

Ⅲ. 虚血性内耳障害のメカニズム

2. 一酸化窒素 (NO) による障害機序

【要約】一酸化窒素 (NO) は循環系や神経系における情報伝達に関わるだけでなく、感染、炎症、免疫反応のメディエーターとしての作用も有するなど、生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。しかし一方で、NOが過剰に産生されると組織障害を引き起こす。NOの過剰産生には誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible NO synthase: iNOS) が関与する。これまでの研究から、耳毒性薬剤や内リンパ水腫が有毛細胞や支持細胞、血管条などにiNOSを誘導することは知られているが、一過性内耳虚血がiNOSを誘導するか否かについては分かっていない。そこで内耳の一過性内耳虚血モデルを用いてiNOS発現を免疫組織学的に検討した。その結果、虚血1日後から4日後にかけて外有毛細胞やラセン神経節細胞、ラセン板縁、血管条、ラセン靭帯にiNOSの発現がみられた。しかし内毛細胞にはiNOS発現を認めず、その障害メカニズムにiNOSは関与しないと思われた。高速液体クロマトグラフィーを用いて蝸牛内の窒素酸化物 (NOx) を測定したところ、虚血1日後に有意なNOxの増加を認めた。このNOxの増加はiNOSの選択的阻害剤であるアミノグアニジンを投与することにより抑制された。以上の結果より、虚血1日後に認められたNOxの増加はiNOSに由来しており、多量に産生されたNOが一過性内耳虚血による内耳障害メカニズムに関与することが示唆された。

はじめに

一酸化窒素 (nitric oxide: NO) はNO合成酵素 (NO synthase: NOS) の働きによりL-アルギニンから産生される脂溶性のラジカルであり、細胞内においては可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化してサイクリックGMP産生を促進する。

これまでの研究から、NOは循環系や神経系の情報伝達に関わるだけでなく、感染、炎症、免疫反応のメディエーターとしての作用を持つなど多彩な生理機能を有することが分かっている。心血管系では、nNOSやeNOSから産生されたNOが血管の緊張や循環動態を調節している。NOにはニューロン間の神経伝達物質としての作用もあり、中枢神経系では高次神経機能に関与し、末梢神経系では非アドレナリン非コリン性神経伝達物質として血管・消化管平滑筋の神経調節に関与している。一方、炎症や感染などの病変部では活性化されたマクロファージや白血

球などにiNOSが発現し、多量のNOを産生する。iNOSから産生されるNOの量は他のNOSの約1000倍にも達する¹⁾。このNOは抗炎症作用や抗菌作用を発揮し生体防衛的に働くが、過剰に産生された場合は血圧低下や組織障害などを引き起こす。脳虚血に関する研究によると、iNOSは虚血12時間後から発現し48時間後にピークを迎え、数日後に始まる遅延性神経細胞死 (delayed neuronal death) を誘導するという²⁾。Iadecolaら³⁾はiNOS欠損マウスではワイルドタイプと比べ脳虚血後の梗塞範囲が有意に小さいことを報告している。Zhangら⁴⁾もiNOSの選択的阻害剤であるアミノグアニジンを虚血24時間後に投与すると、実験的に作成した脳梗塞の範囲が縮小することから、iNOSの発現が虚血病変増悪の原因であろうと推察している。このようにiNOSの発現は虚血性病変の治療を考える上で重要な因子と考えられるが、これまで虚血性内耳障害におけるiNOSの関与についての報告はない。

本研究では虚血性内耳障害モデルを用いて内耳におけるiNOSの発現を免疫組織学的に検討するとともに、高速液体クロマトグラフィー法を使用してNOxの経時的变化を測定した。

実験方法

1. iNOSの免疫組織学的検討

実験動物には16匹(32耳)のスナネズミを用いた。動物は虚血負荷しないコントロール、虚血1、4、7日後(各々4耳)の4群に分け、免疫組織学的検討を行った。蝸牛を摘出して固定・脱水後、パラフィンに包埋して連続切片(厚さ7 μ m)を作製した。切片は1次抗体として抗iNOS抗体(1:2000 dilution)を用いてビオチン増感ABC法による免疫染色を施した。陰性対照には正常ウマ血清を用いた。切片をPBSで洗浄した後、2次抗体であるbiotin-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin(1:400)と1時間反応させ、さらにABC試薬と1時間反応させた。抗体結合部位は0.01%過酸化水素を添加した3-3'-diaminobenzidine(DAB)で発色させ、染色度を光学顕微鏡下に観察した。

2. NOxの測定

実験動物には24匹(48耳)のスナネズミを用いた。これらはコントロール、虚血1、4、7日後(各々6耳)

の4群に分け、NOxを測定した。また、iNOS阻害剤の効果を検討するためコントロール、虚血1、4、7日後(各々6耳)の各群にiNOS阻害剤を投与しNOxを測定した。iNOSの選択的阻害剤にはアミノグアニジン(aminoguanidine;100 mg/kg i.p.)を用い、コントロール群には1回の腹腔内投与を行い、また虚血1、4、7日後の各群には虚血直後と、その後は24時間ごとに腹腔内投与を行った。

中耳骨胞を開放した後、蝸牛を明視下におき基底回転鼓室階に小孔をあけ、透析プローブ(膜長5 μ m, 直径0.22mm)を挿入して1 μ l/minのスピードでリング液を灌流させた。10分ごとに回収された灌流液をオートインジェクタにより自動的に酸化窒素分析システムに送り、NOxを測定した。

結果

1. iNOSの発現とその分布

コントロール群では内耳のいずれの部位にもiNOS発現を認めなかった。しかし、虚血1日後には外有毛細胞や支持細胞、ラセン神経節細胞、ラセン板縁(図1)、および血管系やラセン韧带(図2)にiNOSの強い発現を認めた。虚血4日後でもこれらの部位にiNOSの発現を認めたが、7日後にはラセン神経節細胞と支持細胞であるダイテルス細胞に軽度の発現

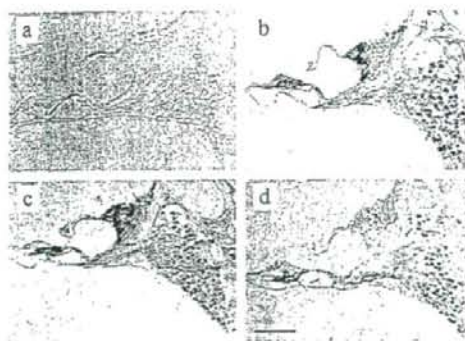


図1 コルチ器およびラセン神経節におけるiNOSの発現

コントロール群(a)ではiNOSの発現を認めないが、虚血1日後(b)および4日後(c)では外有毛細胞や支持細胞、ラセン神経節細胞、ラセン板縁にiNOSの強い発現を認めた。虚血7日後(d)にはラセン神経節細胞とダイテルス細胞に軽度の発現を認めるのみであった。(scale bar = 60 μ m)

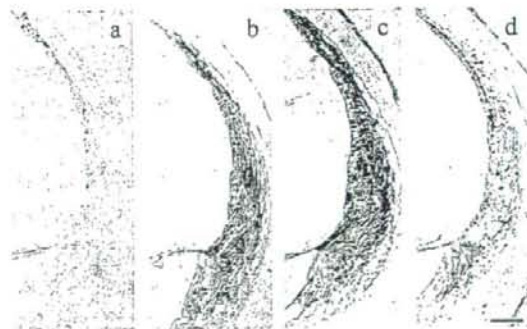


図2 蝸牛外側壁におけるiNOSの発現

コントロール群(a)ではiNOSの発現を認めないが、虚血1日後(b)および4日後(c)では血管系、ラセン韧带にiNOSの強い発現を認めた。しかし虚血7日後(d)にはiNOSの発現は低下した。(scale bar = 60 μ m)

がみられたのみで、他の部位にはみられなかった。

2. NOx

コントロール群におけるNOxは 9.1 ± 3.9 pmol/ 10μ lであった。しかし、虚血1日後には 28.7 ± 3.9 pmol/ 10μ lとコントロール群に比べ約4倍に増加した。虚血4日後にはコントロール群と比べ増加していたが有意差は認めず (17.2 ± 5.6 pmol/ 10μ l)、7日後には同程度にまで減少した (6.9 ± 2.9 pmol/ 10μ l)。

アミノグアニジンを投与した場合、コントロール群のNOx値 (10.8 ± 3.4 pmol/ 10μ l) は投与しなかった群との比較で有意差はなかった。虚血1日後のNOx上昇はアミノグアニジン投与により有意に抑制された。さらに虚血4、7日後においてもアミノグアニジン投与でNOxの産生は減少した (図3)。

考 察

これまで「内耳にはnNOSやeNOSは発現するが、iNOSは認めない」とされていたが、最近になり炎症性サイトカインの刺激により内耳においてもiNOSが誘導されることが分かってきた。Takumidaら⁹⁾はLPSをモルモットの中耳腔に投与し、内耳にiNOSが発現することを証明した。その後、ゲンタマイシン¹⁰⁾ やシスプラチンの投与¹¹⁾、内リンパ水腫¹²⁾、

加齢¹³⁾ など様々な内耳障害モデルにおいてiNOSの発現が報告されている。しかしこれまで内耳虚血障害とiNOSとの関連について研究した報告はなく、虚血によりiNOSが誘導されるのか、その場合はどこに発現するかなどは不明であった。本研究の結果、虚血1、4日後に外有毛細胞や求心性蝸牛神経終末、支持細胞、血管条などにiNOSの発現を認めたが、内有毛細胞ではiNOSは発現せず、虚血による内有毛細胞障害にiNOSは関与しないと思われる。また虚血7日後にはダイテルス細胞とラセン神経節細胞に軽度の染色性は認めるものの、他の部位では消失しており、虚血によるiNOS発現は一過性であった。

虚血前後のNOx量を測定すると、虚血1日後が最大であり、この時は蝸牛内のiNOS発現も顕著であった。今回は鼓室階のNOx値を測定したが、虚血の影響がより高度な中央階ではさらに多量のNOxが産生されていた可能性がある。NOは他のフリーラジカルと反応して障害性を高めることが知られている^{10) 11)}。特にスーパーオキシドラジカル (O_2^-) とは速やかに反応してペルオキシ亜硝酸イオン ($ONOO^-$) を生成するが、 $ONOO^-$ には強い酸化力があり、脂質過酸化作用や酵素不活性化作用などにより高度の組織障害をきたす。したがって内耳虚血においては、蝸牛で産生された多量のNOxが内有毛細胞以外の内耳組織障害に関与すると推察された。

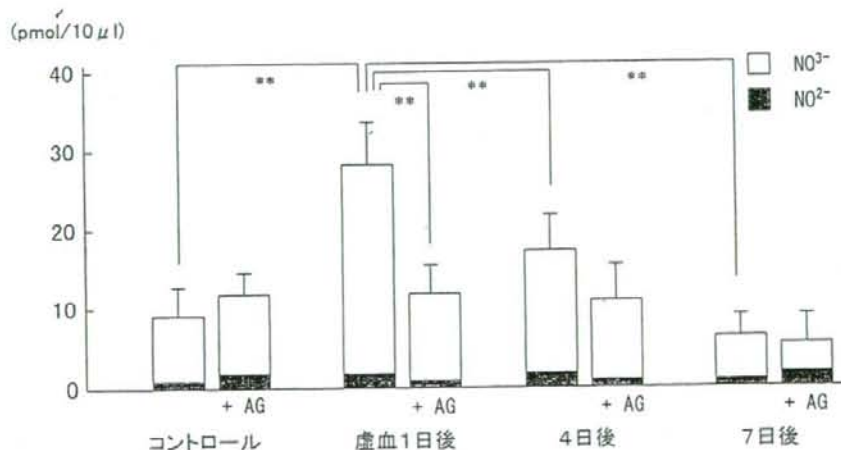


図3 虚血後の鼓室階NOx濃度の推移とアミノグアニジンの効果

AG:アミノグアニジン, **: $p < 0.01$

アミノグアニジンはiNOSの選択的阻害剤であるが、これを投与すると虚血1日後のNOx産生が著明に減少したことから、虚血によるNOx増加はiNOS発現の結果と考えられた。Tsujiら¹²⁾はモルモットを用いた虚血-再灌流実験で、iNOS選択的阻害剤を虚血直前および、その後は12時間毎に腹腔内に投与すると、虚血直後は全く効果がないが、虚血1、3、5日後には聴力閾値の上昇が抑制されたと報告している。一方、Tabuchiら¹³⁾は虚血前にnNOS選択的阻害剤である3-bromo-7-nitroindazole、あるいはiNOS選択的阻害剤のアミノグアニジンを投与し、虚血4時間後に蝸電図を測定したところ、前者を投与した群ではCAP (compound action potential) の閾値上昇は抑制されたが、後者を投与した群では変化がなかったとしている。これらの事実は虚血後早期の蝸牛障害にはnNOSが、虚血後数日にわたる比較的長期の蝸牛障害にはiNOSが関与することを示唆している。すなわちiNOSの選択的阻害剤は虚血1日～数日後までの内耳障害に対して有効であると思われた。

(盛實 勲)

- 8) Michel O, Hess A, Su J, Bloch W, Stennert E, et al : Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the hydroptic cochlea of guinea pigs. *Hear Res* 2000 ; 143 : 23-28.
- 9) Inafuku S, Wu M, Kimura M, Nakayama M, Nakano T, et al : Immunohistochemical demonstration of inducible nitric oxide and nuclear factor-kappa B with reference to age-related changes in the mouse spiral and vestibular ganglion. *Okajimas Folia Anat Jpn* 2000 ; 77 : 125-131.
- 10) Amaee FR, Comis SD, Osborne MP : NG-methyl-L-arginine protects the guinea pig cochlea from the cytotoxic effects of pneumolysin. *Acta Otolaryngol* 1995 ; 115 : 386-391.
- 11) Amaee FR, Comis S, Osborne M, Drew S, Tarlow MJ : Possible involvement of nitric oxide in the sensorineural hearing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol* 1997 ; 117 : 329-336.
- 12) Tsuji S, Tabuchi K, Hara A, Kusakari J : Long-term observations on the reversibility of cochlear dysfunction after transient ischemia. *Hear Res* 2002 ; 166 : 72-81.
- 13) Tabuchi K, Tsuji S, Asaka Y, Hara A, Kusakari J : Ischemia-reperfusion injury of the cochlea : effects of an iron chelator and nitric oxide synthase inhibitors. *Hear Res* 2001 ; 160 : 31-36.

参考文献

- 1) 鈴木敬一郎、谷口直之 : NO : 活性酸素、抗酸化酵素とのクロストーク。NOの生理作用と疾患。谷口直之、鈴木敬一郎編。羊土社 1999 : 12-18.
- 2) Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL : Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997 ; 28 : 1283-1288.
- 3) Iadecola C, Zhang F, Casey R, Nagayama M, Ross ME : Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene. *J Neurosci* 1997 ; 17 : 9157-9164.
- 4) Zhang F, Casey RM, Ross ME, Iadecola C : Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1996 ; 27 : 317-323.
- 5) Takumida M, Anniko M, Popa R, Zhang M : Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti. *Hear Res* 2000 ; 140 : 91-98.
- 6) Takumida M, Popa R, Anniko M : Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *J Otorhinolaryngol* 1999 ; 61 : 63-70.
- 7) Watanabe K, Hess A, Bloch W, Michel O : Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatin. *Anticancer Drugs* 2000 ; 11 : 29-32.

III. 虚血性内耳障害のメカニズム

3. フリーラジカルによる障害機序

【要約】虚血障害におけるフリーラジカルの関与について文献的考察を行うとともに、一過性内耳虚血に対するフリーラジカル消去剤（エダラボン）の効果を実験的に検討した。フリーラジカルとは不対電子をもつ化学的に不安定な原子、分子、またはイオンであり、非常に反応性に富むため周囲の分子との間で活発な電子の受け渡しを行い、細胞膜リン脂質に作用して連鎖的な酸化障害を引き起こし細胞死をきたす。動物実験において虚血直後にエダラボンを投与すると、虚血による難聴や有毛細胞の脱落は有意に抑制された。このことから一過性内耳虚血の障害プロセスにはフリーラジカルが関与すること、フリーラジカル消去が内耳障害防御に有効であることが示された。

はじめに

近年様々な疾患の発症や病状増悪にフリーラジカルが関与することが明らかとなってきた。耳科領域では内耳虚血だけでなく、薬剤性難聴や音響外傷においてもフリーラジカルの関与が実験的に証明されており¹⁾²⁾、細胞障害時のフリーラジカルの関与は非特異的なメカニズムともいえる。したがってフリーラジカルにより引き起こされる細胞障害を防御することは、その原因に関わらず、急性期疾患に対応する際の治療戦略として有効と考えられる。本章では虚血障害におけるフリーラジカルの関与について解説するとともに、虚血性内耳障害に対するフリーラジカル消去剤の効果³⁾を実験的に検討した。

虚血障害におけるフリーラジカルの関与

1. 高度虚血

栄養血管の完全な閉塞や長時間虚血の場合、低酸素やATP枯渇、 Na^+ や Ca^{2+} 、水分子の細胞内流入に伴い浸透圧が高まって細胞は膨化し、さらに蛋白分解酵素が活性化されて細胞骨格の崩壊がおこり細胞は壊死（ネクローシス）に陥る。したがって高度虚血の場合、フリーラジカルの関与は大きくない。

2. 軽度虚血ならびに一過性虚血

虚血が比較的軽度の場合や、一過性あるいは短時間虚血では、虚血直後の障害は軽微であり細胞の脱落も少ないが、時間経過とともに障害は顕著となる。これは高度虚血の周辺部でも同様で、直後の障害は軽微でも次第に増悪し、最終的に高度の細胞障害をきたす。急性期には酸素濃度低下やATP産生の低下とともに、 Ca^{2+} の細胞内流入がおこる。細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると、細胞膜リン脂質を分解するホスホリパーゼ（phospholipase）C、A2が活性化され、蛋白分解酵素であるcalpainや各種の蛋白リン酸化酵素、一酸化窒素合成酵素（NOS）の活性化もおこる。さらにアラキドン酸カスケードが活性化されてフリーラジカルが産生され、細胞膜やミトコンドリア膜に酸化ストレスを与えて破壊する。このような障害は遺伝子に組み込まれた細胞死プログラムを刺激しアポトーシスを惹起する⁴⁾。

一過性虚血では血流再開時にフリーラジカルが増加する。したがって虚血後の遅発性障害や虚血周辺部の障害に対しては、急増したフリーラジカルを抑制することが治療戦略上、極めて重要である。近年、心筋細胞や肝細胞、血管内皮細胞、腎細胞においても虚血再灌流時のフリーラジカル急増が細胞死を惹起するとの報告がなされており、フリーラジカル消去剤によるアポトーシス防御に大きな期待が寄せら

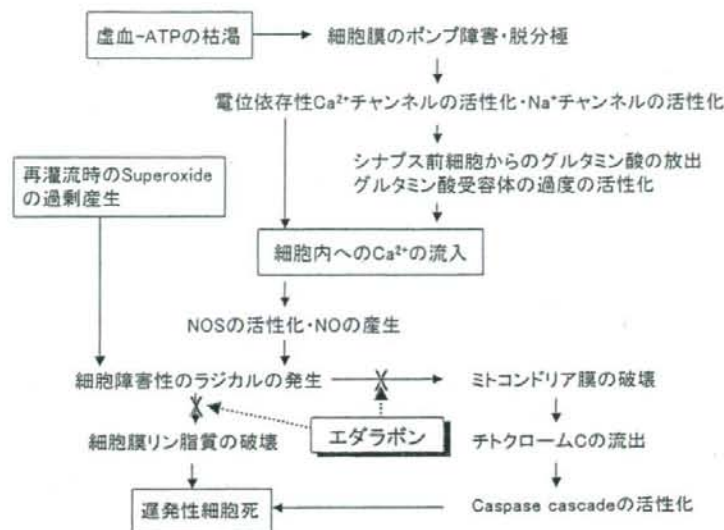


図1 虚血障害のメカニズムとエダラボンの作用機序

エダラボンは虚血により発生したフリーラジカルを消去して無毒化し、細胞膜やミトコンドリア膜が過酸化されるのを防ぐ³⁾。

れている(図1)。

一方、脳虚血に関する研究によると、一部の神経細胞(海馬CA1領域など)は虚血に対して極めて脆弱であり、選択的に細胞死に至る。この選択的脆弱性はグルタミン酸-カルシウム説で説明される。その根拠として、①興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は過剰に遊離されて過度に受容体に働くと、興奮毒性(excitotoxicity)をきたし神経細胞を障害する、②虚血に脆弱な神経系(海馬、大脳皮質、線条体、小脳)の分布とグルタミン酸の脳内分布が近似している、③グルタミン酸拮抗剤の使用が遅発性細胞死を防御する、などが挙げられている。

グルタミン酸は内耳において求心性聴覚路一次シナプスの神経伝達物質として豊富に存在することから、脳と同じようなメカニズムで内耳障害が起こることが考えられる。虚血による細胞死のメカニズムは単純ではないが、細胞内へのCa²⁺流入を抑制しアポトーシスを阻止することが遅発性細胞死を防御することにつながる。

3. フリーラジカル消去剤の作用機序

フリーラジカルとは不対電子をもつ化学的に不安定な原子、分子、またはイオンであり、非常に反応

性に富むため、周囲の分子との間で頻りに電子の受け渡しを行い、連鎖的な酸化反応を引き起こす。生体内でフリーラジカルが発生すると、細胞膜のリン脂質に作用して酸化障害を引き起こす。虚血・再灌流の場合、ミトコンドリアやアラキドン酸から産生されたスーパーオキシドアニオンラジカル(O₂^{•-})はFe²⁺の存在下で・OHに変換される。またO₂^{•-}はNOと反応してONOO⁻に変換され、このONOO⁻からも・OHが生成される。これらフリーラジカルは不飽和脂肪酸から水素原子を引き抜いて脂質ラジカルを生成するので、脂質過酸化の反応連鎖が始まり細胞膜が損傷される⁵⁾⁶⁾。一方、フリーラジカルを消去し無毒化する物質も生体内で発見されている。これらはフリーラジカル消去剤あるいは抗酸化剤と呼ばれ、ビタミンC、ビタミンEなどが知られている。

脳梗塞急性期の治療薬として開発されたエダラボンは、フリーラジカル消去剤であり、・OHのみならず酸化力の強い他のフリーラジカルも消去し幅広い抗酸化活性を有している。すなわちエダラボンは酸化力をほとんど持たないO₂^{•-}には作用しないが、強力な酸化力を有する・OHを消去し過酸化反応を抑制する。しかも各種受容体や酵素活性には影響を及ぼ

さない。

培養細胞実験によれば、エダラボンは中枢神経細胞や脊髄前角細胞、肺胞上皮、消化管上皮、血管内皮細胞、心筋細胞、腎細胞の虚血障害に対しても効果があると報告されており、様々な分野での応用が期待される。

フリーラジカル消去剤（エダラボン）の効果

虚血性内耳障害に対するエダラボンの効果を検討する目的で、一過性内耳虚血モデルを用いて聴力や内耳組織への影響を検討した。この実験では、反応性が高いため直接生体での測定が困難なフリーラジカル産生の有無を、消去剤投与の効果調べることで評価した。

【実験方法】

実験にはスナネズミ18匹18耳を使用した。実験動物は以下の3群に分けた。すなわち、①非虚血-エダラボン群：椎骨動脈は遮断せず、エダラボン1mg/kgを大腿静脈より投与、②虚血-エダラボン群：虚血処置を施し、エダラボンを1mg/kg 大腿静脈より投与、③虚血-生食群：虚血処置を施し、生食を大腿静脈より投与、である。

両側の椎骨動脈血流を15分間遮断した後、血流再開を確認した。その後、ただちに鼠径部の皮膚を切開して大腿静脈を同定、これを切開してカテーテルを挿入し固定した。カテーテル内への血液の逆流を確認した後、薬剤を投与した。投与後は大腿静脈を結紮して閉鎖した。なお、投与したエダラボンは1mg/kg（1mgを生食1mlに溶解）とし、対照とした虚血-生食群では同量の生理食塩水を静注した。

聴力測定には信号処理装置（Synax1200, NEC, Tokyo, Japan）を用い、8kHzのtone burst に対するABRを記録した。なお、ABRの測定は虚血前日、虚血1日後、4日後、7日後とした。虚血前の聴力を基準とし聴力閾値の変化を比較し、その差を聴力障害の程度と定義した。

組織学的検討では、虚血7日後のABR測定終了後、蝸牛骨胞を摘出し灌流固定した。surface preparationにてコルチ器を採取し、Rhodamine-phalloidin染色にて基底回転の有毛細胞を観察、脱落した細胞数

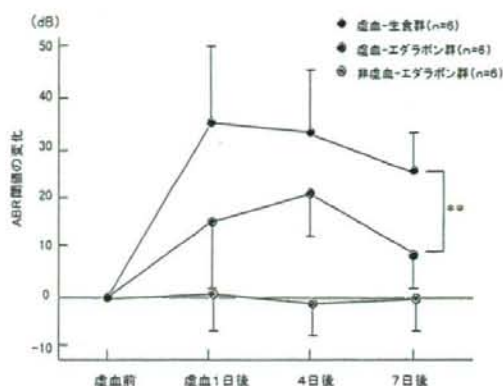


図2 ABRを指標としたエダラボンによる虚血性内耳障害の防御効果

内耳虚血負荷後のABR閾値の経時的变化を示す。エダラボン投与により虚血後のABR閾値上昇は有意に抑制された (** $p < 0.01$)。

計測し全細胞に対する脱落細胞の割合(%)を求めた。

【結果】

ABR閾値の経時的变化を図2に示す。非虚血-エダラボン群では閾値の変化は認められなかった。虚血負荷によりABR閾値は上昇したが、その程度は7日後で虚血-生食群が 24.1 ± 4.2 dB、虚血-エダラボン群が 7.5 ± 4.2 dBであり、後者は前者に比べ有意に閾値上昇が軽度であった。

虚血7日後の組織所見を図3に、またこの時の内毛細胞の脱落率を図4に示す。基底回転における

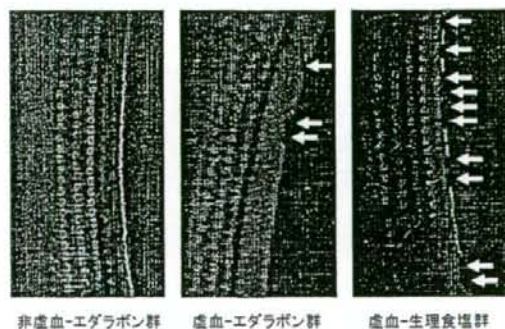


図3 コルチ器のRhodamine-phalloidin染色所見 (虚血7日後、基底回転)

内毛細胞の脱落は虚血-生食群が最も多く、次いで虚血-エダラボン群、非虚血-エダラボン群の順であった。矢印は脱落した細胞を示す。

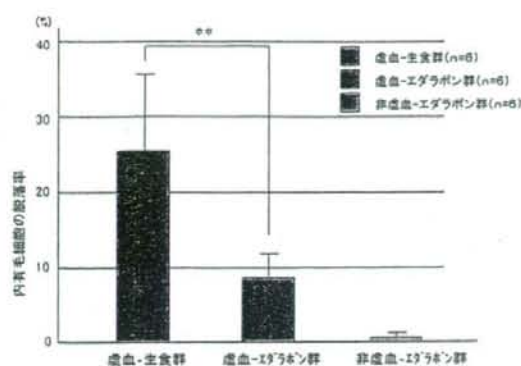


図4 基底回転における内耳毛細胞の脱落率とエダラボンの効果

エダラボンを虚血直後に投与すると内耳毛細胞の脱落を有意に抑制した (**: $p < 0.01$)。

内耳毛細胞の脱落率は非虚血-エダラボン群が $0.3 \pm 0.5\%$ 、虚血-生食群が $26.5 \pm 11.4\%$ 、虚血-エダラボン群が $8.8 \pm 3.5\%$ であり、各群間に統計学的な有意差を認めた。なお、いずれの群も外有毛細胞にはほとんど障害を認めなかった。

考 察

今回の実験の結果、エダラボンは内耳障害をきたすことはなく、内耳虚血直後に投与すれば著明な内耳保護効果を有することが示唆された。本剤はフリーラジカルによる細胞膜・ミトコンドリア膜障害に対して、直接ラジカルを消去することにより保護効果を示す薬剤であり、神経細胞に限らず全ての細胞に対して効果を持つと推察される。ミトコンドリア膜を保護することでチトクロームCの細胞質内への移行を阻止しアポトーシスを防御すると考えられた。

本剤を虚血疾患に対して使用する場合、障害局所への薬剤到達の可否が問題となる。通常、エダラボンは静脈投与するが、梗塞の場合は血行障害があるので梗塞中心部 (core) にまで薬剤は到達しない。脳梗塞治療の狙いは血行が残っている梗塞周辺のパナブラ (penumbra) と呼ばれる領域の治療である。一方、一過性虚血の場合は、再灌流後に血栓や白血球凝集、血管周囲浮腫、血管攣縮などの病態が軽微

であれば治療効果が期待できる。我々の動物モデルは後脳虚血を負荷したので、内耳障害のみならず蝸牛神経核や他の脳幹聴覚中継核に対してもエダラボンが保護的に働いた可能性もあるが、これは今後の検討課題であろう。

(前谷俊樹)

参考文献

- 1) Takumida M, Popa R, Anniko M : Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 1999 ; 64 : 63-70.
- 2) Yu HH, Seo SJ, Kim YH, Lee HY, Park RK, et al : Protective effect of *Rehmannia glutinosa* on the cisplatin-induced damage of HEI-OC1 auditory cells through scavenging free radicals. J Ethnopharmacol 2006 ; 107 : 383-388.
- 3) Maetani T, Hakuba N, Taniguchi M, Hyodo J, Shimizu Y, et al : Free radical scavenger protects against inner hair cell loss after cochlear ischemia. Neuroreport 2003 ; 14 : 1881-1884.
- 4) 桐野高明 : 虚血性神経細胞死の最近の考え方. 脳虚血 Update -最近のトピックスと実験手技. 佐野圭司 監修, 文進堂書店 1993 ; 1-14.
- 5) 渡辺俊明, 幸 敏志, 斎藤健一, 佐藤聖子, 杉本次郎, 他 : 新規脳保護薬MCI-186の薬理学的検討. Jpn Pharmacol Ther (薬剤と治療) 1997 ; 25 : 181-188.
- 6) 渡辺俊明, 田中正彦, 渡邊和俊, 高松康雄, 戸部昭広 : 脳保護剤 (フリーラジカル消去剤) エダラボンの研究開発. Yakugaku Zasshi (薬学雑誌) 2004 ; 124 : 99-111.

脳血管攣縮と内耳虚血

はじめに

クモ膜下出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) は、外傷や脳動脈瘤破裂などでクモ膜下腔に出血をきたし、頭蓋内圧上昇や脳虚血、呼吸停止などをおこす疾患であり、対応が遅れば致命的となる。本症の予後を決定する重要な因子の一つに脳血管攣縮 (cerebral vasospasm, CVS) が挙げられる。CVSの存在は半世紀以上も前から知られており、SAHの手術時所見から、脳血管は出血による物理的・化学的刺激によってCVSをきたし、かなり長時間、収縮状態となることが分かっていた。その後、画像検査の発達に伴い、SAH発症数日後より生じる遅延性虚血神経脱落症状 (delayed ischemic neurological deficits, DIND) の多くはCVSによることが確認された。CVSは主に脳主幹動脈や脳表面軟膜動脈に生じる。クモ膜下腔の血腫から放出された物質がCVSを惹起すると考えられる¹⁾。

これまで、ラットやウサギなどでSAH-CVSモデルが作成され、血管攣縮機序の解明に向けた研究が行われてきたが、現在も詳細は不明である。CVSはearly phase (early spasm) とdelayed phase (delayed spasm) の二相に分類されるが、それぞれ機序は異なる。delayed spasmはヒトのCVSに相当すると考えられ、血腫中のオキシヘモグロビン (OxyHb) から生じた活性酸素がプロテインキナーゼC (PKC)、Rho/Rho-K経路などを活性化することにより血管攣縮が生じると考えられている²⁾。

血管攣縮の機序

OxyHbより生じた活性酸素は、フォスホオリパーゼCの活性化やIP3産生、カルシウムチャンネル活性化などを介して、細胞内カルシウム濃度を上昇させる。細胞内カルシウムはカルモジュリンと結合し、ミオシン軽鎖キナーゼ (MLCK) を活性化して平滑筋を収縮させる。Rhoキナーゼ (Rho-K)、PKC、MAPKなどは、平滑筋弛緩作用をもつミオシン軽鎖脱リン酸化酵素のサブユニットをリン酸化すること

により非活化し、血管収縮を遷延化させる (Ca²⁺非依存性収縮)。また、Rho/Rho-K経路はeNOSを非活化することにより血管拡張作用のあるNO産生を抑制している可能性もある。

内耳虚血

突発難聴の原因となりうる内耳虚血病変には、物理的な血管腔の閉塞 (血栓・塞栓)、血流低下 (他部位の出血、ショック、血流動態の変化など)、血管壁病変 (動脈炎・動脈解離・血管攣縮)、血管外病変 (腫瘍・浮腫) などが挙げられる。このうち最も有力な機序として、迷路動脈より末梢の細動脈での血管攣縮が挙げられる。脳動脈の場合、血管によって攣縮の起こり易さに差があることが知られており、たとえば脳表軟膜動脈はOxyHbによる血管収縮が他の動脈よりも高度であることが分かっている。もし、迷路動脈や末梢の細動脈が血管攣縮をきたし易い動脈であると仮定すれば、血管攣縮が突発難聴をきたす可能性がでてくる。これが確認できればエダラボンやRho-K拮抗剤 (fasudil) が有効な治療法になりうる。

(前谷俊樹)

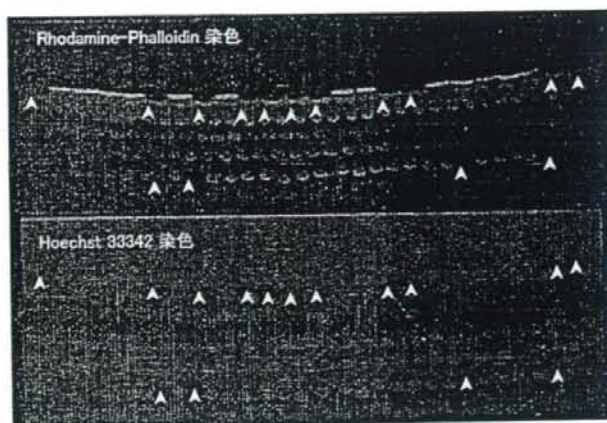
参考文献

- 1) 浅野孝雄: 脳虚血の病態学, 中外医学社; 2003: 377-491.
- 2) 浅野孝雄: フリーラジカルの攣縮への関与とスカベンジャーによる治療, 分子脳血管病 2003; 2: 291-299.

第IV章 内耳障害の防御と治療

1. ジンセノサイド
2. プロサポシン由来合成ペプチド
3. インシュリン様細胞増殖因子1 (IGF-1)
4. 低体温
5. 遺伝子治療
6. 幹細胞移植

コラム「内耳虚血とステロイド」



虚血7日後の有毛細胞脱落

内耳に一過性虚血を誘導すると、エネルギー不全に加えて、フリーラジカルの産生やグルタミン酸の遊離などがおこり、酸化障害やアポトーシスが惹起され有毛細胞やラセン神経節細胞は脱落する。これを防御するには従来からの治療法だけでは限界があり、虚血障害メカニズムに対応した新しい治療法を開発する必要がある。本章では実験動物を用いて、虚血障害に対して有効と考えられる治療候補薬や治療法の検証を行なった。

IV. 内耳障害の防御と治療

1. ジンセノサイド

【要約】虚血性内耳障害に対するGinsenoside Rb1 (gRb1) の効果について動物モデルを用いて検討した。実験動物に15分間の内耳虚血を負荷し、その1時間後にgRb1を大腿静脈より投与した。その後、経時的に聴性脳幹反応 (ABR) を記録するとともに、虚血7日後に蝸牛を採取して組織標本を作製、有毛細胞およびラセン神経節細胞の脱落率を求めた。その結果、虚血7日後におけるABR閾値上昇は虚血群が22.5dB、虚血後gRb1を投与した群 (虚血-gRb1群) が14.2dBであり、虚血によるABR閾値上昇はgRb1投与により有意に軽減された。組織学的にも内毛細胞の脱落率は虚血群が26.5%、虚血-gRb1群が8.6%であり、ラセン神経節細胞の脱落率は虚血群が32.5%、虚血-gRb1群が9.8%と、gRb1投与により内毛細胞やラセン神経節細胞の障害は軽減された。以上の結果より、gRb1には虚血による内耳障害を防御する効果があると結論した。

はじめに

Ginsenoside Rb1 (gRb1) は漢方生薬である朝鮮人參 (Panax Ginseng) の有効成分の一つであり、サポニン配糖体として多様な薬理作用を有することが知られている。すなわちgRb1には中枢神経抑制、催眠、鎮痛、精神安定、解熱、蛋白合成促進、中性脂肪分解抑制及び合成促進、コレステロール合成促進、プラスミン活性化、副腎皮質ホルモン分泌促進、血管再生、血流改善などの作用に加え、最近になり脳の虚血性細胞障害を防御する作用もあることが分かってきた¹⁾。このような背景から現在、gRb1は脳梗塞など虚血性障害の有望な治療薬の候補として注目されている。

われわれは一過性内耳虚血の動物モデルを用いて虚血後の内耳機能および組織障害について検討を行ってきた。その結果、虚血7日後には主に基底回転において有毛細胞が障害され、その機序にアポトーシスが関与することを報告してきた^{2) 3) 4) 5)}。前述のようにgRb1には脳での虚血性細胞障害を防御する効果があることから、内耳の虚血障害に対しても同様の効果が期待できる。そこで今回、一過性内耳虚血の動物モデルを用い、有毛細胞やラセン神経節細胞

の虚血障害に対するgRb1の効果を検討した。

方 法

1. 一過性内耳虚血の負荷

実験動物にはスナネズミを用い、全身麻酔後、椎骨動脈の血流を両側同時に15分間遮断した⁶⁾。

2. gRb1の投与

本実験にはPanax Ginsengから精製した純度99%のgRb1を使用した。内耳虚血1時間後、生理食塩水に溶解したgRb1 (50 μ g/200 μ l) を大腿静脈から緩徐に投与した。対象は2群に分け、虚血のみの群 (虚血群、n=6) と虚血後にgRb1を投与した群 (虚血-gRb1群、n=6) で比較を行った。

3. 聴性脳幹反応 (Auditory Brainstem Response : ABR) の測定

虚血前、虚血1日後、4日後、7日後にABRを測定した。刺激音には8kHz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) を用い、300回の加算を行った。刺激音圧は5dBステップで増減させABRの閾値を求めた。

4. 有毛細胞の観察

虚血7日後に有毛細胞の観察を行った。対象は虚

血群6匹、虚血-gRb1群6匹とした。蝸牛骨胞を摘出後、内耳の局所灌流固定を行い、その後Tarnowskiら⁷⁾の方法に準じて8kHzに相当する基底回転周辺のコルチ器を実体顕微鏡下に採取した。標本から切片を作製してRhodamine-phalloidinにて染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。基底回転の有毛細胞の生細胞数と死細胞数より脱落率 $\left(\frac{\text{死細胞数}}{\text{生細胞数} + \text{死細胞数}} \times 100\%\right)$ を算出した。

5. ラセン神経節細胞の観察

虚血群(n=6)と虚血-gRb1群(n=6)に分けてラセン神経節細胞の組織学的観察を行った。虚血7日後に蝸牛を採取し、脱灰後、パラフィンに包埋した。蝸牛軸に沿って厚さ6 μm の連続切片を作製し、Hematoxyline-Eosin (HE) 染色後、Shinoharaら⁸⁾の方法に従ってラセン神経節のI型神経細胞数を算出した。

結 果

虚血前後のABR閾値の変化を図1に示す。虚血前の閾値を基準(0dB)とした場合、虚血群では1日後のABR閾値上昇は $40.0 \pm 4.1\text{dB}$ 、7日後は $22.5 \pm 2.9\text{dB}$ であった。虚血-gRb1群では1日後が $26.7 \pm 5.1\text{dB}$ 、7日後が $14.2 \pm 3.8\text{dB}$ であり、gRb1投与によりABR閾値上昇は有意に抑制された。なお、本研究で用いた内耳虚血モデルは椎骨動脈血流を遮断したため、内耳だけでなく脳幹や小脳も虚血障害を受けている可能性がある。そこで聴覚伝達路への虚血の影響を検討する目的でABRのI-V波間潜時(音刺激:100dB)の平均値を求めたところ、虚血前が2.70ms、1日後が2.79ms、7日後が2.73ms(各々、n=6)とほとんど変化を認めなかった。したがって本モデルにおける聴力障害は主に内耳やラセン神経節の障害によるものであり、脳幹聴覚伝達路の障害は生じないと思われた。

虚血7日後における基底回転の蛍光顕微鏡所見を図2に示す。虚血群では多くの内毛細胞の脱落を認め、少数ではあるが外毛細胞の脱落もみられた。これに対し虚血-gRb1群では虚血群のような高度の細胞脱落はなく、内毛細胞がわずかに脱落している程度であった。

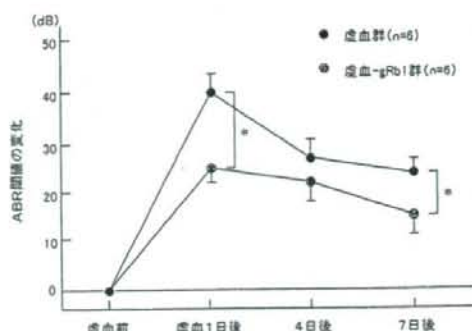


図1 ABR閾値の推移

虚血前のABR閾値を基準(0dB)とした。
(*: $p < 0.05$)

これら2群における内毛細胞の脱落率を図3に示す。虚血7日後の脱落率は、虚血群が $26.5 \pm 11.4\%$ 、虚血-gRb1群が $8.6 \pm 2.6\%$ であり、gRb1投与により内毛細胞の脱落率は有意に減少した。

図4に虚血7日後の基底回転におけるラセン神経節細胞のHE染色所見を示す。Rosenthal管内のラセン神経節細胞は虚血群では著明に減少していたが、虚血-gRb1投与群では神経節細胞の構造はほぼ保たれており脱落は軽微であった。次にラセン神経節細

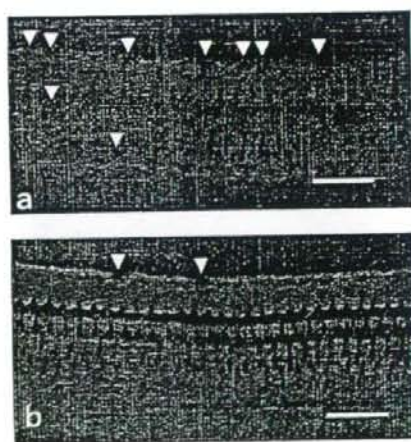


図2 有毛細胞の蛍光顕微鏡所見(虚血7日後、基底回転、Rhodamine-phalloidin染色)

虚血群(a)では内毛細胞の脱落(矢頭)が多数認められたが、虚血-gRb1投与群(b)では脱落は少数であった。(scale bar=20 μm)

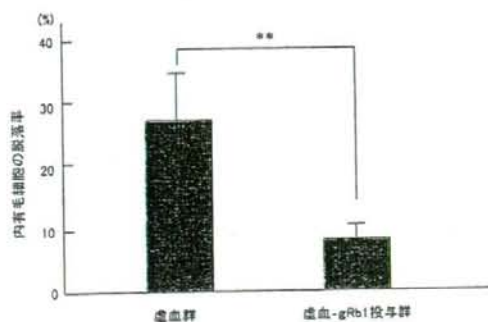


図3 虚血7日後における内耳毛細胞の脱落率

虚血-gRb1投与群の脱落率は虚血群と比べ有意に低い。(**: $p < 0.01$)

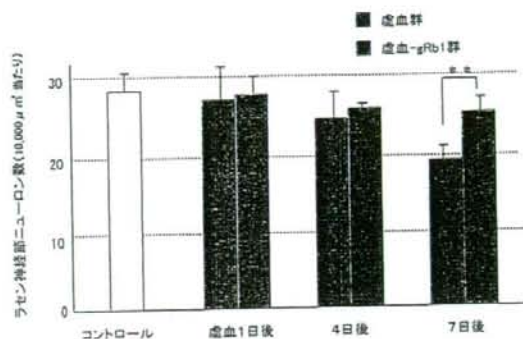


図5 虚血後のラセン神経節細胞密度 (基底回転)

虚血7日後において、残存するラセン神経節細胞数は虚血-gRb1群の方が虚血群よりも有意に多い。(**: $p < 0.01$)

胞数から単位面積当たりの細胞密度を計測したところ、虚血を負荷していない状態(コントロール群、 $n = 6$)では $28.6 \pm 2.6/10^4 \mu\text{m}^2$ であったが、虚血群では1日後が $27.8 \pm 3.3/10^4 \mu\text{m}^2$ 、4日後が $24.1 \pm 3.0/10^4 \mu\text{m}^2$ 、7日後が $19.3 \pm 2.1/10^4 \mu\text{m}^2$ と徐々に減少した。すなわちコントロール群($n = 6$)を基準とした場合、神経細胞の脱落率は虚血1日後が2.8%、4日後が15.7%、7日後が32.5%であり、ラセン神経

節細胞の障害は徐々に進行することが示された。一方、虚血-gRb1群の虚血7日後のラセン神経節細胞密度は $25.8 \pm 3.1/10^4 \mu\text{m}^2$ であり、脱落細胞割合は9.8%であった(図5)。虚血-gRb1群の脱落率は虚血群と比べて有意に低かった($p < 0.01$)。

考 察

朝鮮人参(Panax ginseng)はオタネニンジンという和名をもつウコギ科の多年性植物であり、古くより副作用の少ない漢方生薬として、高血圧や高脂血症、肝機能障害、動脈硬化、糖尿病、アトピー性皮膚炎など多様な疾患の治療に用いられてきた。朝鮮人参には20種以上のサポニンが含まれており、これらは化学的にprotopanaxadiol, protopanaxatriol, oleanolic acidの3群に分類される⁹⁾。このうちgRb1($\text{C}_{54}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$ 、分子量1108)はprotopanaxadiolに属するサポニンであり、神経障害の防御・修復効果を有することから特に注目され、臨床応用に向けた研究が進められている。

Wenら¹⁰⁾は実験的に脳虚血を惹起し、gRb1の効果を検討している。その結果、gRb1投与群では短期記憶の中核とされる海馬CA1領域の細胞障害が生食投与群と比べ有意に抑制され、また学習行動障害もgRb1投与で防御されたことから、gRb1は脳の虚血性細胞障害を防御すると結論している。この報告では虚血前から虚血後にかけてのgRb1持続投与

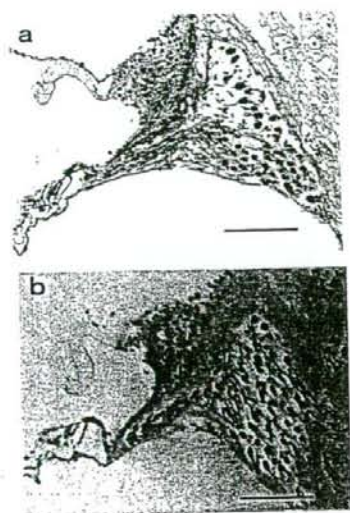


図4 虚血7日後の基底回転のラセン神経節(HE染色)
虚血群(a)のラセン神経節細胞は、虚血-gRb1群(b)と比較してRosenthal管内で疎となっている。
(scale bar = 60 μm)

は有効であったが、虚血後投与のみでは効果がなかったとしている。これに対し、Zhangら¹⁾は虚血直後の投与でも有効であったと報告している。

gRb1には脊髄損傷後の運動麻痺を回復させる効果¹⁾や神経絞扼後の痛覚過敏を抑制する効果¹²⁾もあることが知られており、虚血に限らず様々な原因による神経障害を防御し回復を促進するとされている。最近、Kimuraら¹³⁾はgRb1にはVEGFやIL-1 β を誘導することで血管新生を促進する効果もあることを報告している。このようにgRb1は様々なメカニズムを介して虚血性細胞障害を防御していると考えられる。

虚血性神経細胞障害に対するgRb1の作用機序について分子レベルで考察している文献はほとんどない。最近、Zhangら¹⁾は虚血直後からgRb1を持続的に投与したところ、梗塞周辺の細胞にアポトーシス抑制蛋白であるBcl-xLが発現することを明らかにし、これが神経細胞死を抑制するのではないかと考察している。われわれも内耳虚血動物モデルにおいてgRb1投与によりBcl-xLが発現することを確認しており、上記と同様のメカニズムで内耳障害を防御したものと推察している。

近年、内耳障害に対して様々な薬剤が開発されるとともに、投与方法についても検討が行われてきた。gRb1は血液-脳関門を通過することが知られており、実験的にも静脈投与により虚血性細胞障害に対する高い防御効果が得られている¹⁾。現在のところ、gRb1の投与方法としては静脈投与ならびに経口投与を想定しているが、鼓室内投与も有望と考えられる。

(藤田健介)

参考文献

- 1) Zhang B, Hata R, Zhu P, Sato K, Wen TC, et al: Prevention of ischemic neuronal death by intravenous infusion of a ginseng saponin, ginsenoside Rb1, that upregulates Bcl-xL expression. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 708-721.
- 2) 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.
- 3) Watanabe F, Koga K, Hakuba N, Gyo K: Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroscience* 2001; 102: 639-645.
- 4) Hyodo J, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Shudou M, et al: Hypothermia reduces glutamate efflux in perilymph following transient cochlear ischemia. *Neuroreport* 2001; 12: 1983-1987.
- 5) Taniguchi M, Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Hyodo J, et al: Apoptotic hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroreport* 2002; 13: 2459-2462.
- 6) Hata R, Matsumoto M, Hatakeyama T, Ohsuki T, Handa N, et al: Differential vulnerability in the hindbrain neurons and local cerebral blood flow during bilateral vertebral occlusion in gerbils. *Neuroscience* 1993; 56: 423-439.
- 7) Tarnowski BI, Schmiedt RA, Hellstrom LL, Lee PS, Adams JC: Age-related changes in cochleas of mongolian gerbils. *Hear Res* 1991; 54: 123-134.
- 8) Shinohara T, Bredberg G, Ulfendahl M, Pyykko I, Olivius NP, et al: Neurotrophic factor intervention restores auditory function in deafened animals. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 1657-1660.
- 9) Shibata S: Chemistry and pharmacology of Panax. Economic and medicinal plant research, Wagner H, Hikino H, Farnsworth NR (eds). World Scientific: 1994; 217-284.
- 10) Wen TC, Yoshimura H, Matsuda S, Lim JH, Sakanaka M: Ginseng root prevents learning disability and neuronal loss in gerbils with 5-minutes forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* 1996; 91: 15-22.
- 11) 仲田公彦: 脊髄損傷治療用医薬組成物の探索に関する研究. *愛媛医学* 2002; 21: 24-30.
- 12) 二宮周三: 薬用人参分画ジンセノサイドRb1による神経因性疼痛動物モデルでの鎮痛効果とその作用機序. *愛媛医学* 2004; 23: 142-151.
- 13) Kimura Y, Sumiyoshi M, Kawahira K, Sakanaka M: Effects of ginseng saponins isolated from Red Ginseng roots on burn wound healing in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 860-870.

IV. 内耳障害の防御と治療

2. プロサポシン由来合成ペプチド

【要約】プロサポシンやその合成ペプチドは神経栄養因子様活性を有し、細胞障害を防止するとともに組織再生を促進する効果を持つ。本研究はプロサポシン由来合成ペプチド (Prosaposin-derived peptide: PDP) が一過性内耳虚血による内耳障害防御効果を有するか否かを検討する目的で、虚血後連日、PDPを皮下に投与しABR閾値や有毛細胞脱落への影響を検討した。その結果、コントロールの虚血-生理食塩水(生食)群では虚血1日後のABR閾値上昇は 28.3 ± 2.6 dB、4日後が 37.5 ± 8.8 dB、7日後が 33.3 ± 16.3 dBであったのに対し、虚血-PDP 2.0mg/kg群では1日後が 15.8 ± 8.6 dB、4日後が 15.0 ± 3.2 dB、7日後が 12.5 ± 8.2 dBと、PDP投与によりABR閾値上昇は有意に抑制された。内有毛細胞の脱落率を虚血7日後に比較したところ、虚血-生食群が $21.1 \pm 3.9\%$ 、虚血-PDP 0.2mg/kg群が $18.3 \pm 1.2\%$ 、虚血-PDP 2.0mg/kg群が $8.0 \pm 1.4\%$ であり、PDPによる内有毛細胞の脱落抑制効果は用量依存性であった。PDPの効果は、MAPK経路のシグナルカスケードの活性化と、Bcl-2の発現増加に伴うcaspase抑制によると考えられた。

はじめに

プロサポシンは4種類のスフィンゴ脂質水解酵素活性化蛋白質サポシンA、B、CおよびDをドメインとしてもつ前駆体蛋白質であり、リソゾームにてサポシンに分解され糖脂質分解酵素の活性化因子として機能する^{1) 2)}。サポシン群の発現は臓器により異なり、肝臓や脾臓が豊富にサポシンを含有しているのに対し、脳や筋肉、脳脊髄液はプロサポシンを豊富に含有している^{3) 4)}。プロサポシンは発生期の脳や脳脊髄液中に特に豊富に存在するため、神経細胞の分化や保護、生存に関与すると考えられている^{5) 6) 7)}。これまでの研究から、プロサポシンは中枢神経系の正常発育に不可欠な物質であり、サポシンの前駆蛋白質としての役割以外に、中枢神経系に直接作用することが示唆されている⁸⁾。プロサポシン欠損動物では中枢や末梢神経のミエリン形成が抑制されることが証明されており⁹⁾、臨床的にはGaucher病に類似した症状を示すとして注目されている^{10) 11) 12)}。

プロサポシンおよびプロサポシン由来合成ペプチド (Prosaposin-derived peptide: PDP) の神経栄養

因子としての活性部位はサポシンC領域に存在する^{13) 14)}。これらの物質が神経栄養因子様効果を示すことは、虚血に対して脆弱な海馬CA1錐体細胞の選発性神経細胞死を抑制する¹⁵⁾ ことや、坐骨神経切除後の神経再生を促進する¹⁶⁾ ことなどで示されている。さらに、PDP投与により末梢神経や中枢神経の障害が抑制されたとする報告^{17) 18)} もあり、プロサポシンの神経保護効果を追証している。

本研究は一過性内耳虚血に対するPDPの保護効果を検討する目的で、虚血後より連日PDPを投与しABR閾値や有毛細胞脱落への影響を検討した。さらにPDPのアポトーシス抑制効果についても組織学的に検討した。

方法

1. 実験動物

実験にはスナネズミ(体重60~80g)を用いた。全身麻酔後、15分間、両側椎骨動脈の血流を遮断し内耳虚血を負荷した。

2. プロサポシン由来合成ペプチド(PDP)の投与
PDPには18塩基のペプチド(LSELIINNATEELLKGL)

を使用した。実験動物は虚血-生理食塩水(生食)群($n=6$)、虚血-PD P0.2mg/kg群($n=6$)、虚血-PDP2.0mg/kg群($n=6$)の3群に分類し、それぞれ虚血直後および虚血1、2、3日後の4回にわたりPDPあるいは生理食塩水を皮下に投与し、その効果を比較した。

3. ABRの測定

ABRは虚血前、虚血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た。記録は300回の加算を行い、10dBステップで刺激音圧を変化させた。閾値付近では5dBステップで変化させて聴力閾値を求めた。

4. 有毛細胞の観察と脱落率の算出

虚血7日後に基底回転のほぼ全周にわたってコルチ器を採取し、切片を作製してRhodamine-phalloidinあるいはHoechst33342を用いて聴毛や有毛細胞の核を染色した。蛍光顕微鏡下に染色標本を観察し、基底回転における内有毛細胞の生細胞と死細胞の数より脱落率を算出した。

5. Bcl-2の免疫染色

内有毛細胞におけるBcl-2の発現を、椎骨動脈を露出するが虚血を負荷しないsham-op群($n=3$)、虚血-PDP 2.0mg/kg群($n=3$)、虚血-生食群($n=3$)に分けて検討した。虚血4日後に経心灌流固定後、蝸牛を採取した。さらに後固定、脱灰の後、凍結切片を作製した。これを一次抗体(Bcl-2抗体、1:50)、および二次抗体(biotinylated goat anti-mouse IgG

antibody、1:500)と反応させ、Alexa Fluor 488-conjugated streptavidinにて蛍光発色させ蛍光顕微鏡にて観察した。ついでコルチ器の顕微鏡写真をデジタル画像としてパーソナルコンピュータに取り込み、各々の内有毛細胞におけるBcl-2の免疫染色の強度を画像解析ソフト(NIH Image)により半定量的に計測し、虚血-PDP 2.0mg/kg群とsham-op群、虚血-生食群とsham-op群との間で比較した。

結 果

1. ABR閾値の変化(図1)

虚血-生食群では虚血1日後のABR閾値上昇は 28.3 ± 2.6 dB、4日後が 37.5 ± 8.8 dB、7日後が 33.3 ± 16.3 dBであった。虚血-PDP 0.2mg/kg群では生食群と比較して閾値上昇はわずかに抑制されたが、統計学的有意差は認めなかった。一方、虚血-PDP 2.0mg/kg群では1日後が 15.8 ± 8.6 dB、4日後が 15.0 ± 3.2 dB、7日後が 12.5 ± 8.2 dBと、PDP投与によりABR閾値上昇は有意に抑制された。

2. 内有毛細胞の脱落率(図2)

虚血7日後の内有毛細胞の脱落率は虚血-生食群が $21.1 \pm 3.9\%$ 、虚血-PDP 0.2mg/kg群が $18.3 \pm 1.2\%$ 、虚血-PDP 2.0mg/kg群が $8.0 \pm 1.4\%$ であった。虚血-PDP 2.0mg/kg群では虚血-生食群と比較し有意に内有毛細胞の脱落が抑制された($p < 0.01$)。

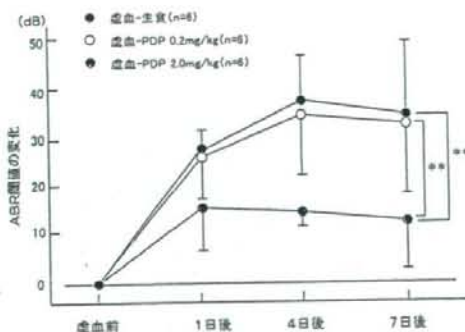


図1 ABR閾値の推移

虚血前のABR閾値を基準(0dB)とした閾値変化を示す。虚血-PDP 2.0mg/kg投与群では、虚血-生食群や虚血-PDP 0.2mg/kg投与群に比べ閾値上昇が有意に抑制された。(** $p < 0.01$)

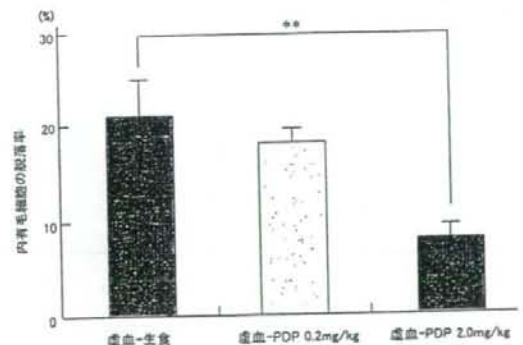


図2 虚血7日後における内有毛細胞の脱落率

虚血-PDP 2.0mg/kg投与群では虚血-生食群と比較して内有毛細胞脱落が有意に抑制された。(** $p < 0.01$)

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-p90RSK1-1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)

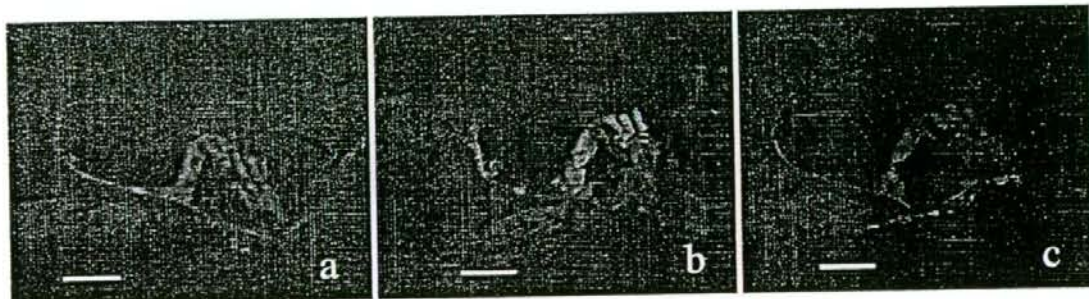


図3 コルチ器におけるBcl-2の免疫染色像

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=50 μ m)

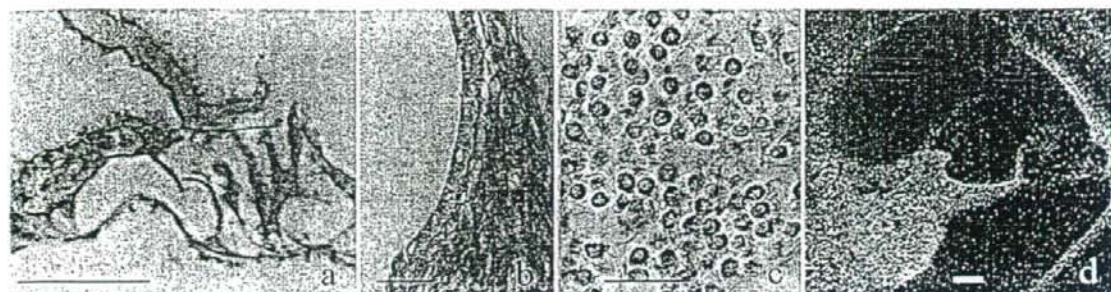


図4 ラット蝸牛におけるプロサポシンの局在

(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

- O'Brien JS, Kishimoto Y: Saposin proteins: Structure, function, and role in human lysosomal storage disorders. *FASEB J* 1991; 5: 301-308.
- Kishimoto Y, Hiraiwa M, O'Brien JS: Saposins: structure, function, distribution, and molecular genetics. *J Lipid Res* 1992; 33: 1255-1267.
- 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.
- 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.
- Sano A, Hinenno T, Mizuno T, Kondoh K, Ueno S, et al: Sphingolipid hydrolase activator proteins and their precursors. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 165: 1191-1197.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 近藤啓次, 佐野 輝: 先天代謝異常症候群. *日本臨床* 1998; 19: 414-416.
- 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.
- Levy H, Or A, Eyal N, Wilder S, Widgerson M, et al: Molecular Aspects of Gaucher Disease. *Dev Neurosci* 1991; 13: 352-362.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Terashita T, Saito S, Miyawaki K, Hyodo M, Kobayashi N, et al: Localization of prosaposin in rat cochlea. *Neurosci Res* 2007; 57: 372-378.
- 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.
- 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ってくる。

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。