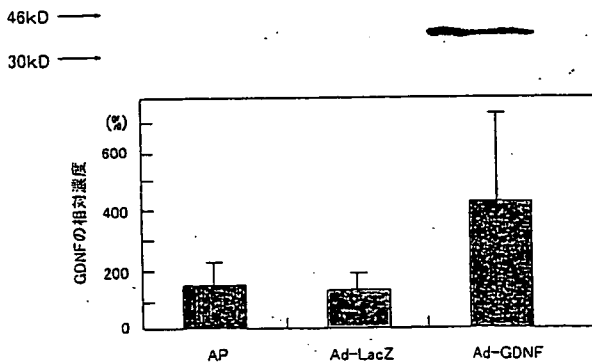


図2 投与4日後のGDNF発現量の比較

無処置群を基準（100%）とした場合、AP（人工外リンパ）群、Ad-LacZ群でも若干の増加はみられるが有意な変化ではない。一方、Ad-GDNF群におけるGDNF発現量は無処置群の4倍以上と有意に増加した。

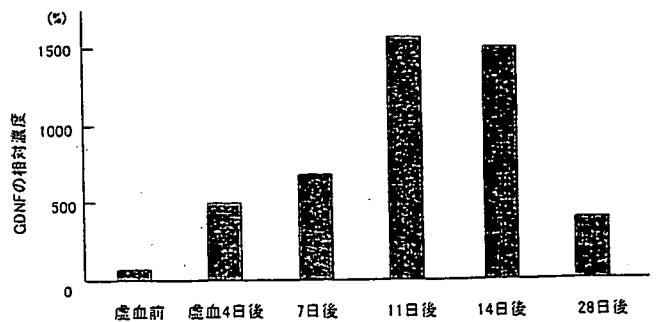


図3 Ad-GDNF投与後のGDNF発現量の推移

投与日のGDNF量を基準（100%）として相対発現量を示す。GDNF発現は11日後が最大で、28日後には減少した。

4. 虚血障害に対するウイルスベクター導入の効果

虚血1日後よりAP群、Ad-LacZ群ではCAP閾値上昇がみられ、7日後にも閾値上昇は持続していた(図4)。これに対しAd-GDNF群ではCAP閾値上昇は軽微であり、聴覚機能は保持されていた。

内毛細胞の脱落率は、AP群とAd-LacZ群では虚血後より徐々に上昇し、虚血7日後でそれぞれ16.4%と17.0%であった。これに対しAd-GDNF群では脱落率はあまり上昇せず、7日後で4.6%であった(図5)。一方、7日後の外毛細胞の脱落率は、AP群が2.7%、Ad-LacZ群が2.9%、Ad-GDNF群が2.3%、といずれも軽微であり有意差も認めなかった。

以上の結果より、Ad-GDNF投与は虚血後の聴力障害を防ぎ、内毛細胞の脱落を防御することが示された。

考 察

今回の研究によりAd-GDNFの蝸牛内投与が虚血性内耳障害に対して防御効果を持つことが示された。GDNFによる虚血性内耳障害防御のメカニズムについては完全には解明されていないが、これまでの脳虚血に関する研究から、細胞外グルタミン酸毒性の軽減⁵⁾、フリーラジカルの産生抑制⁶⁾、アポトーシス誘導プロテアーゼであるカスパーゼの抑制⁷⁾などの機

序が報告されている。近年、内耳においても神経伝達物質の研究が進み、内毛細胞の求心性伝達物質はグルタミン酸であるとする説が有力である⁸⁾。われわれはすでに虚血負荷により外リンパ中グルタミン酸濃度が有意に上昇すること⁹⁾、グルタミン酸の鼓室階投与が内耳障害を惹起すること¹⁰⁾、などからグルタミン酸が虚血性内耳障害で重要な役割を果たすことを証明しており、GDNFの効果は主にグルタミン酸の遊離抑制あるいは毒性軽減によると推察している。しかしGDNFがフリーラジカルやカスパーゼに対し抑制効果も示す可能性も否定できない。

Ad-GDNFやAd-LacZの蝸牛内投与は機能的にも組織学的にも内耳障害をきたさなかったことから、アデノウイルスをベクターとする方法は内耳疾患の治療に応用しうる。蝸牛内でのGDNF蛋白の発現が11日後にピークとなり、4週後ではほぼ消失することから、投与した遺伝子が染色体に組み込まれ永続的な効果をもたらすリスクは極めて低いと推察される。

蝸牛は側頭骨で囲まれており、投与したウイルスが周囲へ波及する可能性は少なく^{11) 12)}、安全に遺伝子治療が行えると考えられる。蝸牛への遺伝子投与方法については、正円窓經由^{13) 14)}あるいは蝸牛側壁に作成した小孔經由で鼓室階¹⁵⁾や前庭階¹⁶⁾、中央階へ投与する方法¹⁷⁾、内リンパ嚢へ投与する方法¹⁸⁾などが報告されている。しかし、蝸牛側壁に小孔を作成

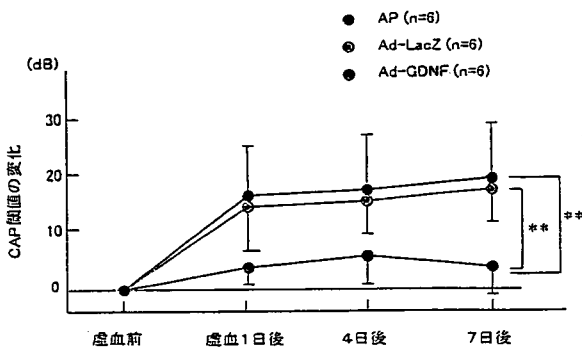


図4 CAP閾値の推移

AP群、Ad-LacZ群では虚血1日後からCAP閾値の上昇がみられ、7日後においても続いていた。一方、Ad-GDNF群においては虚血1日後の上昇は軽微であり、7日後でも4.8dBとAP群やAd-LacZ群に比べ有意に抑制されていた。(** $p < 0.01$)

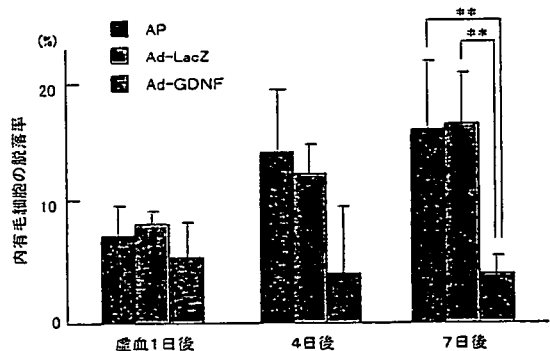


図5 虚血後の内毛細胞脱落率

内毛細胞の脱落率はAP群とAd-LacZ群では虚血1、4、7日後と徐々に増加した。一方Ad-GDNF群では1日後に脱落がみられるものの増加はなく、有意に抑制された。(** $p < 0.01$)

する方法は内耳を損傷する危険性が高く、動物実験では可能であってもヒトでの遺伝子導入ルートとしては適さない。手術操作の容易さや安全性を考慮すれば正円窓や内リンパ嚢へ投与するのが現実的であろう。

遺伝子治療にはまだまだ問題点も多く、未知の副作用の危険性もある。しかし遺伝子治療には従来の方法では不十分であった疾患治療ができる可能性があり、今後の発展が期待される。

(兵頭 純)

参考文献

- 1) Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, et al : Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 2005 ; 11 (3) : 271-276.
- 2) Ylikoski J, Pirvola U, Virkkala J, Suvanto P, Liang XQ, et al : Guinea pig auditory neurons are protected by glial cell line-derived growth factor from degeneration after noise trauma. *Hear Res* 1998 ; 124 (1-2) : 17-26.
- 3) Kuang R, Hever G, Zajic G, Yan Q, Collins F, et al : Glial cell line-derived neurotrophic factor. Potential for otoprotection. *Ann N Y Acad Sci* 1999 Nov 28 ; 884 : 270-291.
- 4) Hakuba N, Watabe K, Hyodo J, Ohashi T, Eto Y, et al : Adenovirus-mediated overexpression of a gene prevents hearing loss and progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Gene Ther* 2003 ; 10 (5) : 426-433.
- 5) Ho TW, Bristol LA, Coccia C, Li Y, Milbrandt J, et al : TGFbeta trophic factors differentially modulate motor axon outgrowth and protection from excitotoxicity. *Exp Neurol* 2000 ; 161 : 664-675.
- 6) Abe K, Setoguchi Y, Hayashi T, Itoyama Y : In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain. *Brain Res* 1997 ; 763 : 191-201.
- 7) Wang Y, Lin SZ, Chiou AL, Williams LR, Hoffer BJ : Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against ischemia-induced injury in the cerebral cortex. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 4341-4348.
- 8) Eybalin M : Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 1993 ; 73 (2) : 309-373.
- 9) Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, et al : Hearing-loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. *J Comp Neurol* 2000 ; 418 : 217-226.
- 10) Hakuba N, Matsubara A, Hyodo J, Taniguchi M, Maetani T, et al : AMPA/kainate-type glutamate receptor antagonist reduces progressive inner hair cell loss after transient cochlear ischemia. *Brain Res* 2003 ; 25 979 (1-2) : 194-202.
- 11) Stöver T, Yagi M, Raphael Y : Transduction of the contralateral ear after adenovirus-mediated cochlear gene transfer. *Gene Ther* 2000 ; 7 (5) : 377-383.
- 12) Stöver T, Nam Y, Gong TL, Lomax MI, Altschuler RA, et al : Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptor complex are expressed in the auditory nerve of the mature rat cochlea. *Hear Res* 2001 ; 155 : 143-151.
- 13) Raphael Y, Frisancho JC, Roessler BJ : Adenoviral-mediated gene transfer into guinea pig cochlea cells in vivo. *Neurosci Lett* 1996 ; 207 : 137-141.
- 14) Kawamoto K, Yagi M, Stöver T, Stöver T, Kanzaki S, et al : Hearing and hair cells are protected by adenoviral gene therapy with TGF-beta1 and GDNF. *Mol Ther* 2003 ; 7 (4) : 484-492.
- 15) Stöver T, Yagi M, Raphael Y : Cochlear gene transfer : round window versus cochleostomy inoculation. *Hear Res* 1999 ; 136 (1-2) : 124-130.
- 16) Suzuki M, Yagi M, Brown JN, Miller AL, Miller JM, et al : Effect of transgenic GDNF expression on gentamicin-induced cochlear and vestibular toxicity. *Gene Ther* 2000 ; 7 (12) : 1046-1054.
- 17) Ishimoto S, Kawamoto K, Kanzaki S, Raphael Y : Gene transfer into supporting cells of the organ of Corti. *Hear Res* 2002 ; 173 (1-2) : 187-197.
- 18) Yamasoba T, Yagi M, Roessler BJ, Miller JM, Raphael Y : Inner ear transgene expression after adenoviral vector inoculation in the endolymphatic sac. *Hum Gene Ther* 1999 ; 10 (5) : 769-774.

IV. 内耳障害の防御と治療

6. 幹細胞移植

【要約】 幹細胞は自己増殖能と多分化能を持つ細胞であり、障害部位に投与すると生着して分化し、組織再生を促進する。本研究では虚血性内耳障害に対する幹細胞の効果を検討する目的で、神経幹細胞または造血幹細胞を鼓室階に注入し内耳障害防御効果を検討した。虚血前あるいは虚血1日後に幹細胞を注入すると、虚血による内毛細胞の脱落やABR閾値上昇が抑制された。組織学的には、神経幹細胞はコルチ器近傍で生着していたが、造血幹細胞は外リンパ腔に滞在しコルチ器に移動することはなかった。すなわち両者の作用メカニズムは若干異なり、前者は障害された内毛細胞近傍で直接障害防御に働くのに対し、後者は神経栄養因子であるGDNFの産生増加を介して内耳障害を防御すると考えられた。

はじめに

近年、再生医療に関する研究が進み、その基幹技術である幹細胞を用いた組織再生の方法や知見が累積されつつある。幹細胞は自己増殖能と多分化能を持ち、多種多様な組織・臓器になる能力を備えていることから、不可逆的な障害を受けた組織には再生的に働き機能回復を促進すると考えられる。ヒトの内耳有毛細胞には自己再生能力がないため、慢性期の内耳障害治療には再生医学的アプローチが必要である。内耳再生については、内耳前駆細胞や胚性幹細胞（ES細胞）、神経幹細胞を用いた有毛細胞再生の研究が進められ、動物実験ではある程度の成果が得られている^{1) 2) 3)}。最近の研究によると、障害局所に投与した幹細胞は死滅した神経細胞と置き換わり機能を代行するようになるだけでなく、神経栄養因子を分泌して障害進行を防御する効果もあることが示されている⁴⁾。このため急性期の幹細胞投与は神経細胞との置換だけでなく、神経栄養因子の合成促進を通して内耳障害防御に働くと期待される。

一般に幹細胞はES細胞と組織特異的幹細胞とに分類される。神経幹細胞は組織特異的幹細胞に属し、近年、胎児のみならず成体からも分離培養ができるようになり、中枢神経系の再生医療につながると期

待されている。一方、造血幹細胞は自己の骨髄より比較的容易に採取・分離ができ、倫理や移植免疫などの問題がないため、臨床応用に適した供給源と考えられている。

以下、本研究では神経幹細胞あるいは造血幹細胞を鼓室階に注入し、虚血による内耳障害の防御効果を検討した。

神経幹細胞

【実験方法】

神経幹細胞は胎児の脳より採取した。妊娠17日目のスナネズミより胎児を取り出し、実体顕微鏡下に軟膜を外して脳を摘出、線条体を取り出した。細胞に障害を与えぬよう剥離細断し、その浮遊液をBFGF (40 µg/ml) を含む培養液に加えCO₂ incubatorにて培養、1週間目にコロニーを形成している細胞を選び出してsubcultureを行い、神経幹細胞を採取した。

レシピエントのスナネズミには15分間の一過性内耳虚血を負荷した。その翌日、耳胞を開放し、ガラス毛細管を正円窓に挿入してマイクロインフュージョンポンプを用いて神経幹細胞 $5 \times 10^4/4 \mu\text{l}$ を左側蝸牛に注入した（神経幹細胞注入群）。また右側の蝸牛には注入は行わず虚血群とした。

1. ABRの測定

虚血前および虚血4、7日後にABRを測定した。刺激音には8kHzのトーンバーストを用い、耳後部および頭頂部に留置した電極より反応を導出、300回の加算を行い、閾値を求めた。

2. ネスチン染色

虚血4日後に耳朧から蝸牛を取り出し、灌流固定を行った後、surface preparation法にてコルチ器を採取した。幼弱細胞のマーカであるネスチンに対する免疫染色を行うことにより、注入した神経幹細胞の蝸牛内での局在を確認した。

3. 透過型電子顕微鏡による観察

ネスチン染色を行った標本をPBSにて洗浄し、2%オスニウム酸にて後固定した。これを包埋して切片を作製し、透過型電子顕微鏡にて観察した。これにより虚血による有毛細胞の形態学的変化を観察するとともに、移植した神経幹細胞の局在を確認した。

4. 走査型電子顕微鏡による観察

虚血7日後の蝸牛を灌流固定後、走査型電子顕微鏡を用いてコルチ器を観察した。

【結果】

虚血前を基準とした場合、7日後のABR閾値上昇は虚血群が 24.5 ± 7.9 dBに対し、神経幹細胞投与群



図1 コルチ器のネスチン染色像（基底回転）
a：虚血群、b：神経幹細胞注入群

虚血4日後のコルチ器において、虚血群ではネスチン陽性細胞はみられなかったが、神経幹細胞注入群では内毛細胞近傍に陽性細胞が多数認められた。

は 13.3 ± 8.6 dBであり、後者の閾値上昇は有意に軽減されていた。

ネスチン染色による検討を行ったところ、神経幹細胞投与群では基底回転の内毛細胞近傍にネスチン陽性細胞がみられたが、虚血群では陽性細胞は認められなかった（図1）。

透過型電子顕微鏡による観察を行うと、虚血群では内毛細胞とこれにシナプスを形成する蝸牛神経樹状突起に著明な空胞形成と細胞膜破壊が観察された（図2a）。神経幹細胞投与群ではこのような内毛細胞や樹状突起の変性はみられなかった（図2b-1）。また注入した神経幹細胞が内毛細胞直下のコ

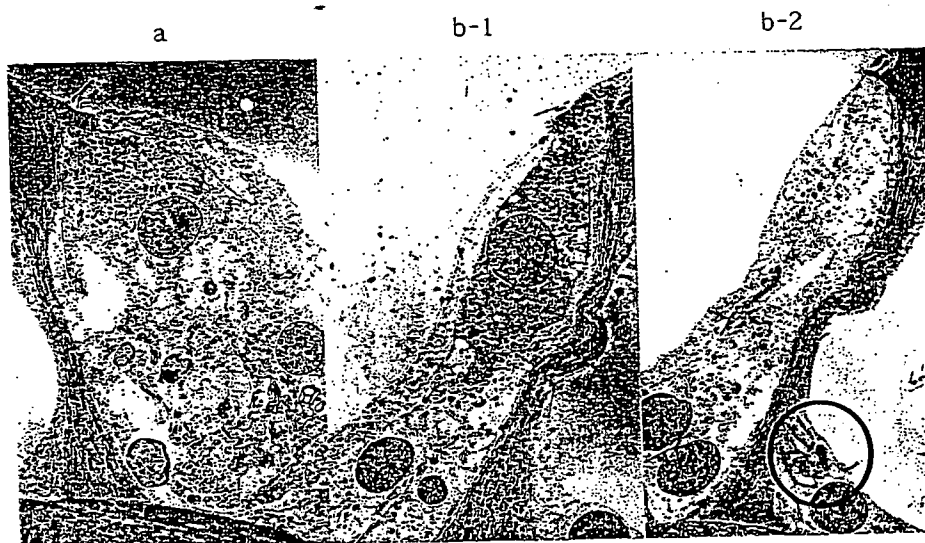


図2 透過型電子顕微鏡による有毛細胞の観察

虚血群 (a) においては有毛細胞と求心系神経細胞の樹状突起に空胞形成と細胞膜の破壊が観察された。神経幹細胞注入群ではこのような変性は認められず (b-1)、神経幹細胞が内毛細胞直下のコルチトンネルに沿って生着している像が見られた (b-2)。