

図 20-2 鼓室内注入後 30 分の鼓膜所見
矢印は穿刺部位を示す。点線の部分に薬液が確認される。

れる。また、薬物は主として正円窓から内耳へ移行するので、正円窓が薬液に長く接するような体位をとらせる必要がある。以上より、嚥下運動をなるべく避けるように指示して、かつ適切な体位をとらせないと、鼓室内投与の効果は著しく低下する。

患者に指導する体位としては、正円窓窩がなるべく下になり、かつ、耳管鼓室口がなるべく上になるのが望ましい。そのためには、患者にリラックスした状態で仰臥位をとらせ、薬液注入後はやや下顎を挙上させておくのが重要である。投与側を上になせようとして、頸部を捻転するように指示しがちであるが、頸部を捻転すると自然と下顎を引いた状態になるため耳管鼓室口の位置が低くなり、薬液が上咽頭へ流出される可能性が増してしまう。このことは、図 20-1 に示した側頭骨を見れば理解しやすい。軽く下顎を挙上すれば、ほぼ上を向いた体位でも問題はない¹⁾。

我々は、嚥下運動をなるべく避ける手段として、上記の体位を患者に説明したあと、薬液注入前 15 分間同体位で嚥下をしない訓練を行っている。そばにティッシュを置き、貯まった唾液は体位を崩さずティッシュで拭いてとってもらうことになっていただき、それから実際の薬液注入へ進むわけである。

以上の指導を行えば、薬液はかなり安定的に鼓

表 20-1 当科で行っている鼓室内投与のプロトコール

1. 入院、患者に十分な説明。
2. 投与薬剤調整
約 0.5 ml/前後注入されることが多い。1 ml を超えることはない。
3. 仰臥位でやや下顎挙上させる。
4. この体位で、15 分間嚥下をしない訓練を行う。
5. 鼓膜麻酔液で麻酔。
6. 25 ゲージ針で穿刺、エア抜きの後に注入。
7. 30 分仰臥位維持、嚥下禁止。
8. 処置後 1 週間は耳内に水が入らないように指導。

室内へ留まり、投与後 30 分でも鼓室内に薬液の貯留が確認される (図 20-2)。表 20-1 には、当科で行っている鼓室内投与法のプロトコールを示した。過去において、種々の薬剤が鼓室内投与法により内耳疾患例に投与されてきた。しかしながら、効果については未だ不明な点が多く、その一つの理由として投与法の問題もあると考えている。簡便な方法であるがゆえに患者に対する適切な指導を欠き、効果を減じている可能性もある。

b) 鼓室内投与法と薬物

アミノグリコシド系薬剤を用いたメニエール病治療の歴史を調べてみると 1956 年に Schuknecht がストレプトマイシンを用いた報告から始まる²⁾。Schuknecht は、めまいのコントロールに成功した症例はすべて聴力を失ったがカロリック反応は氷水刺激に対して無反応であった、めまいのコントロールに失敗した症例はすべて聴力の悪化はなかったがカロリック反応は氷水刺激に対して治療前と同様の反応であったと述べており、患側の前庭機能を廃絶させるのが目的であった様子がうかがえる。その後、ストレプトマイシンはめまいに対する効果には限界があり、かつ高率に感音難聴をきたすことから、1978 年、Beck らにより、ゲンタマイシン鼓室内投与を用いたメニエール病のめまい治療が報告された³⁾。以降、めまいをコントロールし、かつ聴力を温存することが目的であり、前庭機能廃絶を目的としない考え方が主流となった。本治療法がメニエール病に有効とされる理由として、前庭の暗細胞が有毛細胞よりもアミノグ

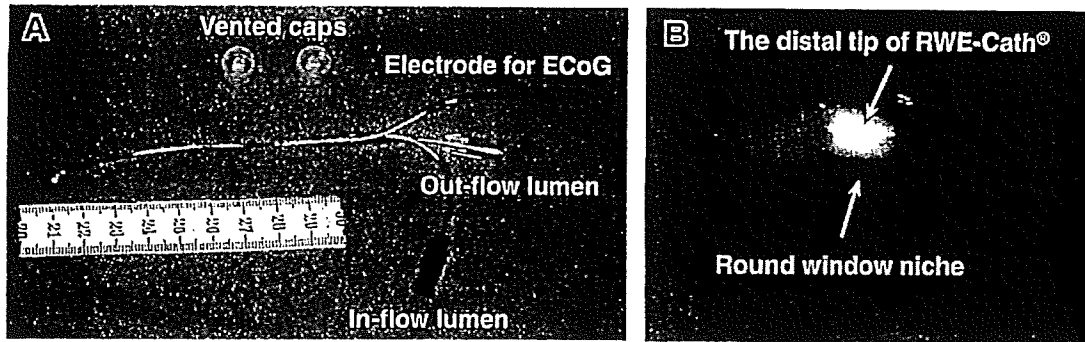


図 20-3 正円窓経由で内耳に薬剤を投与できるカテーテル (Round Window E-Cath®)
A: カテーテルの形状。B: カテーテルチップが正円窓窩に挿入された手術所見。

リコシド系薬剤に対して影響を受けやすいために、暗細胞を障害することで内リンパ産生を抑えるのではないかと考えられている^{4,5)}。ゲンタマイシン鼓室内投与の効果、プロトコルに関しては、2000年にBlackley⁶⁾が、最近では2008年にSalt⁷⁾らが過去の報告を集めて解析しているので参照されたい。

2000年にはいると、ゲンタマイシンに取って代わって、ステロイドの鼓室内投与に関する報告が目立つようになった。内耳研究の流れとして、内耳保護という概念が徐々に取り上げられるようになり、なるべく機能温存を図るという考え方が定着してきた影響かもしれない。ステロイド鼓室内投与法の対象疾患は、コントロール不良なメニエール病、通常ステロイド全身投与で改善しなかった突発性難聴、耳鳴、自己免疫性感音難聴など、報告は多岐にわたっており、この点でゲンタマイシン治療とは異なっている。当科でも、難治性のメニエール病に対して、ステロイド鼓室内投与方法を行っている。その結果、めまいに関しては、投与後悪化、不変の症例はみられず、おおむねコントロール良好である。聴力は、投与後一時的に低下することもあるが、長期でみれば、70%近くで改善してくるようである。以上から、ゲンタマイシン治療を行う前には、考慮してもよい治療ではないかと考えている。

3) デバイスを用いた投与方法

a) Round Window E-Cath®

Most Comprehensive Drug Delivery Information & Analysisというサイトをインターネットで

見ると、さまざまな部位に対して用いているドラッグデリバリーが紹介されている。この中でEARをクリックするとIntraEAR社製のRound Window E-Cath®にたどり着く。このカテーテルは、正円窓経由で薬剤を内耳に投与することができるカテーテルである⁸⁾。カテーテルを図20-3Aに示す。内腔に2本の管をもつプラスチック製のカテーテルで、先端を正円窓窩に留置する。流入管より注入された薬剤は、正円窓窩を灌流し、正円窓膜経由で内耳へ移行する。実際に手術でカテーテルを留置した術中所見を図20-3Bに示す。

我々は、過去に難治性メニエール病患者にこのカテーテルを用いて、ゲンタマイシンの微量、持続的な内耳投与を行い良好な結果を得たので症例を提示する⁹⁾。

■症例：53歳、男性

■主訴：繰り返すめまい発作、左耳鳴

■現病歴：1983年頃、めまい発作、左耳鳴が出現した。近医で左メニエール病と診断され、加療されていたが、症状は増悪寛解を繰り返した。1987年当科にて内リンパ嚢手術を施行されたが、術後もめまい発作は反復し、内服加療を行っていた。

■検査所見：標準純音聴力検査は60～70dBの感音難聴を呈し、SISIテストは左で陽性。少量注水法によるカロリックテストでは最大緩徐相速度18°/secと反応が残存していた。

■経過：めまい発作の頻度が増加してきたため、患者の希望もあり、当科入院のうえ、本法によるゲンタマイシンの内耳への投与を施行した。

全身麻酔下に耳内切開を行い、*tympano-meatal-flap*を剥離挙上した。正円窓窩を完全に明視下に置き、直径1.5 mmのカテーテルを留置した。正円窓膜とカテーテルの先端には1 mm程度のスペースができるように位置を調節し、この段階で生理食塩水を用いて、灌流可能なことを確認した。*tympano-meatal-flap*を戻し、外耳道内をパッキングした。外耳道入口部は、カテーテルの固定を兼ねスポンゼルを挿入した。耳前部の皮膚にカテーテルを縫合固定し、手術を終了した。

カテーテル留置の2日後から、インフュージョンポンプを用いてゲンタマイシン投与を開始した。この間、微小な眼振を認めたが、めまいの自覚はなく、術後7日目より耳内のタンポンを抜去し、カロリックテストを行い、術後10日目のカロリックテストで氷水刺激による反応がほぼ消失していることを確認して、ゲンタマイシンの注入を中止し、カテーテルを抜去した。ゲンタマイシンは17 mg/dayで合計151 mg注入されたことになった。術後、聴力の悪化は認めず、めまい発作も消失した。

手術手技は簡便で、聴力や眼振所見を指標として最適な投与量を決定できる点で優れていると思われる。しかし、残念ながら、本カテーテルは臨床上のトラブルにより、現在は使用されていない。

b) 薬物徐放ゲル

内耳により持続的に薬物を作用させるために、薬物徐放という観点から研究がなされた結果、京都大学グループによってバイオマテリアルを用いた薬物徐放システムが開発された¹⁰⁾。ゼラチンハイドロゲル、ポリグリコール乳酸の2種類が、現在紹介されている。前者は、親水性、高分子な薬物に適しており、蛋白やペプチド製剤が対象となる。后者は、疎水性、低分子な薬物に適しており、ステロイドなどが対象となる。鼓膜後下象限に2 mmほどの切開をおき、径1 mm以下の内視鏡下に正円窓窩にこれら徐放ゲルを留置する。現在、同大学においてゼラチンハイドロゲルを用いた *insulin-like growth factor 1* 投与を、ステロイド全身

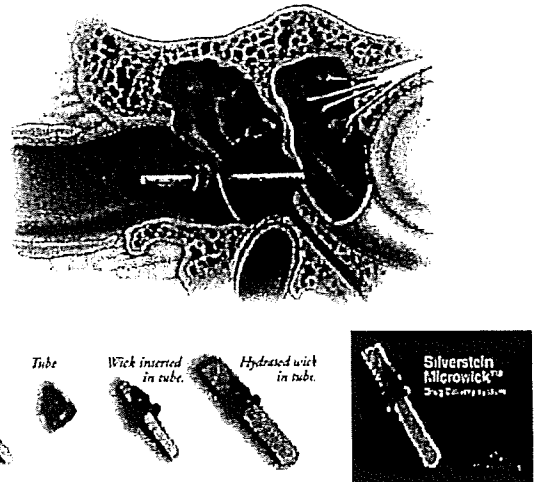


図 20-4 MicroWick™ と、使用時の模式図
(Micromedics 社のホームページから)

投与が無効であった急性高度感音難聴症例を対象として臨床試験が進行中である。また、耳鳴患者に対するリドカインの徐放をポリグリコール乳酸マイクロパーティクルを作成して検討を進めているとのことである。

研究用のハイドロゲルとしては、株式会社メドジェルから生理活性物質徐放用生体吸収性ハイドロゲル (MedGel[®]) が発売されている。ぜひ、このようなものを利用して、内耳障害に有効な可能性がある薬物の局所投与における効果の検証を進めていきたいものである。

c) MicroWick™

1999年 Silverstein は、内耳への持続的な薬物投与を目的としてユニークなシステムを報告した¹¹⁾(図 20-4)。このシステムはいたって単純なものである。鼓膜切開、チューブ留置の後、チューブにポリビニルアセテート製の MicroWick™ を挿入する。この先端は正円窓窩に入るようにする。点耳によって MicroWick™ に染み込んだ薬物は、正円窓膜に浸透していき、内耳へと運ばれるわけである。Silverstein は論文の中で、メニエール病に対するゲンタマイシン投与、突発性難聴、あるいは自己免疫性難聴に対するデキサメサゾン投与について、MicroWick™ を用いたプロトコルを紹介している。薬物の定量的投与という面でははっきりしない点もあるが、簡便であるがゆえ、現在も広く用いられている。

おわりに

最近の内耳研究は目を見はるものがあり、器械の進歩と相まってすばらしい発展を遂げている。しかし、まだ治療法に関しては、エビデンスが確立されたものは少なく、他科領域に比べ遅れをとっている感は否めない。我々は、耳鼻咽喉科医としての専門性を活かした治療法の一つとして、内耳への直接的薬物治療を確立されたものへと推し進めていく責務がある。

References

- 1) 山下裕司：鼓室内投与方法。イラスト手術手技のコツ耳鼻咽喉科頭頸部外科（飯沼壽孝，木田亮紀，小林俊光ほか編），東京医学社，pp217-218，2003
- 2) Schuknecht HF：Ablation therapy for the relief of Ménière's disease. *Laryngoscope* 66：859-870，1956
- 3) Beck C, Schmidt CL：10 years of experience with intratympanally applied streptomycin (gentamycin) in the therapy of Morbus Ménière. *Arch Otorhinolaryngol* 221：149-152，1978
- 4) Park JC, Cohen GM：Vestibular ototoxicity in the chick: effects of streptomycin on equilibrium and on ampullary dark cells. *Am J Otolaryngol* 3：117-127，1982
- 5) Pender DJ：Gentamicin tympanoclysis: effects on the vestibular secretory cells. *Am J Otolaryngol* 6：358-367，1985
- 6) Blakley BW：Update on intratympanic gentamicin for Ménière's disease. *Laryngoscope* 110：236-240，2000
- 7) Salt AN, Gill RM, Plontke SK：Dependence of hearing changes on the dose of intratympanically applied gentamicin: a meta-analysis using mathematical simulations of clinical drug delivery protocols. *Laryngoscope* 118：1793-1800，2008
- 8) 山下裕司：経中耳薬物投与。耳鼻咽喉 74：101-105，2002
- 9) 山下裕司：内耳疾患に対する直接的薬物治療。耳鼻臨床 94：1049-1053，2001
- 10) 中川隆之：「第109回日本耳鼻咽喉科学会総会シンポジウム」内耳疾患の治療を目指して—基礎研究の最前線薬物の経正内窓投与。日耳鼻 111：655-663，2008
- 11) Silverstein H：Use of new device, the MicroWick™, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 78：595-600，1999

日常臨床に役立つ
めまいと平衡障害

定価(本体8,200円+税)

2009年5月13日 第1版第1刷発行

編集 内野善生・古屋信彦

発行者 川井 弘光

発行所 金原出版株式会社

〒113-8687 東京都文京区湯島2-31-14

電話 営業 (03)3811-7184

編集 (03)3811-7162

FAX (03)3813-0288

振替 00120-4-151494

<http://www.kanehara-shuppan.co.jp/>

©2009

検印省略

Printed in Japan

ICLS < (株)日本著作出版権管理システム委託出版物 > ISBN 978-4-307-37097-4

小社は捺印または貼付紙をもって定価を変更致しません。
乱丁・落丁のものはお買上げ書店または小社にてお取り替え致します。

M & Cカンパニー
横山/永瀬

耳鼻咽喉科展望

第52巻 第4号

8 | 2009
August

耳鼻・眼瞼・中耳の慢性
鼓膜鏡カラーアトラス

鼓膜所見 — 幼児急性中耳炎 —

上出 洋介

総論

熱ショック応答と内耳保護機構

山下 裕司、他

臨床

眼窩下壁骨折の内視鏡所見による分類とその対処

— 眼窩骨膜と上顎洞粘膜の損傷状態とその発生機序 —

柳 清、他

喉頭神経鞘腫の1症例

露無 松里、他

両側同時性顔面神経麻痺で発症した小児

Guillain-Barré症候群の1例

小森 学、他

境界領域

前頭蓋底の再建術式の標準化と外傷への応用

力丸 英明、他

画像診断

眼窩吹き抜け骨折の画像所見と臨床

尾尻 博也

薬剤の特徴と
注意点

1回飲みきり製剤 — アジスロマイシン —

北村 正樹

学会関係

第5回 頭頸部表在癌研究会

菊池 大輔、他

薬剤関係

スギ抗原ディスク誘発鼻炎症状に及ぼすロイコトリエン受容体拮抗薬の治療効果

大澤 陽子、他

サロン

海の中と空の中 — その4 —

上出 洋介

エラータ

下鼻甲介粘膜腫脹に対する高周波電気凝固術の検討

小島 純也、他

熱ショック応答と内耳保護機構

山下 裕司 御厨 剛史
やました ひろし みくりや たけふみ

熱ショック応答 (heat shock response: HSR) とはあらゆる生物がもつ根幹的なストレス応答で、様々な障害に対し保護効果を持つ。内耳にも熱ショック転写因子 (heat shock transcription factor1: HSF1), 熱ショック蛋白質 (heat shock proteins: HSPs) が存在し、重要な役割をもつ。音響障害で HSR は惹起されるが、HSR 誘導剤をモルモットへ投与すると蝸牛熱 HSF1 の活性化, HSPs の誘導がおきる。反復投与でその効果は増強され、音響障害モデルへの予防投与で、ABR 閾値上昇と外有毛細胞の欠損を強力に抑制する。HSR の音響障害に対する保護のメカニズムには主に、①シャペロン機能、②抗アポトーシス効果、③抗酸化作用、④細胞自体の強化、⑤抗炎症作用の制御が考えられる。老人性難聴モデル加齢内耳では HSPs が低下し、薬剤で HSPs の発現を維持すると ABR 閾値上昇と有毛細胞欠損を軽減する。加齢時に音響負荷を加えると、若年時にみられる HSR が減弱する。内耳加齢では HSR が減弱し、加齢、外界からのストレスに易受傷性であると考えられる。

本稿では HSR の音響障害と加齢性内耳障害への保護効果の機序を考察し、HSR 誘導剤の臨床応用への可能性を述べたい。

キーワード: 熱ショック応答, 音響障害, 老人性難聴

熱ショック応答とは普遍的根幹的ストレス 応答である

熱ショック応答 (heat shock response: HSR) とはあらゆる生物がもつ根幹的なストレス応答である。細胞が通常より数度の高温環境下に置かれると、熱ショック転写因子 (heat shock transcription factor1: HSF1) が活性化され、一連の熱ショック蛋白質 (heat shock proteins: HSPs) が誘導される。この現象が HSR である。これら HSPs は、高温下で変性した蛋白質の凝集を抑制、処理などを行い、細胞機能を回復させる (シャペロン機能)。また、アポトーシスに至る細胞内シグナル伝達を抑制することで多くの細胞に対しては、生存を促進する¹⁻⁶⁾。この現象は他のストレスでも惹起され、生物の生存に必須である。

近年では HSF1 と HSPs が IL-6 をはじめとする主要な炎症性サイトカインとの関連をもつことが報告され⁷⁾、HSR が多岐にわたって生体へ働くことを示唆している。

様々な内耳障害に対し熱ショック応答は保 護効果を持つ

正常モルモットの内耳構成細胞において、HSF1 と主要な HSP である Hsp70 family が存在し^{8,9)}、一過性の温熱負荷で Hsp family の核移行が行われ¹⁰⁾、Hsp70 が誘導されることが報告されている¹¹⁾。これらの報告は内耳においても、他の器官同様 Hsp70 family のストレス応答が存在することを示唆する。熱ストレスで蝸牛内に誘導された Hsp70 は、音響ストレスによる閾値上昇を有意に減少させる¹²⁾。さらに HSPs 遺伝子上流にある HSF1 をノックアウトした mice を用い、音響障害を加えた際に生じる蝸牛外有毛細胞死が wild type と比較し増加することで、音響障害において HSF1 が内耳保護に働くことが証明されている¹³⁾。また、アミノグリコシド、シスプラチンなどの内耳毒性物質に対する HSPs の保護作用が報告されており、障害の種類にかかわらず効果が発揮されている¹⁴⁾。

熱ショック応答誘導剤を用いた治療戦略

当教室ではこの HSR を効果的に誘導することで

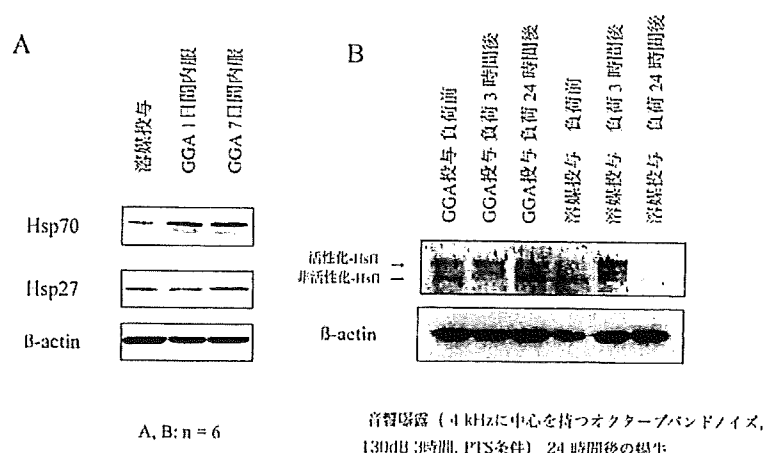


図1 モルモット蝸牛を用いた western blot assay での HSPs, HSF1 の発現の評価
 A: GGA 100mg/kg 単回経口投与で Hsp70, Hsp27 が誘導されている。繰り返し投与で発現は増強される。溶媒には 5% アラビアゴムと 0.008% トコフェロールを含有する。
 B: 溶媒投与では音響負荷 3 時間後をピークに HSF1 の活性化を認めた。GGA 投与群では負荷前から HSF1 は活性化され、負荷 3 時間後にも同様の発現を認めた。

内耳保護へ応用できないかと考え研究を行ってきた。HSR を内耳保護という点で臨床において活用を試みようと考えた場合、これまでに知られている HSR を誘導する条件の多くは正常組織に対して有害である。たとえば高温、低酸素、エタノールやヒ素、カドミウムなどである。しかし現在各方面で広く HSR を誘導できる薬剤として研究されているものに、Geranylgeranylacetone (GGA) がある¹⁵⁾。GGA は抗潰瘍薬で、日本では 1984 年以來臨床で広く処方されている副作用の少ない薬剤 (テブレノン、セルベックス[®]) であるが、胃粘膜、小腸、脊髄神経、肝細胞、心臓、脳神経、網膜などで HSR を惹起し、組織保護効果を認めたという報告がある¹⁶⁻²⁰⁾。しかもそれらの報告は、GGA が安全に HSR を惹起することができるかと述べている。当教室はこの薬剤に着目し、音響障害からの内耳保護にこの薬剤が強力に保護作用を示すことを証明し²¹⁾、さらに加齢難聴モデルとしても用いられる進行性難聴モデルに対しても保護効果を示すことを報告した²²⁾。以下は主にこの 2 つの実験系から得られた知見をもとに、内耳保護機構としての HSR の重要性について述べる。

熱ショック応答誘導は音響障害から内耳を強力に保護する

正常なプライエル反射と鼓膜を有しているハートレイ系白色モルモット (350~400g) を用いた実験

系では、GGA (100mg/kg/回) 単回経口投与で蝸牛へ HSF1 が活性化され、Hsp70, Hsp27 が誘導されたことが western blot assay で確認できた。また、連日経口投与することでその蛋白質発現は増強された (図 1)。この連日投与モデルに強大音 130dB SPL (4kHz に中心を持つ octave band noise) を負荷すると、非投与群では音響負荷 1 週間後に permanent threshold shift: PTS を著明に認め、第二回転の外有毛細胞の消失も認めるのに対して、GGA 投与群は障害を軽減できた (図 2)。さらに特記すべきことは、1 回投与量を増やすよりも、量を少なくし投与回数 (日数) を増やす方が保護効果が増強されることがわかった。また一方で音響負荷直後から内服を開始した群では障害は軽減できなかった²¹⁾。これらのことから、HSR 誘導剤を音響障害に対して予防的に用いることができれば強力な保護効果が期待できることがわかった。

音響障害に対する HSR の保護のメカニズムには主に、①シャペロン機能、②抗アポトーシス効果、③抗酸化作用、④細胞自体の強化、⑤抗炎症作用が挙げられる。音響ストレスの障害機序において、酸化ストレスが重要な因子であるが、これらの障害は最終的に蝸牛内細胞をネクローシスかアポトーシスへ導く²³⁻²⁷⁾。この障害経路の間に、蛋白質・DNA のダメージが介在するが、Hsp70・Hsp27 はシャペロン機能を発揮し、蛋白質の障害の修復・分解促進

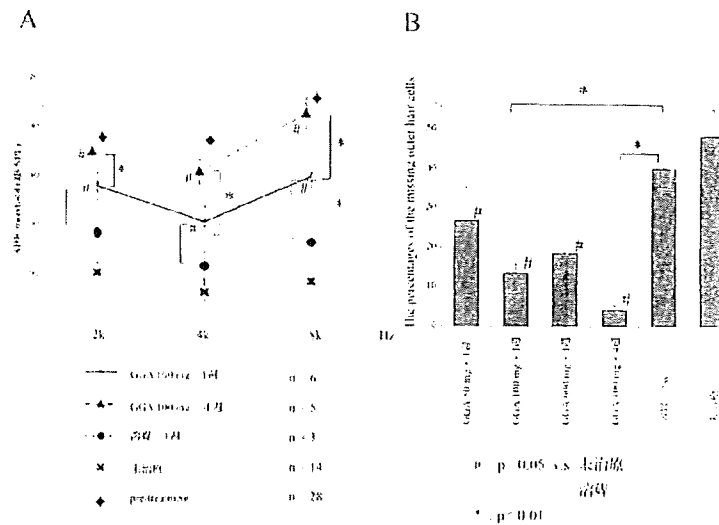


図2 モルモット音響障害モデルに対するGGA予防投与の効果

A: ABR 閾値を示す。pre-treatment は実験前の測定値であり、他の群はすべて音響負荷7日後の測定値である。GGA 100mg × 1週で保護効果を認め、4週投与でさらに効果の増強を認めた。
 B: 蝸牛第二回転外有毛細胞欠損率を示す。GGA 100mg × 1週で保護効果を認め、4週投与でさらに効果の増強を認めた。

といった品質管理を行ってダメージを軽減していると考えられる。これに加えて Hsp70・Hsp27 はアポトーシスのシグナルを、c-Jun N terminal kinase の活性化の抑制、apoptic protease activating factor-1 (Apaf-1) へ結合し apoptosome の形成を阻害、cytochrome c の制御で、細胞死を抑制したと考えられる^{3,4,6,28}。抗酸化作用は Hsp27 に有名な作用である²⁹が、Hsp27 には以下④の蝸牛特有の保護作用が推察されている。④細胞自体の強化について、まず一点目として、Hsp27 の作用が挙げられる。Hsp27 は、蝸牛に豊富に存在する細胞骨格の主たる構成成分である F-actin のシャペロンとして重要である^{12,30}。音振動を電気的エネルギーに変換するために、蝸牛内細胞が振動の機械的ストレスにさらされる時に、F-actin は骨格維持のために必須な成分である。熱ストレスにより F-actin が増加し外有毛細胞などの stiffness を増して、音響などの機械的ストレスそのものに対しても耐性を獲得しているとの報告³¹もあり、この機序も今回の保護に繋がったと考えられる。2点目として抗ネクローシス作用が挙げられる。GGA の HSP を介する機構として示唆されているものに、モルモット胃粘膜細胞において、エタノールなどの胃粘膜ストレスによるネクローシスを抑制したとの報告もあり³²、音響障害でのネクローシスを直接抑制している可能性も加わる。⑤抗炎症作

用であるが、音響障害時に IL-6, IL-1 β , など炎症サイトカインが上昇することが知られている。抗サイトカイン療法を行うと障害を軽減できることから内耳においてもこれらサイトカインは治療のターゲットになりうる。近年、HSF1 は IL-6 の制御を行うことが報告された⁷。GGA は HSF1 を活性化させる薬剤であり、内耳でも同様である。CBA/N マウスに 0.5%GGA 混合餌を 8 週間経口投与し、PTS を生じる音響負荷を行ったところ、前述のモルモットの実験系と同様に負荷 1 週間後の ABR 閾値上昇を軽減できた。音響負荷 24 時間後の蝸牛内 IL-6, IL-1 β の発現を RT-PCR で評価すると、GGA 内服群で音響負荷後の IL-6, IL-1 β の上昇が抑制された(図 3)。蝸牛内でも HSF1 によって炎症性サイトカインが制御されていることが証明された。GGA の強力な保護作用にはこの抗炎症効果も加わり多岐にわたっていることがわかる。

加齢による熱ショック応答の減弱は老化と音響からの脆弱性を示す

一般的に HSR は加齢とともに減弱し、ストレスに対して脆弱となることが知られている³³。我々は HSR の加齢による減弱が内耳疾患の発症・進行に関与しているのではないかと仮定した。早期進行性難聴モデルマウスとして知られる DBA/2J マウ

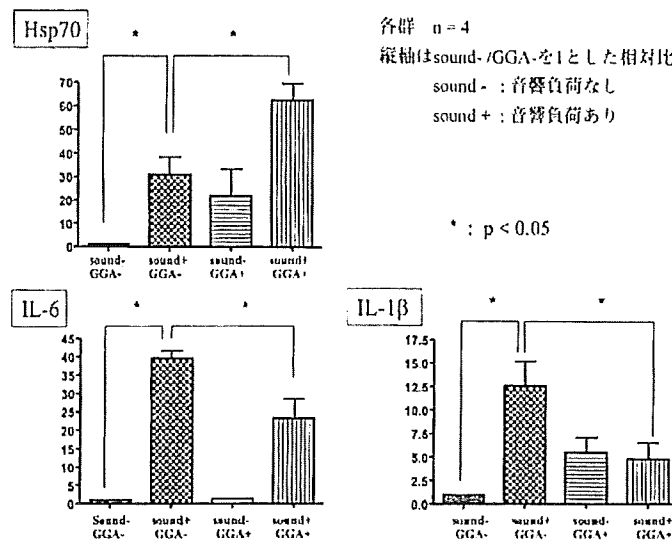


図3 マウス音響障害モデル蝸牛を用いたサイトカインの発現評価

CBA/N に対して 0.5%GGA 投与、音響負荷（モルモットと同条件、マウスでも PTS 条件）を行った。音響負荷 24 時間後に蝸牛を採取し RT-PCR を行った。Hsp70 はモルモットと同様に GGA 投与で誘導された。IL-6、IL-1β は GGA 投与群で音響負荷後発現の抑制を認めた。

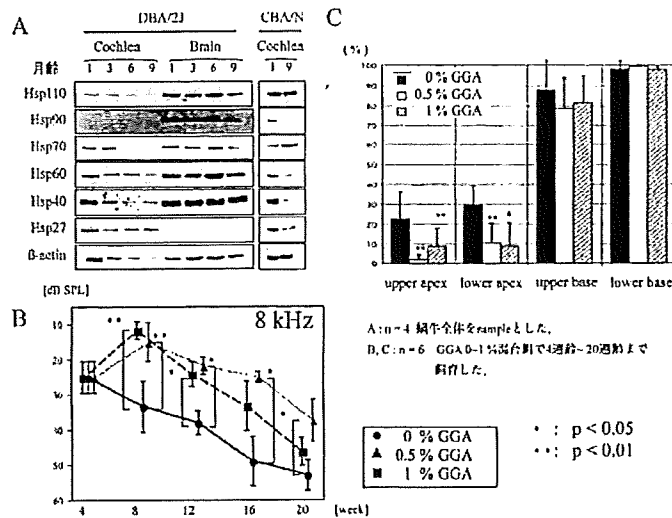


図4 老人性難聴モデルマウスでの HSPs 発現の変化と GGA の保護効果

A: western blot assay. CBA/N (対照) では Hsp70、Hsp110 は 9 カ月齢で発現が維持されるのに対して、モデルマウスである DBA/2J では蝸牛内 HSPs が減少していた。
B, C: DBA/2J に GGA 混合飼料を 4 週齢から投与し HSPs の発現を維持すると、ABR 閾値上昇が遅延され、外遊毛細胞欠損も軽減された（文献 22 より一部改編して引用）。

と対照マウス CBA/N マウスを用い、若年時と加齢時の内耳 HSPs を比較したところ対照マウスでは Hsp70 が増加しているのに比べ、DBA/2J では内耳全体の HSPs が減少していた（図 4A）。そこで GGA 混合飼料で 4 週齢から飼育し HSPs 発現を維持させてみると、ABR 閾値上昇や外有毛細胞の消失が軽減された。HSR 誘導が進行性難聴モデルに対して

も効果をもつことが証明された（図 4B, C）。

加齢内耳は外界からのストレスへの適応も減弱していると仮定し、若年時と加齢時で強大音に対する HSR についての検討も行った。代表的な老人性難聴モデルマウスである C57BL/6 と対照に CBA/N を用いて PTS 条件の強大音を負荷した。負荷時期は C57BL/6 が難聴を示し始める時期（32kHz 刺激

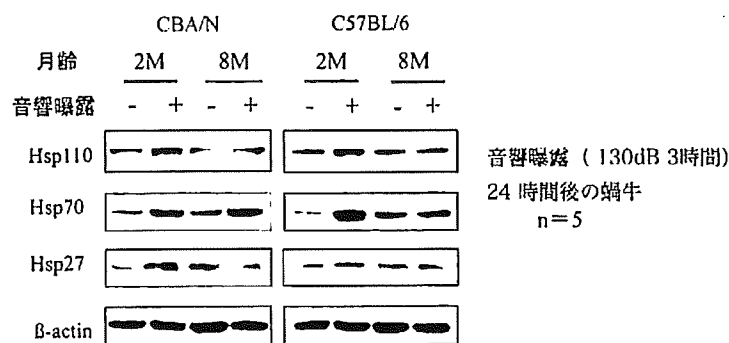


図5 CBA/N (対照) と C57BL/6 (代表的な老人性難聴モデル) 蝸牛を用いた western blot assay
2ヵ月齢では2系統ともに HSPs の誘導がみられるのに対して, 8ヵ月齢ではモデルマウスにはほとんど HSPs の誘導がみられなかった。

で ABR 閾値上昇を示し始める) でかつ組織学的な障害が軽微な時期 (8ヵ月齢) を選び, HSPs の発現を比較した。その結果, 8ヵ月齢対照マウスでは HSPs が音響負荷時に誘導されるのに対して8ヵ月齢 C57BL/6 ではほとんど誘導されなかった (図5)。このことは内耳加齢ではストレス時の HSR が減弱し, 加齢によるストレスや外界からのストレスに易受傷性であることを示唆している。

熱ショック応答誘導の臨床応用にむけて

GGA は日本の臨床で広く使われている安全な抗潰瘍薬ではあるが, HSPs を誘導する *in vivo* の実験系で用いられる投与量は人間のもの (50kg 換算) と比較して約 30 倍から 300 倍と大量であるという問題がある。今回の実験で設定した投与量は, 50~600mg/kg (至適投与量 100mg/kg/回) であり人間に換算すると, 約 15~200 倍の投与量になる。しかし, GGA の単回投与毒性試験では SD 系ラットで LD50>15,000mg/kg であること, GGA の投与期間を延長することにより 1 回の投与量を低く抑えることができる可能性があること, なによりも長年臨床で使用され重篤な副作用の報告がないことより, 投与量は現在よりも多めに設定する必要はあるが GGA を臨床応用できる可能性は十分にあるといえる。

音響障害, 加齢は内耳へ不可逆的な障害を与えるストレスであるが, 臨床においてみられる内耳に不可逆的な障害を与えるものとして, 手術による機械的ストレス, 抗瘤剤, 抗菌薬などの内耳毒性物質によるもの, 感染や自己免疫による炎症性のも, 突発性難聴などで考えられている循環障害によるもの

などが挙げられる。本研究で示した HSR 誘導による内耳保護効果が, 上記のストレスに対しても保護的に働く可能性は十分考えられ, 今後の内耳治療における新しい治療法の選択肢の一つに成りうると期待している。

参考文献

- 1) Lindquist S: The heat-shock response *Ann Rev Biochem* 55: 1151-1191, 1986.
- 2) Morimoto RI: Regulation of heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev* 12: 3788-3796, 1998.
- 3) Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, et al: Heat shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2: 469-475, 2000.
- 4) Bruey JM, Ducasse C, Bonniaud P, Ravagnan L, Susin SA, et al: Hsp 27 negatively regulates cell death by interacting with cytochrome c. *Nat Cell Biol* 2: 645-652, 2000.
- 5) Pandey P, Saleh A, Nakazawa A, Kumar S, Srinivasula SM, et al: Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. *EMBO J* 19: 4310-4322, 2000.
- 6) Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES: Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70. *Nat Cell Biol* 2: 476-483, 2000.
- 7) Inouye S, Fujimoto M, Nakamura T, Takaki E,

- Hayashida N, et al : Heat shock transcription factor 1 opens chromatin structure of interleukin-6 promoter to facilitate binding of an activator or a repressor. *J Biol Chem* 282 : 33210-33217, 2007.
- 8) Neely JG, Thompson AM, Gower DJ : Detection and localization of heat shock protein 70 in the normal guinea pig cochlea. *Hear Res* 52 : 403-408, 1991.
- 9) Fairfield DA, Kanicki AC, Lomax MI, Altschuler RA : Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea. *Hear Res* 173 : 109-118, 2002.
- 10) Akizuki H, Yoshie H, Morita Y, Takahashi K, Hara A, et al : Nuclear transition of heat shock protein in guinea pig cochlea after hyperthermia. *Hear Res* 92 : 126-130, 1995.
- 11) Thompson AM, Neely JG : Induction of heat shock protein in interdental cells by hyperthermia. *Otolaryngol Head Neck Surg* 107 : 769-774, 1992.
- 12) Yoshida N, Kristiansen A, Liberman MC : Heat stress and protection from permanent acoustic injury in mice. *J Neurosci* 19 : 10116-10124, 1999.
- 13) Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, et al : Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear Res* 182 : 88-96, 2003.
- 14) Taleb M, Brandon CS, Lee FS, Harris KC, Dillmann WH, et al : Hsp70 inhibits aminoglycoside-induced hearing loss and cochlear hair cell death. *Cell Stress Chaperones*, 2009, in press.
- 15) Hirakawa T, Rokutan K, Niwaka T, Kishi K : Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 111 : 345-357, 1996.
- 16) Hirakawa T, Rokutan K, Niwaka T, Kishi K : Geranylgeranylacetone induces heat shock proteins in cultured guinea pig gastric mucosal cells and rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 111 : 345-357, 1996.
- 17) Tsuruma T, Yagihashi A, Koide S, Araya J, Tarumi K, et al : Geranylgeranylacetone induces heat shock protein-73 in rat small intestine. *Transplant Proc* 31 : 572-573, 1999.
- 18) Kikuchi S, Shinpo K, Takeuchi M, Tsuji S, Yabe I, et al : Effect of geranylgeranylacetone on cellular damage induced by proteasome inhibition in cultured spinal neurons. *J Neurosci Res* 69 : 373-381, 2002.
- 19) Ooie T, Takahashi N, Saikawa, T, Nawata T, Arikawa M, et al : Single oral dose of geranylgeranylacetone induces heat-shock protein 72 and renders protection against ischemia/reperfusion injury in rat heart. *Circulation* 104 : 1837-1843, 2001.
- 20) Fujiki M, Kobayashi H, Abe T, Ishii K : Astroglial activation accompanies heat shock protein upregulation in rat brain following single oral dose of geranylgeranylacetone. *Brain Res* 991 : 254-257, 2003.
- 21) Mikuriya T, Sugahara K, Takemoto T, Tanaka K, Takeno K : Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. *Brain Res* 14 : 107-114, 2005.
- 22) Mikuriya T, Sugahara K, Sugimoto K, Fujimoto M, Takemoto T : Attenuation of progressive hearing loss in a model of age-related hearing loss by a heat shock protein inducer, geranylgeranylacetone. *Brain Res* 30 : 9-17, 2008.
- 23) Nakagawa T, Yamane H, Shibata S, Takayama M, Sunami K, et al : Two modes of auditory hair cell loss following acoustic overstimulation in the avian inner ear. *ORL J* 59 : 303-310, 1997.
- 24) Kopke R, Allen KA, Henderson D, Hoffer M, Frenz D, et al : A radical demise. Toxins and trauma share common pathways in hair cell death. *Ann NY Acad Sci* 884 : 171-191, 1999.
- 25) Kaygusuz I, Ozturk A, Ustundag B, Yalcin S : Role of free oxygen radicals in noise-related hearing impairment. *Hear Res* 162 : 43-47, 2001.
- 26) Yamasoba T, Schacht J, Shoji F, Miller JM : Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res* 815 : 317-325, 1999.
- 27) Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH : The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 27 : 11-19, 2006.
- 28) Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, et al : The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 20 : 7146-7159, 2000.
- 29) Mehlen P, Kretz-Remy C, Preville X, Arrigo

- AP : Human Hsp27, Drosophila Hsp27 and human alpha B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF alpha-induced cell death. *EMBO J* 15 : 2695-2706, 1996.
- 30) Leonova EV, Fairfield DA, Lomax MI, Altschuler RA : Constitutive expression of Hsp27 in the rat cochlea. *Hear Res* 163 : 61-70, 2002.
- 31) Murakoshi M, Yoshida N, Kitsunai Y, Iida K, Kumano S, et al : Effects of heat stress on Young's modulus of outer hair cells in mice. *Brain Res* 1107 : 121-130, 2006.
- 32) Tomisato W, Tsutsumi S, Tsuchiya T, Mizushima T : Geranylgeranylacetone protects guinea pig gastric mucosal cells from gastric stressor-induced necrosis by induction of heat-shock proteins. *Biol Pharm Bull* 24 : 887-891, 2001.
- 33) Fawcett TW, Sylvester SL, Sarge KD, Morimoto RI, Holbrook N : Effects of neurohormonal stress and aging on the activation of mammalian heat shock factor 1. *J Biol Chem* 269 : 32272-32278, 1994.
- 34) Morley JF, Morimoto RI : Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 15 : 657-664, 2004.

Summary

HEAT SHOCK RESPONSE AND MECHANISM OF OTO-PROTECTION

Hiroshi Yamashita, MD
Takefumi Mikuriya, MD

*Department of Otolaryngology,
Yamaguchi University Graduate School of Medicine*

All lives have heat shock response (HSR) that is characterized by activation of heat shock transcription factor 1 (HSF1) and induction of heat shock proteins (HSPs) in response to stresses. When proteins are damaged due to various stresses, HSPs undergo cytoprotective function by acting as molecular chaperones that stabilize denatured proteins and facilitate their refolding and degradation. HSF1 and HSPs exist in the inner ear and play a protective role against cochlear damage. We showed that HSR inducer, geranylgeranylacetone (GGA) activate HSF1 and induce HSPs in cochlea and repetitive preventive administration of the agent could ameliorate ABR threshold shift up and loss of outer hair cell drastically. The mechanism of protection by GGA were considered that via chaperon function, anti-apoptosis effect, anti-oxidant effect, enhancement of stiffness and anti-inflammation.

We also showed here that HSPs in cochlea diminished during aging and pharmacological upregulation of HSPs attenuate age-related hearing loss (ARHL) using one of this model. In addition, when ARHL model mice were exposed to intense noise at elder age, there were less induction of HSPs than that of young age. These results indicate that HSR in cochlea diminishes with aging and that result in vulnerable to aging and sound stress.

We demonstrated that importance of HSR in oto-protection and possibility of GGA to clinical application.

Key words : heat shock response, noise injury, age related hearing loss

眼窩下壁骨折の内視鏡所見による分類とその対処

—眼窩骨膜と上顎洞粘膜の損傷状態とその発生機序—

柳 清 吉田 拓人 森 恵 莉
やなぎ きよし よし たくと もり えり
 小林 俊 樹
こばやし とし き

眼窩下壁骨折の病態は骨折片の状態による分類が一般的である。すなわち骨折片が変位していない線状型骨折、骨折片の片側が離開する扇型骨折、そして骨折片が完全に遊離する打ち抜き型骨折である。一方眼窩下壁骨折に対する手術は内視鏡下に行うことで、手術操作も以前より繊細な操作が可能となってきた。すなわち手術においては骨折片の状態ばかりでなく、眼窩骨膜や上顎洞粘膜の状態を把握して処置をすることが重要となる。それは上顎洞粘膜と眼窩骨膜の損傷状態により、手術の手順や難易度が変わってくるからである。

今回の検討症例 29 例中、扇型骨折は 19 例、打ち抜き型骨折は 7 例、線状型骨折は 3 例であった。これら骨折の状態と眼窩骨膜、上顎洞粘膜の損傷有無を調べたところ、線状型骨折の 3 例全例で眼窩骨膜、上顎洞粘膜とも破れ、骨折の亀裂から眼窩内脂肪が嵌頓していた。一方扇型骨折、打ち抜き型骨折ではほとんどの症例で眼窩骨膜、上顎洞粘膜の損傷は見られなかった。眼窩下壁骨折の手術の際にはこれらの状態を念頭に入れ、操作をすることで手術成績は向上すると考えた。

キーワード：眼窩吹き抜け骨折、眼窩下壁骨折、内視鏡下鼻内手術、骨折形態

はじめに

眼窩下壁骨折の病態は骨折片の状態による分類が一般的である。すなわち骨折片が変位していない線状型骨折、骨折片の片側が離開する扇型骨折、そして骨折片が完全に遊離する打ち抜き型骨折である。一方眼窩下壁骨折に対する手術は内視鏡下に行うことで、手術操作も以前より繊細な操作が可能となってきた。すなわち手術においては骨折片の状態ばかりでなく、眼窩骨膜や上顎洞粘膜の状態を把握して処置をすることが重要となる。それは上顎洞粘膜と眼窩骨膜の損傷状態により、手術の手順や難易度が変わってくるからである。今回我々は内視鏡下に手術操作をする際にこれらの状態を確認し、分類することで若干の知見を得たので報告する。

症例と手術方法

症例は平成 12 年 1 月から平成 18 年 12 月までの 7 年間に聖路加国際病院耳鼻咽喉科で手術を行った聖路加国際病院耳鼻咽喉科

29 例を対象にした。全例が単独の下壁骨折であり、男性が 18 名、女性が 11 名であった。手術は全例全身麻酔下に行った。手術方法は上顎洞前壁に 2 つ、下鼻道側壁に 1 つの合計 3 つのコントロールホールを設け、内視鏡下に眼窩下壁骨折を整復した。この時撮影したビデオを元に、眼窩骨膜と上顎洞粘膜の損傷の有無と骨折の状態を検討した。

結 果

全 29 例の中で骨折のタイプは、扇型骨折が 19 例と最も多く、次に打ち抜き型骨折が 7 例、線状型骨折が 3 例であった（図 1）。これらの症例を眼窩骨膜と上顎洞粘膜が破れていたかどうかで検討したところ、眼窩骨膜と上顎洞粘膜の両方が破れていた症例は 5 例であった（図 2）。ここには線状型骨折の 3 例が全例含まれていた。残りの 2 例は扇型骨折であった。次に眼窩骨膜が破れ上顎洞粘膜が破れていなかった症例が 4 例（扇型骨折 2 例、打ち抜き型骨折 2 例）、上顎洞粘膜が破れ、眼窩骨膜が破れていなかった症例はなかった。眼窩骨膜、上顎洞粘膜とも

炎症・再生医学 事典

松島綱治

西脇 徹

……[編集]……

朝倉書店

4. 耳鼻咽喉

耳鼻咽喉科領域では、再生医療は未だ研究段階ではあるが、各臓器でさまざまな試みが行われている（表1）。本稿では、内耳、中耳、嗅上皮、唾液腺における現在まで得られた再生研究の知見について紹介したい。

a. 内耳

内耳は聴覚と平衡覚を担う感覚器である。感覚細胞は有毛細胞とも呼ばれ、側頭骨に囲まれた最深部に位置している。有毛細胞はさまざまな疾患によって障害されるが、哺乳動物では障害された有毛細胞は再生することなく、機能障害が一生継続し、QOLの低下をもたらす。また、加齢によっても有毛細胞やらせん神経節

細胞は減少し、老人性難聴を引き起こす（図1）。難聴や平衡機能障害の身体障害者数が50万人を越えていることから、その重要性は明らかである。内耳はその複雑な形態から、再生医療を適用するのは容易ではない。人工内耳が開発され、高度難聴に対する治療の中心となっている。しかしながら、有毛細胞を再生させる研究も行われており、2種類のアプローチが注目されている。1つは非感覚細胞を形質転換させて有毛細胞を再生する方法で、1つは幹細胞に代表される幼若な細胞を移植する方法である。転写因子であるAtoh1は多能性前駆細胞を有毛細胞に分化させる遺伝子として同定された。最近では、アミノグリコシド系抗菌薬を用

表1 耳鼻咽喉科分野の再生医学

耳	内耳	感音性難聴	遺伝子導入、細胞移植による感覚細胞の再生
	中耳	中耳炎症性疾患	tissue engineeringによる中耳構造の再生
鼻	嗅覚	嗅覚脱失	細胞移植による神経細胞の再生
咽喉頭	唾液腺	ドライマウス	前駆細胞移植による腺組織の再生
	喉頭	反回神経麻痺	tissue engineeringによる神経再生

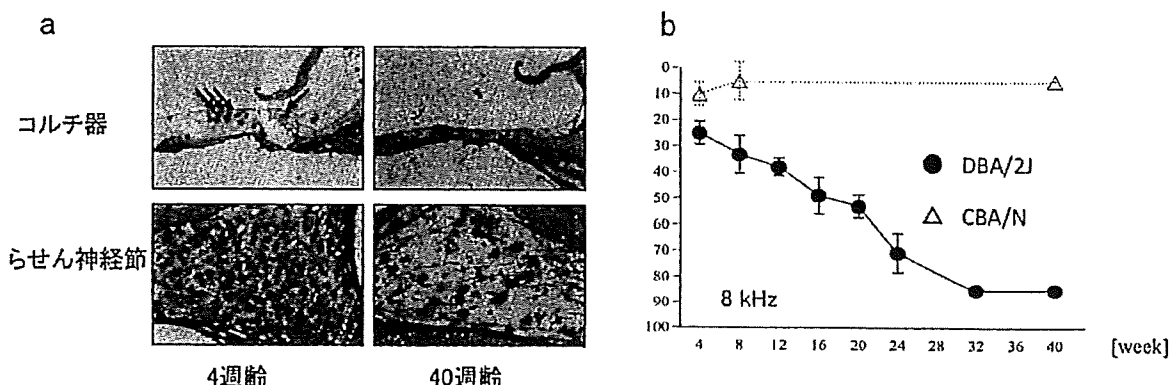


図1 老人性難聴モデルマウスの内耳における加齢による変化

加齢によって、有毛細胞（矢印）らせん神経節細胞が減少するが、通常再生されることはない（a）。聴覚を聴性脳幹反応（ABR）を用いて評価した（b）。モデルマウス（DBA/2J）では細胞の減少に伴って、ABR閾値が増加し、聴覚障害が進行している。

いて障害した内耳へ、アデノウイルスベクターを用いて Atoh1 遺伝子を導入すると、支持細胞が有毛細胞に形質転換し、聴覚が改善するという結果が報告されている¹⁾。内耳障害より長時間が経過すると支持細胞が増生し内耳の形態が変化することから、この実験モデルを臨床応用するには解決すべき点が多い。またウイルスベクターを用いることから安全性の確認が不可欠であるが、哺乳動物で有毛細胞が再生し、機能回復するという初めての報告であり、今後の研究の発展に期待したい。

一方で、前駆細胞を移植する試みも行われている。以前より成熟した哺乳動物の有毛細胞は再生しないと信じられてきたが、一定の条件下で細胞分裂が生じることが明らかになっている²⁾。その後、成熟したマウスの前庭感覚上皮に幹細胞が存在することが報告された³⁾。これらの内耳幹細胞や ES 細胞より誘導された細胞を内耳へ移植する試みが行われているが、内耳に生着することは確認されるものの、障害された有毛細胞の機能回復を示した報告はなく、研究の進展が待たれる。

b. 中耳

中耳における疾患は主として炎症性疾患である。なかでも真珠腫性中耳炎は骨破壊を伴って進展するため、合併症が出現する前に手術的治療が選択される。しかし、難治例では手術をしても十分な術後成績を得られない場合がある。術後の中耳（乳突蜂巣）形態が大きく変形すると、予後が不良となる。したがって、乳突蜂巣を生来の形態に近づけるための臨床研究が行われている。蜂巣構造をしたハイドロキシアパタイトをブタコラーゲンで被覆処理し、手術終了時に中耳腔内に留置する。これが体内の足場（scaffold）として作用し、本来の乳突蜂巣様の再構築を目指すものである⁴⁾。これまでの報告では、正常に近い乳突蜂巣様の構造が再生できる症例も認められる。

c. 嗅覚

嗅覚の感覚細胞は外界に非常に近い部位（嗅上皮）に存在する。外部からのさまざまなストレス（薬剤、炎症等）によって障害を受けやすいことから、常に新しい嗅細胞に置き換わるという特徴がある。そのため、マウスなどで実験的に嗅球除去や嗅糸断裂を行うと、ほとんどの嗅細胞はアポトーシスを起こすが、4週間ほどで嗅細胞は再生され、ほぼ障害前の状態にまで改善する。これは、実際の臨床で嗅覚障害が治癒する例が非常に多いことに矛盾しない。しかし、加齢によって嗅細胞の再生能力は減少する。さらに、アルツハイマー病では、より中枢側の嗅球、嗅索での障害が顕著となり、においの検知は変化しないが、においの種類を同定する能力が低下することが最近明らかにされた。動物実験レベルであるが、骨髄間質幹細胞を経静脈的に全身投与、または局所投与すると、嗅上皮に生着し、嗅細胞に分化することが確認されている。これらの研究が進めば、嗅覚障害に悩む患者にとっての福音となるかもしれない。

d. 唾液腺

唾液腺の障害は口腔乾燥を引き起こし、多くの患者の QOL を低下させる。シェーグレン症候群に代表される疾患や頭頸部癌に対する放射線治療による唾液腺の分泌障害が原因となる。この分野でも再生医療を目指した研究が行われている。動物実験では、正常唾液腺細胞や唾液腺管細胞の移植が行われている。これらの細胞を皮下に移植しても生着はするが、分泌に必要な腺管構造は形成されない。一方、障害された唾液腺内に移植すると、萎縮腺に生着し腺管構造を形成する。ヒトの口腔小唾液腺から唾液管細胞を同定する研究も行われており、近い将来、再生医療が臨床応用される分野であると考えられる⁵⁾。

[山下裕司, 菅原一真]

■文献

- 1) Izumikawa M, et al : Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat Med* 11 : 271-276, 2005.
- 2) Yamashita H, et al : Induction of cell proliferation in mammalian inner-ear sensory epithelia by transforming growth factor alpha and epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 3152-3155, 1995.
- 3) Li H, et al : Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nat Med* 9 : 1293-1299, 2003.
- 4) Kanemaru S, et al : Regeneration of mastoid air cells in clinical applications by in situ tissue engineering. *Laryngoscope* 115 : 253-258, 2005.
- 5) 河南崇典, 他 : ヒト口唇小唾液腺培養細胞からの唾液腺幹細胞の同定. *日本臨床免疫学会会誌* 30 : 455-460, 2007.

