

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60-80g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1mg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¹³⁾。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耳胞を開放し、ハイドロゲル1mg (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

水を含有了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8kHz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。

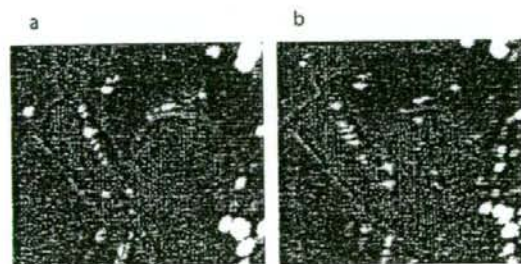


図1 IGF-1ハイドロゲルの正円窓上への留置

(a) 留置前, (b) 留置後

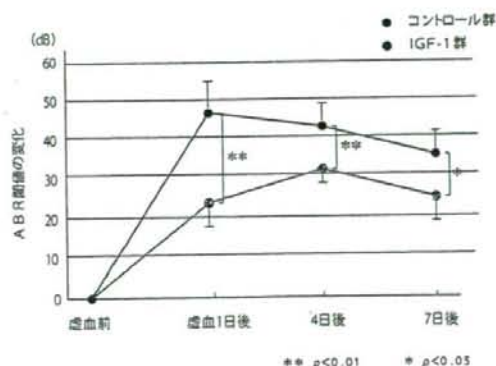


図2 ABR閾値の推移 (n=6)

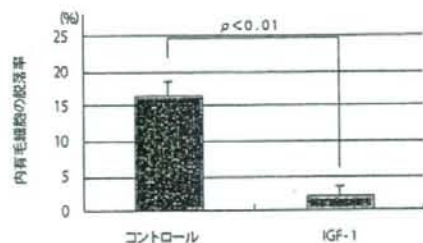


図3 虚血7日後における内耳毛細胞の脱落率 (各n=6)

組織学的研究の結果を図3に示す。内耳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耳毛細胞の脱落が、IGF-1投与群では抑制されていた。虚血7日後の内耳毛細胞の脱落割合は、IGF-1投与群で2.6±1.3%、コントロール群で16.5±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Iwairi¹¹⁾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閾値上昇や外有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耳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ー

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. : Tropic 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 C, 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-1 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パ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、アイスパックを取り除き、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。両側の耳朧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閾値の経時的变化を図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 ± 2.8 dB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 ± 8.3 dB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 $26.4 \pm 9.9\%$ (図2a)、外有毛細胞が $2.9 \pm 2.3\%$ (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

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分後に中耳骨朧を開放し、蝸牛の灌流固定を行った。ついで蝸牛を摘出し、後

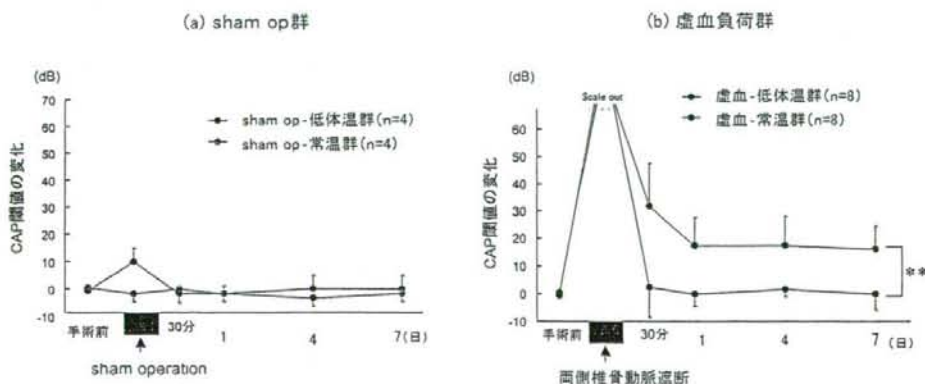


図1 CAP閾値の推移

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、血流再開後も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隙形成を認めた。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。外有毛細胞においては、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

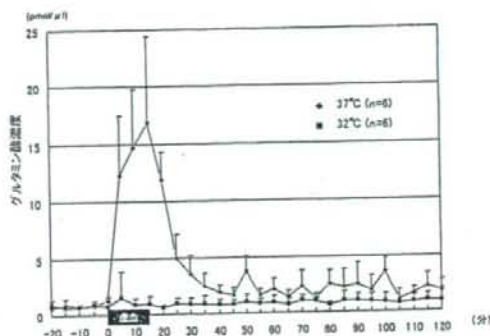


図3 外リンパ中グルタミン酸濃度の変化

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、光学顕微鏡下にて有毛細胞の脱落率を計測した。

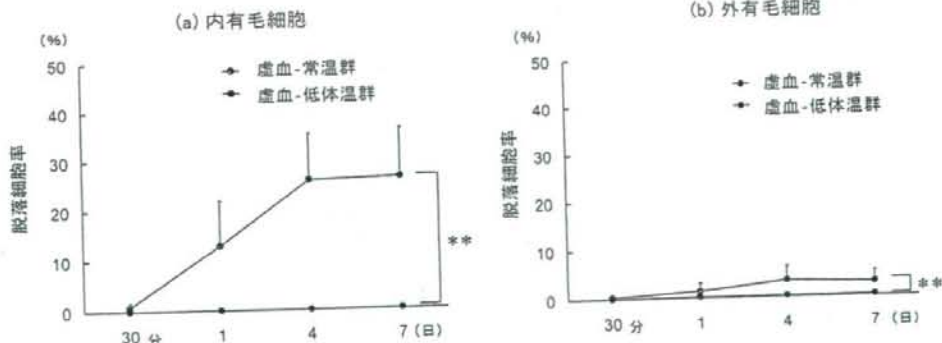


図2 有毛細胞脱落率の推移

(a) 内毛細胞. (b) 外毛細胞. **: $p < 0.01$

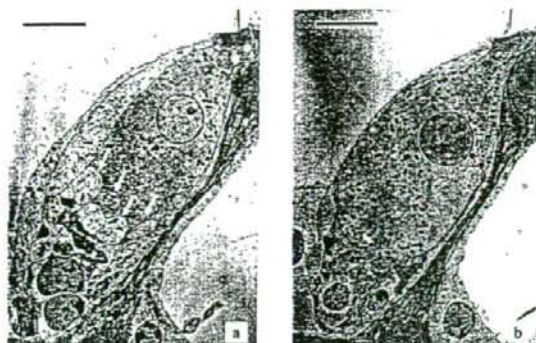


図4 内毛細胞の透過型電子顕微鏡像
(虚血30分後、基底回転)

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 = 5μm)

2) 結果

ABR閾値の経時的变化を図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±15.5dB、虚血-常温群が22.5±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

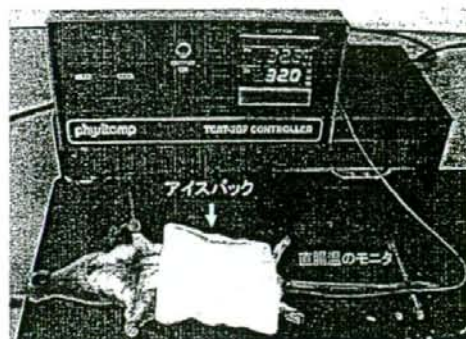


図6 低体温の負荷

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

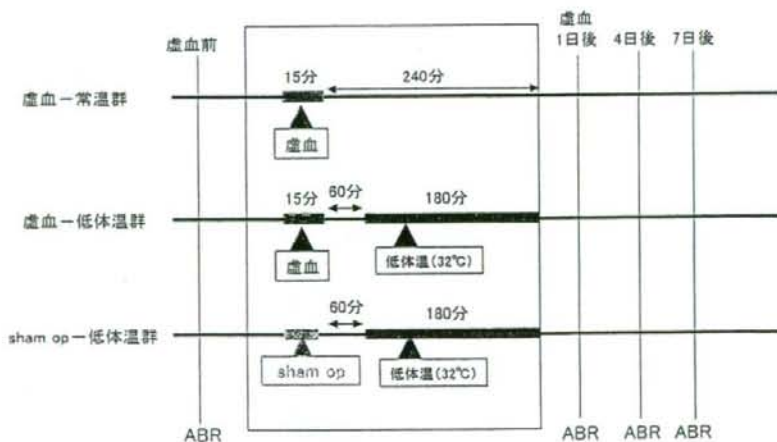


図5 虚血後低体温の実験プロトコル

低体温は虚血終了後、直腸温を32℃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

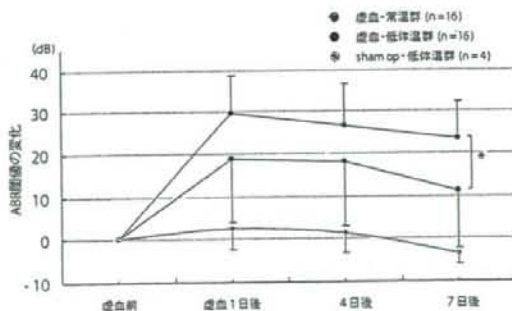


図7 ABR閾値の推移

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。* : $p < 0.05$

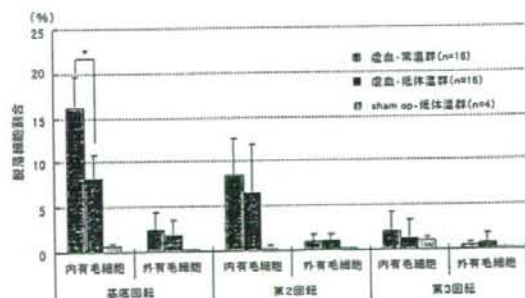


図8 蝸牛回転ごとの有毛細胞脱落率 (虚血7日後)

* : $p < 0.05$

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 intraschemic 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: Intraschemic but not postschemic 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: Postschemic 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, Eyalin 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。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, Arnold. 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と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径のガラス毛细管を正円窓に挿入、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、実顕微鏡下に蝸牛側壁をほぼ全周にわたり剥離し、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) 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5dB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)。

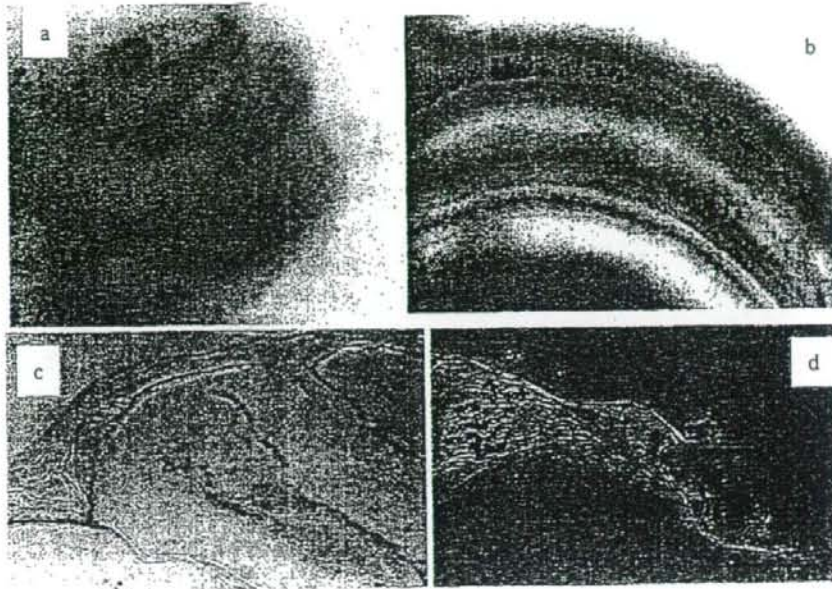


図1 Ad-LacZ投与4日後のX-gal染色

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。

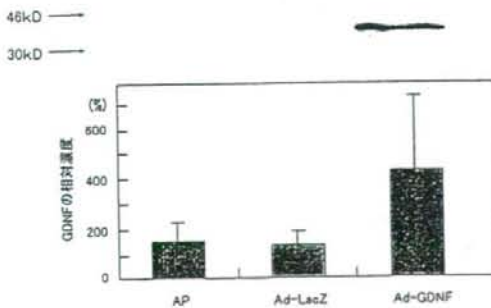


図2 投与4日後のGDNF発現量の比較

無処置群を基準（100%）とした場合、AP（人工外リソバ）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。

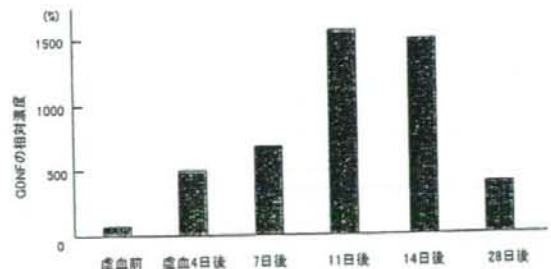


図3 Ad-GDNF投与後のGDNF発現量の推移

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

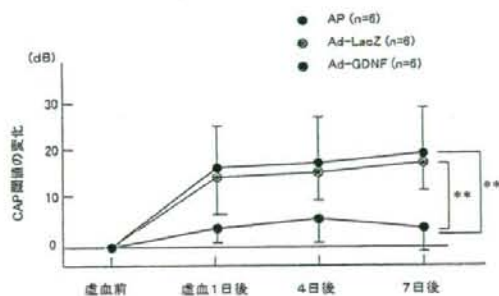


図4 CAP閾値の推移

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。(** $p < 0.01$)

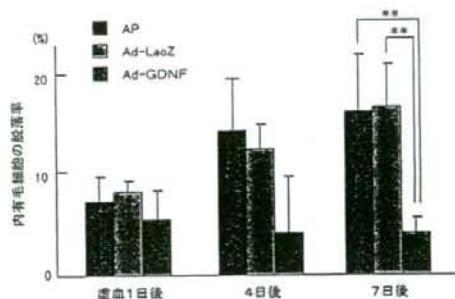


図5 虚血後の内毛細胞脱落率

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

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Eybalin M : Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 1993 ; 73 (2) : 309-373.
- 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.
- 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.
- Stöver T, Yagi M, Raphael Y : Transduction of the contralateral ear after adenovirus-mediated cochlear gene transfer. *Gene Ther* 2000 ; 7 (5) : 377-383.
- 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.
- Raphael Y, Frisnacho JC, Roessler BJ : Adenoviral-mediated gene transfer into guinea pig cochlea cells in vivo. *Neurosci Lett* 1996 ; 207 : 137-141.
- 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.
- Stöver T, Yagi M, Raphael Y : Cochlear gene transfer : round window versus cochleostomy inoculation. *Hear Res* 1999 ; 136 (1-2) : 124-130.
- 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.
- 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.
- 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、前者は障害された有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時期

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5×10⁴/4µl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日後に耳胞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

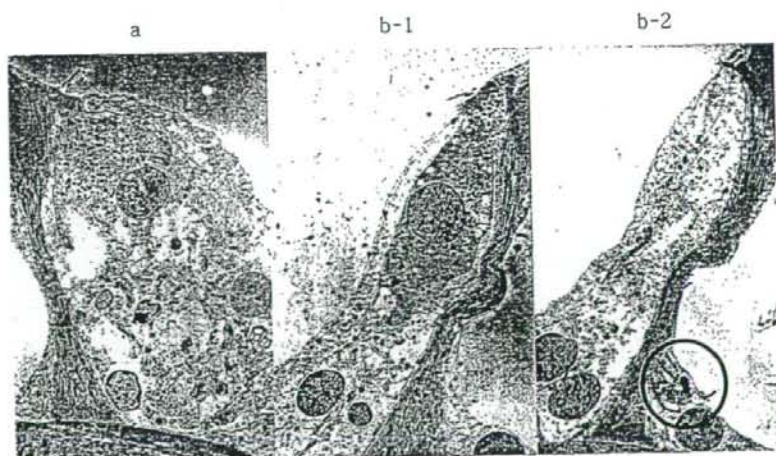


図2 透過型電子顕微鏡による有毛細胞の観察

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)。

ルチトンネル面に生着している像(図2b-2)が確認された。

走査型電子顕微鏡によると、虚血群では内毛細胞の聴毛脱落が顕著であったが(図3a)、神経幹細胞投与群では聴毛脱落はほとんど見られなかった(図3b)。

造血幹細胞

【実験方法】

造血幹細胞はドナーのスナネズミ大腿骨から採取した。骨髓細胞をHoechst33342にて染色後、flow cytometry解析を行って造血幹細胞を分離抽出し、細胞保存液(DMEM液)に浸した。ついで造血幹細胞 $[1 \sim 2 \times 10^3/4\mu\text{l}]$ をレシピエントとなるスナネズミの左耳鼓室階に正円窓經由で注入した。右側蝸牛には同量の細胞保存液(DMEM液)を注入した。翌日、両側の椎骨動脈を露出して15分間血流を遮断し、一過性内耳虚血を負荷した。左側蝸牛を造血幹細胞注入群、右側蝸牛を虚血-DMEM群とした。

1. ABRの測定

虚血直前、および虚血4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、300回の加算を行った後、閾値を求めた。

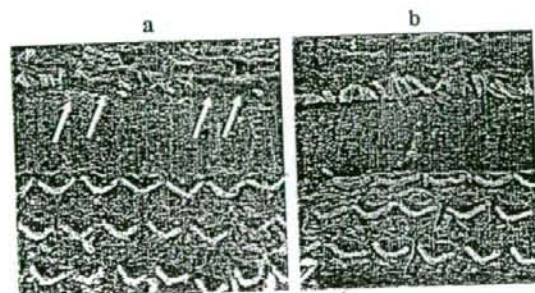


図3 走査型電子顕微鏡による有毛細胞の観察
a: 虚血群、b: 神経幹細胞注入群

虚血7日後の虚血群では内毛細胞の聴毛脱落が顕著にみられたが、神経幹細胞注入群ではほとんど見られなかった。

2. 組織学的検討

虚血4日後に蝸牛を摘出して局所灌流、後固定を行った後、surface preparation法にて基底回転のコルチ器を採取した。これをRhodamine-phalloidin染色して内毛細胞の脱落率を算出した。

3. 造血幹細胞の局在

鼓室階に注入した幹細胞の局在を調べる目的で、造血幹細胞を緑色の蛍光色素PKH67で染色した後、鼓室階に投与した。虚血負荷4日後に標本を採取し、脱灰後、厚さ $10\mu\text{m}$ の凍結切片を作製して蛍光顕微鏡で観察した。

4. ウェスタンブロット解析

虚血4日後に蝸牛を摘出、ホモジナイズしてウェスタンブロット法によりGDNF、BDNF、FGF1、FGF2、Ang1、NT3及びEPO蛋白の測定を行なった。画像解析ソフトを用いて発現バンドの定量的評価を行ない、造血幹細胞注入群と虚血-DMEM群で蛋白発現量を比較した。

【結果】

虚血前を基準とすると、4日後のABR閾値上昇は虚血-DMEM群が平均32.5dB、造血幹細胞注入群は14.2dBであった。後者の閾値上昇は前者よりも有意に軽度であった。

虚血4日後の内毛細胞の脱落率は虚血-DMEM群

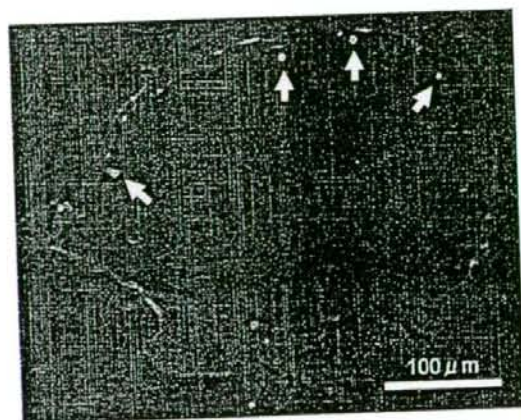


図4 注入した造血幹細胞の蝸牛内分布(蛍光顕微鏡像)
PKH67陽性細胞は基底回転の鼓室階に散在性に分布していた。

が23.6%、造血幹細胞注入群が9.1%であり、後者の脱落率は前者よりも有意に低かった。

PKH陽性細胞は鼓室階に散在性にみられたが、コルチ器や周辺組織では認めず、有毛細胞と置換や融合を起こすことはなかった。

7種の栄養因子について虚血負荷後の蛋白発現を検討した結果、GDNFのみ発現が認められた。図5aに示すように虚血を負荷していない無処置群ではGDNF発現は弱いが、虚血-DMEM群では若干強く、造血幹細胞注入群では極めて強く発現した。画像解析による定量的評価を行うと(図5b)、虚血-DMEM群、造血幹細胞注入群はいずれも無処置群より有意にGDNF発現量は増加していた。造血幹細胞注入群と虚血-DMEM群との比較でも有意差があり、造血幹細胞注入はGDNF発現量を増加させることが確認された。

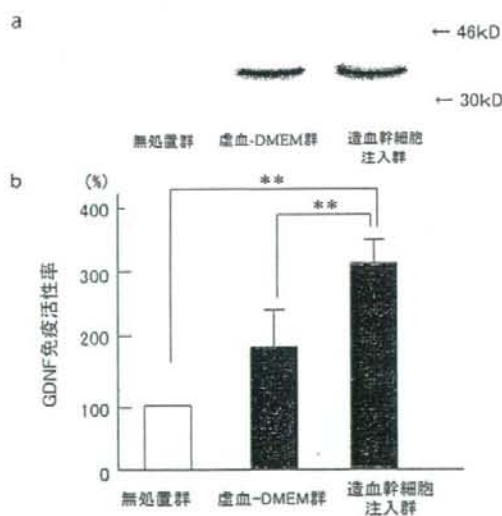


図5 虚血4日後の蝸牛におけるGDNF発現

a. ウェスタンブロット法

虚血負荷によりGDNFの発現は増強したが、造血幹細胞注入によりさらに強い発現がみられた。

b. GDNFの発現量

画像解析による発現バンドの定量的評価結果を示す。虚血負荷によりGDNF蛋白の発現量は増加したが、造血幹細胞注入群での発現量はさらに顕著であった。(**: $p < 0.01$)

考 察

今回の結果より、神経幹細胞及び造血幹細胞は虚血によって生じる聴力障害と有毛細胞の脱落を抑制することが示された。これら幹細胞による内耳保護効果のメカニズムについては、いくつかの可能性が考えられる。

まず、多分化能を持つ神経幹細胞や造血幹細胞が有毛細胞に分化し、虚血によりアポトーシスを起こした有毛細胞と置換した可能性が挙げられる⁹⁾。神経幹細胞や内耳前駆細胞が有毛細胞へ分化することはこれまでも報告^{11) 12)}されているが、本実験では神経幹細胞はコルチトンネルに移行し内毛細胞直下に定着しており、また造血幹細胞は主に外リンパ腔に存在していた。したがって有毛細胞へ分化転換したとする根拠は得られず、この説による内耳保護効果の可能性は低い。

近年、幹細胞は栄養因子の分泌を促進することが分かり、その作用によって障害が防御、修復されることが明らかとなった。Choppら⁶⁾は間葉系幹細胞から分泌された栄養因子が脳に内在する神経前駆細胞の生着、遊走、分化を進め、脳梗塞巣を縮小させると報告し、脳梗塞急性期治療の重要なメカニズムと位置づけている。間葉系幹細胞や神経幹細胞がサイトカインや神経栄養因子(NGF、BDNF、GDNFなど)を分泌することは以前から知られており^{4) 7)}、造血幹細胞もAng-1のような栄養因子を分泌する⁸⁾。本研究の結果、神経幹細胞を虚血前に投与することで、虚血直後の内毛細胞や蝸牛神経樹状突起の空胞形成は生じず、内毛細胞の脱落も防御された。これは神経幹細胞より何らかの神経栄養因子や細胞保護作用を持つサイトカインが誘導されたためと考えられる。造血幹細胞に関しても、虚血や造血幹細胞投与により内耳でGDNF発現増加が認められたことから、同様のメカニズムで内耳機能保護に働いたものと考えられる。

以上のことから神経幹細胞や造血幹細胞の蝸牛内投与は虚血性内耳障害を防御する効果を持つことが示された。

(吉田 正)

参考文献

- 1) Li H, Corrales CE, Edge A, Heller S : Stem cells as therapy for hearing loss. *Trends Mol Med* 2004 ; 10 : 309-315.
- 2) Li H, Liu H, Heller S : Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 2003 ; 9 : 1293-1299.
- 3) Tateya I, Nakagawa T, Iguchi F, Kim TS, Endo T, et al : Fate of neural stem cells grafted into injured inner ears of mice. *Neuroreport* 2003 ; 14 : 1677-1681.
- 4) Mahmood A, Lu D, Chopp M : Intravenous administration of marrow stromal cells (MSCs) increases the expression of growth factors in rat brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2004 ; 21 : 33-39.
- 5) 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.
- 6) Chopp M, Li Y : Treatment of neural injury with marrow stromal cells. *Lancet Neurol* 2002 ; 1 : 92-100.
- 7) Crigler L, Robey RC, Asawachalcharn A, Gaupp D, Phinney DG : Human mesenchymal stem cell subpopulations express a variety of neuro-regulatory molecules and promote neuronal cell survival and neurogenesis. *Exp Neurol* 2006 ; 198 : 54-64.
- 8) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, et al : A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. *Cell* 2000 ; 102 : 199-209.

内耳虚血とステロイド

はじめに

ステロイドホルモン（以下、ステロイド）は突発性難聴の治療薬として古くより汎用されているが、どのようなメカニズムで内耳に対して保護的に働くのかは分かっていない。突発性難聴の原因がウイルスであれば、ステロイドがウイルス疾患に有効なことは証明されているので、ステロイドの使用は理に叶っている。それでは突発性難聴の原因が虚血の場合、ステロイドは効果を示すのであろうか？このような疑問を解決すべく、本稿では虚血障害に対するステロイドの影響について概説するとともに、虚血性内耳障害に対するステロイドの効果を実験的に検討した。

ステロイドの作用機序

ステロイドの薬理作用は大きく分けてゲノミック作用(genomic action)と非ゲノミック作用(nongenomic action)に大別される。genomic actionはホルモン受容体複合体が直接核内DNAに作用し、転写レベルで遺伝子発現を調節する機構で、細胞質内のミネラルコルチコイド受容体やグルココルチコイド受容体を介して作用する。これら古典的ステロイド受容体の発現機序は標的遺伝子を介するため、数時間単位の時間的遅れが生じる。これに対し、作用発現が短時間の機序はステロイドのnongenomic actionと総称される¹⁾。

グルココルチコイド(GC)のnongenomic action

GCのnongenomic actionに関しては主に中枢神経系で研究が進み、分子メカニズムなどの知見が集約されつつある^{2) 3)}。神経細胞にはGCに特異的な受容体が存在する。この受容体は一種類ではなく、薬理作用が異なる複数種類の受容体がある。このため、ある実験でGCと合成ステロイドが同様の効果を示すが、別の実験では拮抗的に働くということが起こる。海馬CA1領域においては、虚血再灌流障害に対してGCはグルタミン酸放出を促進することで障害性に働

き、またDHEAS(硫酸デヒドロエピアンドロステロン)は障害防御効果を示して保護的に働き、両者の機能は拮抗するという。しかし、総合的にはGCは虚血再灌流障害に対して保護的に働く。Tabuchi⁴⁾はモルモットの内耳虚血モデルを用いた研究を行い、GCとDHEASはいずれも障害防御に働くこと報告している。

ステロイドとカルシウム動態

近年、さまざまな分野でステロイドと細胞内カルシウムイオンとの関係が報告されている。ステロイドがカルシウム動態に関与することは、すでに細胞レベルで証明されており、効果が迅速であることから膜受容体を介したnongenomic actionと考えられている。Makara⁵⁾によると、ステロイドはカルモジュリンの細胞膜への親和性に影響を及ぼし、電位依存性カルシウムチャンネルに作用するという。

一方、内耳の虚血再灌流障害においても、GCが細胞内カルシウム動態に影響を及ぼす可能性がある。しかし、内耳虚血とステロイドとの関係を研究した報告は少ない。本稿では内耳虚血モデルを用いてステロイドの効果を検討した。

虚血性内耳障害に対するプレドニゾロン(コハク酸プレドニゾロンナトリウム)の効果

実験にはスナネズミを使用し、虚血後の投与薬剤の違いにより、以下の2群に分けた。すなわち1)生理食塩水群：虚血処置後、生理食塩水を腹腔内に投与した群(n=6)、2)プレドニゾロン群：虚血処置後、プレドニゾロン1mg/kgを腹腔内に投与した群(n=8)である。虚血障害の防御効果はABR閾値の推移、および内耳毛細胞の脱落率をみることで評価した。

その結果、虚血7日後のABR閾値の上昇は生理食塩水群が 24.1 ± 8.6 dB、ステロイド群が 15.0 ± 12.2 dBであった(図1)。両者に統計学的な有意差はなかったが、後者の結果は概して良好であった。虚血

(つづく)