

内耳障害とフリーラジカル：薬剤による内耳障害治療の可能性

広島大学病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科
診療准教授 工田 昌也

内耳は聴覚・平衡覚を司る器官であり、その障害は難聴、めまいを引き起こす。内耳障害の原因には感染、騒音、耳毒性薬剤、代謝性疾患、遺伝、老化、など、様々なものが挙げられるが、その病態を細胞レベルでみた場合、特に感覚細胞の障害様式については、共通する点が数多く認められる。近年、分子生物学の発展により、内耳の病態について分子レベルでの解明がなされるようになり、内耳の病的変化に活性酸素、一酸化窒素(NO)に代表されるフリーラジカルが関わっていることが示唆されている。これまでに内耳では、正常の状態では、NOが感覚細胞の神経伝達、血流調節、内リンパの恒常性の維持に関与していること、さらに感染などにより過剰のNOが産生された場合にはNOが細胞障害性に働き、病態を惹起することなどが明らかになっており、同様に、活性酸素に関してもNOとの相互作用により内耳障害を引き起こすと考えられている。このような現象は広く難聴、めまいを引き起こす病態に共通したものと推測され、内耳の機能障害とフリーラジカルとの関連を分子生物学的レベルで解析することは現在のところ有効な治療法の少ない難聴、めまいの予防、治療に大きく役立つものと思われる。

内耳障害を来すような病態、例えば、虚血、音響外傷、感染、耳毒性薬剤では、最初にNMDA受容体を介するグルタミン酸誘発ニューロン死が生じる。すなわち神経終末あるいは神経終末近傍からグルタミン酸が大量に遊離され、非NMDA受容体を介してニューロンの持続的脱分極を惹起する。このような持続的脱分極はNMDA受容体を容易に活性化する。過剰に遊離されたグルタミン酸によりNMDA受容体が活性化されると、受容体分子が構成するイオンチャンネルを介して多量の Ca^{2+} が細胞内に流入する。持続的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は種々の Ca^{2+} 依存性酵素を活性化し、その中でも、ニューロンに特異的に存在する典型的な Ca^{2+} 依存性酵素であるNOS Iの活性化により、一時的に大量のNOがニューロンで産生される。

一方、内耳障害の後期には刺激により内耳に誘導型のNOS IIが発現し、より大量のNOを産生するようになる。NOは細胞内外のスーパーオキシドと速やかに反応してパーオキシナイトライトを生成する。パーオキシナイトライトの寿命は非常に短く瞬時に開裂してヒドロキシラジカルを生成する。このような反応により生成されるヒドロキシラジカルは非常に反応性の高いラジカルでありNOの神経毒性の原因物質として想定されており、結果的に周囲の組織を傷害し内耳障害を引き起こす。

このように、フリーラジカルによる内耳障害の発生機構が明らかになったことにより内耳障害の治療、予防のための新しい手段や薬剤の開発が可能となってきた。その手段として具体的には、i) 大量のグルタミン酸遊離の抑制、ii) 大量のNO遊離の抑制としてNOSの阻害、iii) NOS II発現の抑制、iv) NOの消去、v) 活性酸素の遊離抑制、消去、vi) パーオキシナイトライトの消去、などが挙げられる。そこでまず、我々は各種のフリーラジカルを制御することで内

耳障害の予防や治療が可能かどうかについて検討した。実験には LPS 内耳炎モデル、GM 投与モデルを利用し、NOS 阻害剤、活性酸素消去剤、ステロイド、パーオキシナイトライト消去剤であるエブセレンによる内耳障害の予防効果を検討した。その結果、内耳障害動物では蝸牛コルチ器、半規管膨大部稜、平衡斑の感覚細胞に種々の程度の変性を認めたが、これらの形態学的変化は L-NAME、SOD、エブセレン、等の投与により軽減した。また、LPS 投与動物では投与 48 時間後にカロリック反応の有意な低下が認められたが、この反応の低下は L-NAME、デキサメタゾン、SOD、エブセレンにより有意に抑制され、NO・フリーラジカルを制御することで内耳障害の予防や治療が可能となるという仮説が裏付けられた。

次に、治療効果、すなわち、一旦生じた障害に対する治療が可能かどうか、について内耳障害モデルを使用した検討を行った。解析にはラットに *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (PaExoA) を経鼓膜的に中耳腔内に投与し、内耳障害を作製し NOS 阻害剤である L-NAME による治療効果を検討した。その結果、PaExoA を経鼓膜的に中耳腔内に投与した動物では ABR 閾値の上昇が認められるが、PaExoA と L-NAME の同時投与を行ったものではすべての周波数で聴力障害の予防ができた。PaExoA を投与し 1 時間後に L-NAME を投与したものでは、投与 72 時間後には低周波数での聴力障害は予防可能であったが高周波数では聴力閾値の上昇が認められた。投与 2 ヶ月後には ABR 閾値のほぼ完全な回復が認められた。PaExoA 投与 24 時間後に L-NAME を投与したものでは 72 時間後には高周波数での聴力障害が著しく 2 ヶ月後にはすべての周波数で閾値上昇が認められた。このような結果から、少なくとも障害の発生後早期に治療を行うことにより永続的な内耳障害の予防が可能であることが明かとなった。

一方で、近年、neurotrophin が内耳障害の予防・治療に役立つことが報告されているが、その効果とこれまでのフリーラジカル制御による効果との比較ならびに併用効果についての解析を行った。解析にはモルモット摘出卵形嚢ならびに半規管を用い、LIVE/DEAD system を使用し感覚細胞の生存率の観察を行った。薬剤による障害には 2 mg/ml GM を使用し、100 μ M L-NAME、10ng/ml BDNF による障害予防効果を検討した。

その結果、正常では感覚細胞は 8 時間まではほぼ 90%以上の生存が認められるが、GM を添加したものでは感覚細胞の生存率は 4 時間後で $18.5 \pm 22.9\%$ と有意に減少する。この GM による感覚細胞の生存率の低下は L-NAME を添加することで $55.7 \pm 12.0\%$ 、BDNF で $62.6 \pm 20.4\%$ と有意に軽減された。さらに L-NAME と BDNF を同時に併用したものでは感覚細胞の生存率は $91.6 \pm 4.1\%$ と、ほぼ完全に GM による障害を予防することができ、L-NAME、BDNF 単独投与群と比較しても有意に優れた結果で、フリーラジカル(NO)の制御と neurotrophin という異なった作用機序を有する薬剤を併用した結果、それぞれ単独で使用するよりも高い内耳障害の軽減作用を得ることができた。L-NAME と BDNF はそれぞれ単独で内耳障害に対する障害の軽減効果を認められているが、その組み合わせがより有効であったことは実際の臨床応用を考える段階での薬剤の選択に大きな助けになるものと思われた。

これらの基礎的検討をもとに実際の臨床において、その発生機序にフリーラジカルの関与が推定される、シスプラチン(CDDP)難聴、メニエール病、老人性難聴を対象としてフリーラジカ

ルの制御による内耳障害の治療効果を検討した。

CDDP 難聴では CDDP により聴力障害を来たした患者に抗酸化剤であるグルタチオン、活性酸素消去作用を有するレバミピドを投与してその効果を検討した。対象は CDDP 投与により難聴を来たした患者 10 名とし、グルタチオン 300mg/日、レバミピド 300mg/日を 4 週間以上経口投与した。その結果、10 例中 8 例で聴力の改善が認められ、CDDP 難聴に対してグルタチオン、レバミピドによる治療ならびに予防の可能性が示唆された。

メニエール病の治療では、特に難聴、耳鳴の悪化の防止を目的としてレバミピドを投与しその効果を検討した。対象はすでに従来の薬物療法を施行されているコントロール不良のメニエール病患者 10 例とし、レバミピド 300mg/日をそれまでの治療に追加する形で 8 週間以上投与した。その結果、レバミピドによるメニエール病の治療効果は 1 年経過した時点で、めまいは著明改善：5/10、改善：3/10 であり、聴力は改善：5/10 で周波数別に検討してみると 250,500Hz では有意に聴力が改善していた。耳鳴は改善：9/10、能力低下は改善：6/10 であった。これらのことより、メニエール病の治療に抗酸化剤が有効な薬剤となり得る可能性が示唆された。

老人性難聴の治療では、男性 10 例、女性 36 例、計 46 例（92 耳）、年齢は 70～91 歳（平均 76.7 歳）を対象に、レバミピド 300mg/日、ビタミン C 600mg/日を中心に原則として 8 週間以上の投与を行った。その結果、いずれの周波数においても聴力閾値の有意な改善を認めた

これらの臨床的検討によりフリーラジカルの制御を行うことでこれまで治療法の乏しかった内耳障害に対して少なからぬ効果をもたらすことができ、内耳障害の新しい治療法が開発できる可能性が出現した。

これまでの研究で内耳障害とフリーラジカルとの関係に関してはかなりの部分が明かになってきたが、未だ不明な点も多く、さらなる研究が必要である。一方、臨床的には現在のところフリーラジカルを制御する薬剤の多くが実験レベルのもので実際に臨床に応用できるものは数少ない。しかし、今後の研究の進展により現在のところ、発症すれば殆ど治療法のないムンプス難聴、薬剤性難聴、老人性難聴などの予防法、治療法の確立がなされるものと確信する。

略 歴

工田 昌也 (たくみだ まさや)

学歴

昭和	57	年	3	月	広島大学医学部医学科卒業
昭和	60	年	3	月	広島大学大学院医学系研究科博士課程修了
昭和	63	年	5	月	スウェーデン王立カロリンスカ研究所医学部大学院博士課程修了

職歴

昭和	60	年	4	月	広島大学医学部附属病院医員 (耳鼻咽喉科)
昭和	60	年	5	月	広島大学医学部助手 (耳鼻咽喉科)
昭和	61	年	8	月	スウェーデン王立カロリンスカ研究所留学 (耳鼻咽喉科客員研究員)
昭和	63	年	8	月	王立カロリンスカ研究所より帰国 (広島大学医学部助手)
平成	3	年	3	月	広島大学医学部講師 (耳鼻咽喉科)
平成	4	年	9	月	広島大学講師 (医学部附属病院)
平成	5	年	8	月	厚生連広島総合病院耳鼻咽喉科主任部長代理
平成	7	年	4	月	広島大学講師 (医学部附属病院)
平成	14	年	6	月	ウプサラ大学医学部大学院指導教官
平成	18	年	10	月	広島大学病院診療助教授 (併任)
平成	19	年	4	月	広島大学病院診療准教授 (併任)、現在に至る

資格

昭和	60	年	3	月	医学博士の学位授与 (広島大学)
昭和	63	年	5	月	医学博士の学位授与 (スウェーデン王立カロリンスカ研究所)
平成	元	年	6	月	Bárány Society 会員
平成	2	年	4	月	日本耳鼻咽喉科学会認定耳鼻咽喉科専門医
平成	3	年	11	月	日本気管食道科学会認定医
平成	8	年	11	月	日本めまい平衡医学会専門会員
平成	18	年	10	月	日本気管食道科学会認定気管食道科専門医 (咽喉系)
平成	21	年	10	月	日本頭頸部外科学会頭頸部癌専門医制度暫定指導医