

## 急性低音障害型感音難聴診断基準（案）

（厚生省特発性両側性感音難聴調査研究班、2000年）  
（厚生労働省特定疾患急性高度難聴調査研究班、2012年改訂）

### 主症状

1. 急性あるいは突発性に耳症状（耳閉塞感、耳鳴、難聴など）が発症
2. 低音障害型感音難聴
3. めまいは伴わない
4. 原因不明

### 参考事項

1. 難聴
  - ① 低音域3周波数（0.125 kHz、0.25 kHz、0.5 kHz）の聴力レベルの合計が70dB以上
  - ② 高音域3周波数（2 kHz、4 kHz、8 kHz）の聴力レベルの合計が60dB以下
2. 蝸牛症状が反復する例がある
3. 反復発症時に聴力レベルが診断基準に合致しない例がある
4. メニエール病に移行する例がある
5. 軽いめまい感を訴える例がある
6. 時に両側性の例がある

確実例：主症状のすべて、および難聴基準①、②をみたすもの

準確実例：主症状のすべて、および難聴基準①をみたし、かつ高音域3周波数の聴力レベルが健側と同程度のもの

## ムンプス難聴診断基準（案）

（厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班、1987年改訂）  
（厚生労働省特定疾患急性高度難聴調査研究班、2012年改訂）

### 1. 確実例

- 1) 耳下腺・顎下腺腫脹など臨床的に明らかなムンプス症例で、腫脹出現4日前より出現後18日以内に発症した急性高度難聴の症例
- 2) 臨床的にはムンプスが明らかでない症例で、急性高度難聴発症直後から2カ月以内にムンプスIgM抗体が検出された症例

### 2. 参考例

臨床的にムンプスによる難聴と考えられた症例

- 1) 家族・友人にムンプス罹患があった症例
- 2) 確実例1)における日数と差のあった症例

# 外リンパ瘻診断基準（案）

（厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班、1983年）  
（厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班、1990年改訂）  
（厚生省特定疾患急性高度難聴調査研究班および新規診断マーカーCTPを用いた難治性内耳疾患の多施設検討に関する研究班、2012年改訂）

1. 確実例（診断基準項目） 下記項目のうちいずれかを満たすもの
  - （1）顕微鏡、内視鏡などにより中耳と内耳の間に瘻孔を確認できたもの。瘻孔は蝸牛窓、前庭窓、骨折部、microfissure、奇形、炎症などによる骨迷路破壊部などに生じる。
  - （2）中耳からCochlin-tomoprotein（CTP）が検出できたもの。
2. 疑い例（外リンパ瘻の症状、経過、検査所見について）。
  - A 突発的、または数日間の経過で発症する場合がある。
  - B 難聴、耳鳴、耳閉塞感、めまい、平衡障害などの症状が短期間に変動する場合がある。
  - C 蝸牛、末梢前庭障害の程度は様々であり、明らかな異常が認められないものから、高度機能障害までである。
  - D 下記の症候が認められる場合がある
    - ・「水の流れるような耳鳴」または「水の流れる感じ」がある。
    - ・発症時にパチッなどという膜が破れるような音（pop音）を伴う。
    - ・外耳・中耳の加圧・減圧などでめまいを訴える。または眼振を認める。
    - ・画像上、迷路気腫、骨迷路の瘻孔など外リンパ瘻を示唆する所見を認める。

## IV. 突発性難聴診断ガイドライン

## 突発性難聴診療ガイドライン（2013年版）コンテンツ

厚生労働省難治疾患克服事業「急性高度難聴」調査研究班／編

序文-診療ガイドライン（診療の手引き）の発刊にあたってー

突発性難聴の歴史的背景

突発性難聴の診断基準

（含む英文版と海外における診断基準）

突発性難聴の grading

突発性難聴の疫学

突発性難聴の病態

小児の突発性難聴

突発性難聴の診断：総論

（含む診断のフローチャート）

突発性難聴と QOL

突発性難聴の遺伝子診断

突発性難聴の画像診断

突発性難聴の聴覚医学的診断

突発性難聴の治療：総論

突発性難聴の治療：治療効果判定基準

突発性難聴の自然治癒突発性難聴の急性期治療

薬物療法の EBM

副腎皮質ステロイド

循環改善薬、抗凝固薬

抗ウイルス薬

漢方薬など

新しい治療薬開発（含む IGF やスカベンジャー）

鼓室内投与療法

高気圧酸素療法

星状神経節ブロック

低温療法、その他

突発性難聴の予後

突発性難聴の慢性期治療

突発性難聴の類似疾患

-急性低音障害型感音難聴（メニエール病）

-外リンパ瘻

-急性音響性難聴

- 聴神経腫瘍
  - ステロイド依存性難聴
  - ウイルス性難聴（ムンプス難聴）
  - Auditory Neuropathy など
  - 特発性両側感音難聴
- 今後の課題と展望
- 突発性難聴に関する文献

## V. 班會議報告

## 厚生労働省難治性疾患克服研究事業

### 【急性高度難聴に関する調査研究】中間報告班会議

日時：平成23年11月24日（木） 12時30分から13時30分（昼食をとりながら）

場所：沖縄コンベンションセンター B5（会議棟B 1F）

#### 1) 研究代表者挨拶

#### 2) 下記の順番で各大学より報告をうけ、質疑応答

- \* 発表時間は、各大学5分検討でそれぞれの演題について時間を割り振ってください。  
演題が3つの場合は各2分弱ずつで発表をお願い致します。

岩手医科大学	1) 発性難聴における酸化ストレス調査の集計結果について 2) 加齢性難聴における Sirt3 の SNPs 解析
愛媛大学	虚血性内耳障害モデルを用いた急性高度難聴に対する新治療法開発の展開
岡山大学	CADL を用いた検討の進捗状況
北里大学	突発性難聴の QOL, ハンディキャップ調査の現況
信州大学	遺伝子バンク構築の現況報告
筑波大学	筑波大学の進捗状況
東京大学	1) 先天性 CMV 児の人工内耳成績 2) メニエール病発作により近いモデル動物作成 3) 加齢による時間分解能の変化
東京医科歯科大学	東京医科歯科大学難聴研究進捗状況について
名古屋大学	突発性難聴の全国疫学調査
北海道大学	突発性難聴に対するシロスタゾールの有効性に関する検討
慶應義塾大学	1) in vivo 内耳モニタリングシステムの確立 2) 内耳におけるオートファジーについて 3) 突発性難聴の診療ガイドライン

#### 3) 今後の報告書作成までの予定について

#### 4) その他

平成 23 年度 第 2 回厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業

【急性高度難聴に関する調査研究】研究報告班会議プログラム

2012 年 2 月 11 日 土曜日 午前 9 時 30 分～

場所：慶応義塾大学病院 3 号館北棟 1 階ラウンジ

TEL03-3353-1211(代表)

挨拶 研究代表者 小川 郁 9:25～

第 1 群 (9:30～10:00) 発表 7 分、質疑 3 分

座長 喜多村 健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)

1. 全身性 Mn-SOD ヘテロ欠損マウスにおける蝸牛の加齢性変化

木下淳 1、櫻尾明憲 1、清水孝彦 2、山岨達也 1

1) 東京大学耳鼻咽喉科 2) 東京都健康長寿医療センター研究所老化機構研究チーム

2. Nrf2 による内耳抗酸化酵素転写の制御とゲンタマイシン耳毒性に対する効果

田淵経司、原 晃 (筑波大学耳鼻咽喉科)

3. プロサポシン由来合成ペプチドによる虚血性内耳障害の防御

白馬伸洋、岡田昌浩、高木太郎、羽藤直人、暁 清文(愛媛大耳鼻咽喉科)、寺下健洋 (兵庫県)

第 2 群 (10:00～10:30) 発表 7 分、質疑 3 分

座長 暁 清文(愛媛大学耳鼻咽喉科)

4. 内耳培養細胞を用いた細胞死に関するオートファジーのメカニズムの解明

本村朋子、土橋奈々、林賢、神崎晶、五島史行、藤岡正人、渡部高久、和佐野浩一郎、稲垣洋三、若林聡子、斎藤秀行、井上泰宏、小川郁 (慶應義塾大学耳鼻咽喉科)

5. C57BL/6 における miRNA 蝸牛内発現の経時的変化

野口佳裕、高橋正時、本田圭司、西尾綾子、川島慶之、喜多村健 (東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)

6. デキサメタゾン鼓室内投与による蝸牛での Fkbp5 誘導

前田幸英、平井美紗都、福島邦博 (岡山大学耳鼻咽喉・頭頸部外科)

第 3 群 (10:30～11:05) 発表 7 分、質疑 3 分 9 のみ 15 分 (質疑含む)

座長 宇佐美 真一 (信州大学耳鼻咽喉科)



7. 老人性難聴における Sirt3 遺伝子多型の検索  
大塚尚志、嶋本記里人、桑島秀、佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）
8. 老人性難聴の関連遺伝子研究  
鈴木伸嘉、西尾信哉、宇佐美真一（信州大学耳鼻咽喉科）
9. 難治性内耳疾患の遺伝子バンク構築 ～突発性難聴の遺伝子 SNP 解析～  
鬼頭良輔、西尾信哉、宇佐美真一（信州大学耳鼻咽喉科）、小川郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）、岡本牧人（北里大学耳鼻咽喉科）、喜多村健（東京医科歯科大学医学部耳鼻咽喉科）、暁清文（愛媛大学耳鼻咽喉科）、佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）、中島務（名古屋大学耳鼻咽喉科）、福島邦博（岡山大学耳鼻咽喉・頭頸部外科）、福田諭（北海道大学耳鼻咽喉科）、原晃（筑波大学耳鼻咽喉科）、山唄達也（東京大学耳鼻咽喉科）

休憩 10 分

**第 4 群（11:15～11:45）発表 7 分、質疑 3 分**

**座長 佐藤 宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）**

10. CADL（実用コミュニケーション評価）による補聴器装用効果の検討  
菅谷明子、前田幸英、福島邦博（岡山大学耳鼻咽喉・頭頸部外科）

11. 加齢による時間情報処理能力の低下はどう起こるか？

越智篤 1、古川茂人 2、山唄 達也 1

1) 東京大学耳鼻咽喉科 2) NTT コミュニケーション科学基礎研究所

12. 一側性高度難聴患者の騒音下での語音聴取の画像解析

山本桂 1、田部井賢一 2、勝山成美 3、泰羅雅登 3、喜多村健 1

1) 東京医科歯科大学耳鼻咽喉科 2) 日本大学大学院総合科学研究科 3) 東京医科歯科大学認知神経生物学分野

**第 5 群（11:45～12:25）発表 7 分、質疑 3 分**

**座長 中島 務（名古屋大学耳鼻咽喉科）**

13. 蝸牛内リンパ水腫と自覚症状

曾根三千彦、吉田忠雄、佐野 塁、加藤正大、大竹宏直、加藤 健、寺西正明、中島 務（名古屋大学耳鼻咽喉科）

14. 7T-MRIによる内耳動脈描出の検討

水川敦裕、川岸和朗、佐藤宏昭（岩手医科大学耳鼻咽喉科）、工藤與亮（先端医療研究センター・超高磁場MRI診断・病態研究部門）

15. 突発性難聴発症後3か月以上の患者の耳鳴評価と心理評価

猪健志 1、佐野肇 2、小野雄一 3、牧敦子 2、大橋健太郎 2、岡本牧人 2

1) 北里大学大学院医療系研究科東洋医学講座 2) 北里大学医学部耳鼻咽喉科

3) 津久井赤十字病院

16. 当科における突発性難聴ステロイド鼓室内注入療法の現況

岡田昌浩、高木太郎、白馬伸洋、羽藤直人、暁 清文（愛媛大学耳鼻咽喉科）

昼食 12:25 ~13:15

**第6群 (13:15~13:45) 発表7分、質疑3分**

**座長 岡本 牧人（北里大学耳鼻咽喉科）**

17. ステロイド依存性難聴に移行した Charcot-Marie-Tooth 病に伴う感音難聴

大道亮太郎、前田幸英、福島邦博（岡山大学耳鼻咽喉・頭頸部外科）

18. 当院における原田病の聴平衡覚所見

西尾綾子 1、野口佳裕 1、高瀬 博 2、宮永 将 2、望月 學 2、喜多村 健 1

1) 東京医科歯科大学耳鼻咽喉科 2) 東京医科歯科大学眼科

19. Vogt-小柳-原田病に伴う聴力障害に対する鼓室内ステロイド注入療法

小原修幸、武市紀人、福田諭（北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野）

**第7群 (13:45~14:45) 各演題 15分（質疑含む）**

**座長 小川 郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）**

20. 突発性難聴、片側高度難聴者に対するハンディキャップアンケート調査—第1報

岩崎 聡 1)、佐野 肇 2)、西尾信哉 3)、工 穰 1、3)、岡本牧人 2)、宇佐美真一 3)

1) 信州大学人工聴覚器学講座 2) 北里大学耳鼻咽喉科 3) 信州大学耳鼻咽喉科

21. 突発性難聴症例に対する症状、ハンディキャップ、QOL 調査の解析  
佐野 肇 1)、大橋健太郎 1)、牧敦子 1)、猪健志 2)、小野雄一 3)、岡本牧人 1)  
1) 北里大学耳鼻咽喉科 2) 北里大学大学院医療系研究科東洋医学講座  
3) 津久井赤十字病院
22. 突発性難聴全国疫学調査  
中島務、曾根三千彦、寺西正明、吉田忠雄、加藤正大 (名古屋大学耳鼻咽喉科)、暁清文、  
羽藤直人 (愛媛大学耳鼻咽喉科)、佐藤宏昭 (岩手医科大学耳鼻咽喉科)、小橋元 (放射線  
医学総合研究所)、小川郁 (慶應義塾大学耳鼻咽喉科)
23. 急性高度難聴の診療ガイドラインについて  
小川郁 (慶應義塾大学耳鼻咽喉科)

## VI. 分担研究報告

## 内耳虚血・再灌流障害に対する人工酸素運搬体の保護作用に関する研究

分担研究者：暁 清文（愛媛大学耳鼻咽喉科・教授）  
共同研究者：岡田昌浩（愛媛大学耳鼻咽喉科・医員）  
共同研究者：白馬伸洋（愛媛大学耳鼻咽喉科・講師）  
共同研究者：竹田将一郎（愛媛大学耳鼻咽喉科・助教）  
共同研究者：羽藤直人（愛媛大学耳鼻咽喉科・准教授）  
共同研究者：兵頭 純（鷹の子病院耳鼻咽喉科）  
共同研究者：川口 章（東海大学再生医療科学・准教授）

### 研究要旨

人工酸素運搬体の一つである Liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) は、輸血用赤血球の代用品として開発された物質であるが、その優れた酸素運搬能を活用して虚血性疾患への応用が検討されている。昨年、LEH を一過性内耳虚血前に投与することで、聴力閾値上昇や内有毛細胞脱落をブロックし内耳を保護する効果のあることを報告した。今回は、より臨床に即した状況に対応するため、虚血後に LEH 投与を行い、その効果を検討した。実験にはスナネズミ一過性内耳虚血モデル（15 分虚血）を用いた。虚血 1 時間後に生食、LEH のいずれかを 2ml/kg、静注した。聴力は、虚血前、虚血 1・4・7 日後に ABR を用いて評価した。組織学的には虚血 7 日後の有毛細胞の脱落割合を算出し評価した。LEH 群は生食群と比較し、虚血後の聴力閾値上昇と内有毛細胞脱落割合を有意に抑制した。LEH は虚血 1 時間後に投与しても内耳障害防御効果のあることが示唆された。

### 研究目的

突発性難聴は原因不明の感音難聴であるが、内耳虚血が発症メカニズムの一つとして推察されている。人工酸素運搬体は輸血代用品として開発されたものだが、その優れた酸素運搬能を利用して、虚血性疾患への応用が検討されている。昨年、我々は人工酸素運搬体の一つである Liposome-encapsulated hemoglobin

(LEH) を内耳虚血前に投与し、一過性内耳虚血に対する有用性を報告した。しかし、虚血前に投与したため、内耳虚血が十分に起こらなかった可能性が否定できなかった。実際、臨床応用するに当たっては虚血後投与の検討が不可欠と思われる。そこで今回、LEH を虚血後に投与し、内耳保護効果を生理学的ならびに組織学的に検討したので報告する。

## 研究方法

実験動物には12～16週齢の雄スナネズミを用いた。生食投与群として6耳、LEH投与群として6耳の計12耳について検討した。ハロセン吸入麻酔下に動物を仰臥位にして頸部正中切開を施行し、両側の椎骨動脈を同定した。椎骨動脈に絹糸をかけ、5gの重りを負荷して15分間牽引することで内耳一過性虚血を行った。虚血1時間後に生食、LEHのいずれかを2ml/kg静注した。

聴力は、虚血前、虚血1・4・7日後にABRを用いて評価した。ABRの音刺激はOpen Field Systemで、8kHz、16kHz、32kHzの3周波数のTone burst (rise-fall time: 1msec, duration: 5msec)を用いた。

虚血7日後に深麻酔下に断頭し、骨胞を摘出、Surface preparation法を用いることでコルチ器を採取し、Rhodamine-phalloidin、Hoechst33342による2重染色を行って基底回転の有毛細胞の脱落割合を算出した。

(倫理面への配慮)

実験は十分な麻酔下に行い、断頭も深麻酔下に動物に苦痛を与えずに行った。愛媛大学医学部動物実験指針に従い実験をおこなったため、倫理面の問題はない。

## 研究結果

ABRで測定した聴力閾値の推移を図1に示す。LEH群は生食群と比較し、虚血後の聴力閾値上昇を有意に抑制した。また、内有毛細胞脱落割合も同様で、LEH群では

細胞の脱落は有意に少なかった。一方、外有毛細胞の脱落割合は各群間で有意差はなかった(図2)。

## 考察

人工酸素運搬体は輸血用赤血球の代用品として開発された物質であるが、その優れた酸素運搬能・供給能を活用して虚血性疾患の治療薬としての可能性が検討されている。今回、我々が用いた人工酸素運搬体の一つであるLEHはHbをリポソームでカプセル化したものである。大きさは赤血球の約1/30で微小な血管にも容易に到達できる。今回、LEHを虚血後に投与しても、内耳障害が抑制される結果が得られた。以前に我々は、一過性内耳虚血によりiNOSが発現し、NOが産生されることで内耳障害が引き起こされることを報告している。iNOS遺伝子のプロモーター領域にはhypoxia response element(HRE)が存在し、低酸素状態でiNOS発現が亢進すると考えられている。LEHの投与により、低酸素状態が速やかに改善されることで、iNOSの発現、NOの産生が抑制され、内耳障害を抑制したと推察されるが、今後、免疫染色を追加して検討する予定である。

## 結論

虚血性内耳障害に対して、LEHは虚血後に投与しても保護効果を示すことが示された。

## 健康危険情報

なし

## 研究報告

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

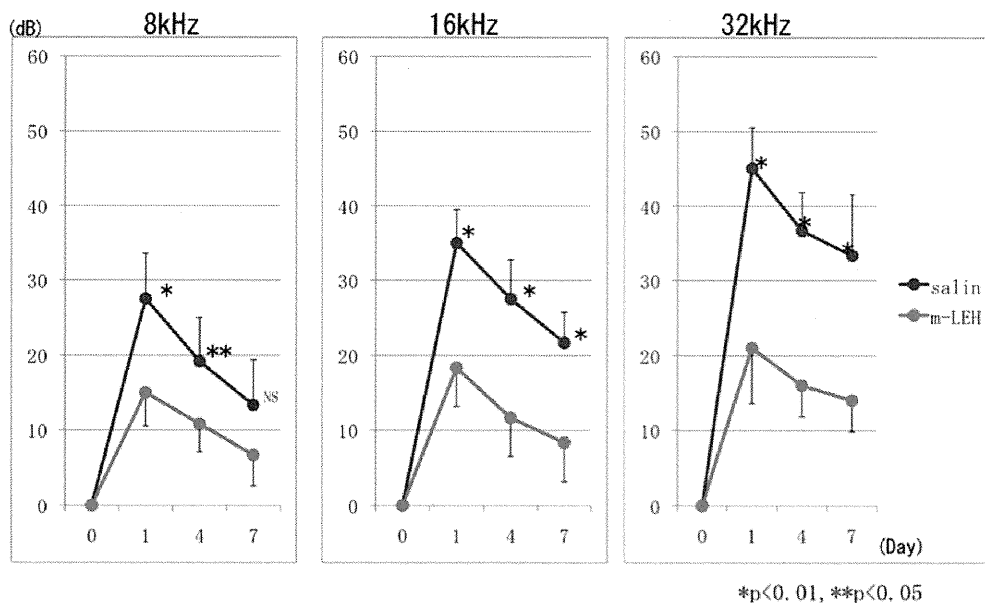
なし

### 3. その他

なし

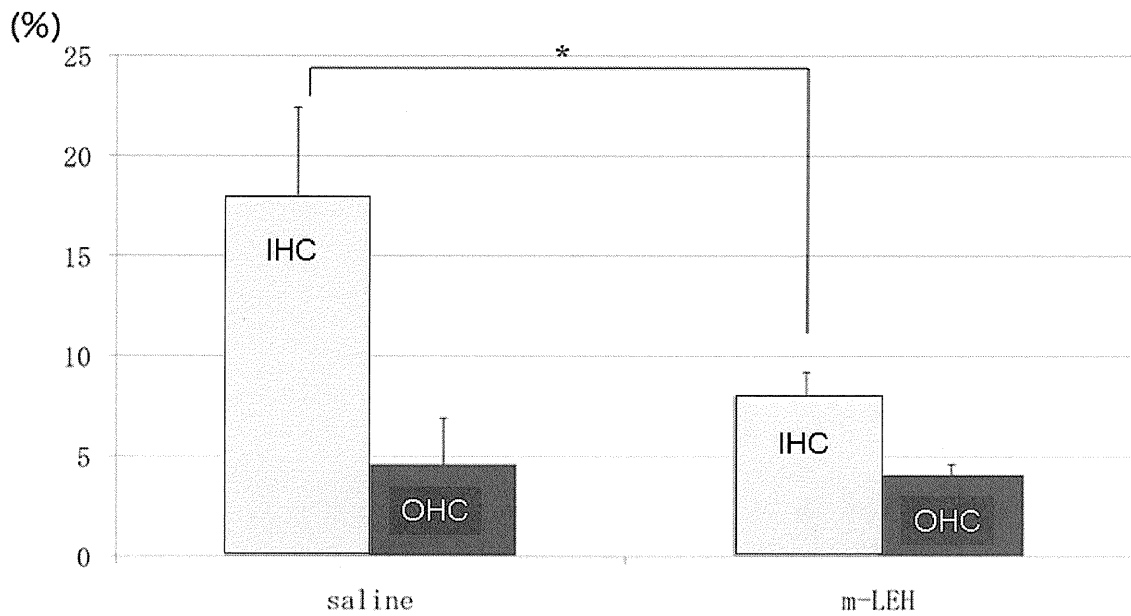
図 1 ABR 閾値の推移

術前の値を 0dB と定義し、その後の値との差(dB)を継時的に求めた。



## 図2 内および外有毛細胞の脱落割合

生食投与では効果はないが、LEH投与により内毛細胞の脱落は有意に軽減された。外毛細胞では保護効果は見られない。(\*:P<0.01)





## プロサポシン由来合成ペプチドによる虚血性内耳障害の防御

分担研究者：暁 清文（愛媛大学耳鼻咽喉科・教授）

共同研究者：寺下健洋（寺下耳鼻咽喉科）

共同研究者：羽藤直人（愛媛大学耳鼻咽喉科・准教授）

共同研究者：白馬伸洋（愛媛大学耳鼻咽喉科・講師）

共同研究者：松田正司（愛媛大学生体機能解析学・教授）

共同研究者：斉藤正一郎（愛媛大学生体機能解析学・講師）

### 研究要旨

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、細胞障害防止や組織再生促進効果を持つ。この研究ではプロサポシン由来合成ペプチド（Prosaposin-derived peptide : PDP）が一過性虚血による内耳障害防御効果を有するかどうかを知る目的で、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  $28.3 \pm 2.6$  dB、4日後が  $37.5 \pm 8.8$  dB、7日後が  $33.3 \pm 16.3$  dB であったが、虚血-PDP 2.0mg/kg 群では1日後が  $15.8 \pm 8.6$  dB、4日後が  $15.0 \pm 3.2$  dB、7日後が  $12.5 \pm 8.2$  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 による内有毛細胞脱落は用量依存性に抑制された。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。

### 研究目的

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、リゾ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。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。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。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。

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。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 錐体細胞の遅発性神経細胞死を抑制することや、坐骨神経切除後の神経再生を促進する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もあり、プロサポシンの神経保護効果を追証している。

この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探索した。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。

## 研究方法

### 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 (LSELIINNATEELLIKGL) を使用した。実験動物は虚血-PDP 0.2mg/kg 群 (n=6)、虚血-2.0mg/kg 群 (n=6)、虚血-生理食塩水 (生食) 群 (n=6) の 3 群に分類し、それ

ぞれ虚血直後および 1、2、3 日後の 4 回にわたり皮下に投与し、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。刺激音は 8kHz のトーンバーストを用い、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 日後に基底回転のコルチ器を採取し、切片を作製して Rhodamine-phalloidin および Hoechst33342 を用いて聴毛や有毛細胞の核を二重染色した。蛍光顕微鏡下に染色標本を観察し、内有毛細胞における生細胞と死細胞の数を計測して脱落率を算出した。

### 5. Bcl-2 の免疫染色

内有毛細胞における Bcl-2 の発現を、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 (BX60, Olympus, Tokyo, Japan) 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PC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、各群間で比較した。

## 研究結果

### 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  $28.3 \pm 2.6$  dB、4 日後が  $37.5 \pm 8.8$  dB、7 日後が  $33.3 \pm 16.3$  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  $15.8 \pm 8.6$  dB、4 日後が  $15.0 \pm 3.2$  dB、7 日後が  $12.5 \pm 8.2$  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は抑制された ( $P < 0.01$ )。

### 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  $1.019 \pm 0.009$  であったのに対し、虚血-PDP 2.0mg/kg 群は  $1.089 \pm 0.029$  であり、PDP 2.0mg/kg 投与により

Bcl-2 の発現は増加した。

## 考察

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、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な意義が高い。

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。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。PDP も FGF-2 と同様のメカニズムで Bcl-2 発現を増加させると考えられる。

## 結論

一過性内耳虚血後に PDP を投与すると、ABR 閾値上昇や内有毛細胞の脱落は防御された。投与効果は濃度依存性で、高濃度ほど有効であった。PDP は虚血が原因の急性難聴の治療薬として有望である。

## 健康危険情報

なし

## 研究報告

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## 知的財産権の出願・登録状況

なし