

令和元年6月25日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20233

研究課題名(和文)内耳DDSを用いたCMV難聴の治療戦略

研究課題名(英文)Treatment Strategies of CMV hearing loss in inner ear by using the method of DDS

研究代表者

高浪 太郎 (TAKANAMI, TARO)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：20643670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊婦のCMV初感染は高率に聴覚障害が生じるとされる。CMV難聴は進行性難聴や遅発性難聴も存在するため新生児スクリーニング検査で見逃されやすい。たとえ早期診断できたとしても、抗CMV薬であるガンシクロビル長期投与によって骨髄抑制、不妊症、腎機能障害が生じることもあり治療に難渋することが多い。そのため、安全かつ確実な治療法を模索しMCMV難聴モデルマウスを用いて実験を行った。本研究結果では、CMV難聴のコントロールには全身のCMV増殖を抑えることが重要であり、ステロイド鼓室内治療が奏功するケースは内耳性難聴の病態が局所的であり全身病態が悪化していない場合に限定されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CMV難聴を含めた内耳性難聴は治療時期を逸すると困難を極める。血液内耳関門が薬物の内耳への進入を阻み、全身投与した薬剤が内耳に到達する割合が悪いことも一因にある。本研究では内耳疾患の新しい治療戦略を追究し、CMV難聴に対するステロイド鼓室内注入療法が安全かつ有効な治療法となるかどうか検証した。必要な薬物をターゲットとなる臓器に効率よく運搬し、体内の薬物分布を量的・空間的・時間的に制御するドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System, DDS)の研究が進むことによって、将来的に内耳疾患に対する治療法が変わる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Congenital CMV infection is the most common intrauterine infection today. The most of infants with congenital CMV infection will have no clinically apparent symptoms. However, symptomatic and asymptomatic infants may later develop sequelae. The most common sequelae following congenital CMV infection is sensorineural hearing loss. The mechanism by which the virus causes hearing impairment in some children and not others is still not fully understood today. Ganciclovir is used to treat complications of cytomegalovirus infections. The long administration may cause myelosuppression leading to leucopenia, thrombocytopenia, anemia, and renal dysfunction. We examined the effect of intratympanic steroid injection for sudden hearing loss with congenital CMV.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：内耳DDS CMV難聴

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) CMV は健康成人の 70% に不顕性感染している。しかしながら妊婦の CMV 初感染は高率に胎児への先天性 CMV 感染症を引き起こす。その多くが不顕性感染であるが、一部感染児には死産、精神発達障害、聴覚障害が生じるとされる。

(2) CMV 難聴は先天性難聴の原因で GJB2 遺伝子異常について多く、高度感音難聴児の保存臍帯組織において 15% に CMV-DNA が同定されている (Ogawa.H. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. J Infect Dis 2007; 195: 782-788)。CMV 難聴の障害部位はらせん神経節とされ、血管条やらせん靭帯が低形成傾向にあり、内耳感染を契機にコルチ器の形成不全や聴覚伝導路に形成不全を引き起こすとされる。CMV 難聴の進行性難聴や遅発性難聴例の場合には新生児スクリーニング検査で見逃されやすく、不可逆的難聴に陥っているケースも少なくない。また、CMV 難聴はたとえ早期診断ができたとしても抗 CMV 薬の長期投与による骨髄抑制、不妊症、腎機能障害などの有害事象による点も報告されており、治療に難渋するとされる。有害事象軽減は CMV 難聴治療の課題点でもある。

(3) 一般的に CMV 難聴を含めた内耳性難聴の治療が困難なことが多い。内耳における選択的輸送に深くかかわっている血液-内耳関門には、血液-内リンパ関門、血液-外リンパ関門、内リンパ-外リンパ関門がある。血液-内リンパ関門と血液-外リンパ関門は血管を介した内耳への物質輸送を制御し、内耳の恒常性に関与している。これら内耳のバリア機能は内耳障害の治療目的で全身投与された薬剤が内耳に移行する際に大きくかかわっており、薬物の内耳への移行は厳密に制御されている。一方で内リンパ-外リンパ関門は正円窓を介して外リンパ腔に移行し、さらに内リンパ腔へと広がっていく際に関与する。一般的に感音難聴の治療は困難であることが多いが、その背景に全身投与された薬剤の内耳での利用率が低いことや蝸牛内での障害部位を非侵襲的に診断する方法がないことなどの問題による。

2. 研究の目的

近年、鼓室内投与や正円窓を介した薬物局所投与において、必要な量の薬物を必要な時間供給する DDS の応用が、薬物の適正な効果発現・治療効果に大きく貢献することが報告された。急性感音難聴ステロイド無効例に対し、正円窓内にゼラチンハイドロゲルを用いた IGF-1 を投与することで内耳性難聴の改善に有効であり安全性も高いことが示唆されている (Nakagawa.T Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids Otology Neurotology 2012; 33 941-6)。不可逆的難聴を生じていない状況での CMV 難聴を早期診断した際に、薬剤の鼓室内投与、正円窓内投与さらに DDS による徐放効果が有効かつ安全な治療法になるかもしれないと考え、本研究では CMV 難聴に対して、内耳保護効果が期待できる薬剤選定と治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

福島県立医科大学微生物学教室では出生直後に MCMV 脳室内注入を行い、生後 6 週目時点で 90% 難聴を伴う MCMV 難聴モデルマウス作成に成功している。同マウスは生後 4 週目前後に外有毛細胞ミオシン蛋白変性が生じ、不可逆的難聴を伴うとされる。今回、福島県立医科大学微生物学教室において、抗 CMV 薬以外の治療法を模索し内耳 DDS を用いた代替治療が可能かどうかの研究を行った。まずは出生後 24 時間以内のマウスを用いて、MCMV は血清を添加しない D-MEM で調整しケタミンとキシラジンによる全身麻酔下にてマウスの脳内にマイクロシリンジと 2 段針も用いて 3 μ L 接種し、MCMV 難聴動物実験モデルを作製した。投与薬剤として抗 CMV 薬・ステロイド・免疫抑制剤を選択し、それぞれデノシン、デカドロン、プログラフのアンブルを用いた。投与方法は腹腔内と鼓室内投与に分けて治療効果判定は ABR で行った。生後 2 週以内の場合はマウスのサイズが小さく外耳道狭小化しているため、鼓室内投与は施行困難であった。また同一条件下において MCMV 難聴モデルマウス作成したものの、生存率と難聴出現率が各回で変化するため、2016 年度以降は生存率と難聴出現率も測定しながら実施することとなった。

4. 研究成果

(2015 年度) 生直後のマウスに対し MCMV 脳室内注入を行い、MCMV 難聴モデルマウス作成し、抗 CMV 薬以外の代替治療があるかどうか、さらに投与方法に関する研究を行った。生後 1 週目と生後 3 週目の MCMV 感染マウスに抗 CMV 薬・ステロイド・免疫抑制剤を腹腔内または鼓室内投与した上で、生後 6 週目に ABR 評価することによって難聴予防効果があるかどうか検討した。生後 1 週目のマウスは外耳道狭小化しているため鼓室内投与は施行できず、腹腔内投与のみ行った。各種検査結果であるが、生後 1 週目のガンシクロビル腹腔内投与では両側難聴の著明な改善、生後 3 週目のステロイド鼓室内注入ではある一定の割合で投与側難聴の著明な改善、対側難聴の軽度改善を認めた。一方で生後 3 週目のガンシクロビル鼓室内投与では難聴改善には寄与しておらず、免疫抑制剤に関しては腹腔内も鼓室内投与とも致死率が上昇した。

(結論) MCMV 難聴マウスに対するステロイド鼓室内注入療法に関しては、病態不詳ながら外有毛細胞ミオシン蛋白変性が生じる直前(可逆的時期)の有効性が示唆された。また対側難聴の

軽度改善に関しては、耳管経由でステロイド全身移行した可能性が示唆された。また、抗 CMV 薬の全身投与は明らかに難聴改善しており、CMV 難聴のコントロールには全身の CMV 増殖を抑えることが重要であると考えた。一方で抗 CMV 薬の鼓室内投与では難聴改善を認めておらず、抗 CMV 薬は局所治療には関与しないと考えた。また免疫抑制剤投与は易感染状態をきたし病態悪化を生じる点が示唆された。2015 年度の反省点として、生後 2 週以内の場合はマウスのサイズが小さく外耳道狭小化しており、鼓室内投与は施行困難であり、早期治療を実証するためには早くても生後 3 週目の鼓室内投与で治療効果判定をすべきと考えた。また、同一条件下で MCMV 脳室内注入を行っても、MCMV モデルマウスの生存率と難聴出現率が異なり、さらに薬剤投与による治療改善率が変化してくることが分かった。対照試験を行うには MCMV 難聴モデルマウスの生存率と難聴出現率をできる限り統一させなければならないと考えた。

(2016 年度) 生直後のマウスに対し MCMV 脳室内注入を行い、同様に MCMV 難聴モデルマウス作成し、ステロイド群と抗 CMV 薬と Control 群との対照試験を行い比較検討した。生後 8 週目の生存率 90%・難聴出現率 40%のマウス群に対し、6 週時点でステロイドないし抗 CMV 薬の鼓室内投与した際の、投与直前と 8 週目での難聴改善率を検討した。実験結果は以下の通りになった。

ステロイド群

改善傾向ありの耳：7 耳/22 耳
変化なしの耳：11 耳/22 耳
悪化傾向ありの耳：4 耳/22 耳

抗 CMV 薬群

改善傾向ありの耳：3 耳/18 耳
変化なしの耳：9 耳/18 耳
悪化傾向ありの耳：6 耳/18 耳

Control 群

改善傾向ありの耳：1 耳/8 耳
変化なしの耳：2 耳/8 耳
悪化傾向ありの耳：5 耳/8 耳

次に生後 8 週目の生存率 70%・難聴出現率 70%のマウス群に対し、3 週時点でステロイドないしガンシクロビル鼓室内投与した際の、投与直前と 8 週目での難聴改善率を評価した。実験結果は以下の通りになった。

ステロイド群

改善傾向ありの耳：17 耳/34 耳
変化なしの耳：8 耳/34 耳
悪化傾向ありの耳：9 耳/34 耳

抗 CMV 薬群

改善傾向ありの耳：13 耳/28 耳
変化なしの耳：6 耳/28 耳
悪化傾向ありの耳：9 耳/28 耳

Control 群

改善傾向ありの耳：2 耳/12 耳
変化なしの耳：6 耳/12 耳
悪化傾向ありの耳：4 耳/12 耳

(結論) 今回我々が作成した 2 群は、福島医大であらかじめ報告されている先行実験(生後 6 週目時点で 90%難聴を伴う)よりも、難聴出現率が低く、MCMV による内耳障害が軽度のため外有毛細胞ミオシン変性が生じた時期も先行実験より延長した可能性も考えられるが、両群ともステロイドないし抗 CMV 薬の鼓室内投与による治療が、Control 群に比べて、難聴改善率の成績が良く、全身副作用を軽減したサルベージ治療となりうる可能性が示唆された。また生存率・難聴出現率による差があるため直接的な比較はできないが、生後 3 週目時点で治療をした群の難聴改善率の方が 6 週目時点で治療した群よりも相対的に良好であり、早期治療の重要性が示唆された。2015 年度の実験では抗 CMV 薬の鼓室内投与は難聴改善を認めておらず、抗 CMV 薬は局所治療には寄与しないと考えていたが、2016 年度の実験では治療としての有効性を認めた。2016 年度の反省点は鼓室内投与であっても耳管経由で全身移行している可能性もある点や、抗 CMV 薬の全身投与に代わる治療法を模索する研究でもある点を考慮しなければいけないと考えた。次年度はステロイドのみで実験を重ね、投与耳と非投与耳に分けて ABR 精査していくこと

とし、さらに実臨床に近い形で単回投与ではなく連用投与で検討を重ねる方針とした。

(2017年度)生直後のマウスに対しMCMV脳室内注入を行い生後6週目での生存率90%・難聴出現率50%のMCMV進行性難聴モデルマウスを作製し、第3週・5週・7週にステロイド鼓室内連用投与し、生後6週目と10週目での難聴改善率を検討した。実験結果は以下の通りになった。同時に福島県立医大微生物学教室でミオシン変性の有無を評価した。

生後6週目の投与耳のABR
改善傾向ありの耳：8耳/22耳
変化なしの耳：13耳/22耳
悪化傾向ありの耳：1耳/22耳

生後6週目の非投与耳のABR
改善傾向ありの耳：3耳/22耳
変化なしの耳：13耳/22耳
悪化傾向ありの耳：6耳/22耳

生後10週目のABR
生後6週目で改善傾向あり群 25%で難聴悪化
生後6週目で変化なし群 25%で難聴悪化
生後6週目で悪化傾向あり群 100%で難聴悪化

(結論)2017年度の実験結果では、生後6週目時点でのABRにおいて、第3週・第5週のステロイド鼓室内連用投与によって、ある一定の割合で投与耳改善さらに非投与耳にもわずかながら改善を認めた。さらに難聴改善群では外有毛細胞ミオシン変性の障害程度が相対的に軽度だった。一方で、生後10週目時点でのABRでは、第7週にステロイド鼓室内投与を行ったものの再び難聴が悪化するリバウンド現象を認めた。生後10週目では生後6週目に比べて治療奏効率が低下しミオシン変性を強く認めた。2015年度・2016年度では、ステロイド鼓室内治療が外有毛細胞ミオシン変性を抑制し内耳性難聴を改善する可能性があるとして報告したが、2017年度に施行したステロイド鼓室内連用投与の実験結果では、治療によって一時的改善を得られるものの再び難聴が悪化するリバウンド現象を認めた。抗CMV薬によって全身のCMV増殖を抑制することは可能であるが、ステロイド鼓室内投与の場合、一時的に内耳障害の進行を抑えたとしても、再び全身CMV増殖によって、進行性難聴が生じていくと考えられた。すなわちステロイド鼓室内連用投与は内耳の不可逆的変化を抑制しきれない結果に至った。2015年度では生後6週目時点のABR、2016年度では生後8週目時点でのABRで治療効果判断しているため、Control群に比べると相対的に予後良好の結果になっていた可能性がある。CMV難聴におけるステロイド鼓室内治療が奏功するケースは、内耳性難聴の病態が局所的であり全身病態が悪化していない場合に限定されると考えられた。

<引用文献>

Ogawa.H. Etiology of severe sensorineural hearing loss in children: independent impact of congenital cytomegalovirus infection and GJB2 mutations. J Infect Dis2007; 195:782-788

Nakagawa.T Audiometric outcomes of topical IGF1 treatment for sudden deafness refractory to systemic steroids Otology Neurotology 2012; 33 941-6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takanami. T Ota. Y Suzuki. M

Pterygopalatine fossa metastasis with severe trigeminal neuralgia from neuroendocrine carcinoma of the breast. Auris Nasus Larynx 2017Feb;44(1):131-133

(査読有) 10.1016/j.anl.2016.04.011

〔学会発表〕(計 3 件)

演題名：小児進行性難聴に対する鼓室内ステロイド治療の有効性

著者名/発表者名：坂田英明・高浪太郎・岡田岳歩

学会名：第12回小児耳鼻咽喉科学会、宇都宮、2017年

演題名：先天性CMV感染症による遅発性難聴の発症因子に関する検討

著者名/発表者名：高浪太郎・岡田岳歩・大石勉・坂田英明

学会名：第 11 回小児耳鼻咽喉科学会、徳島、2016 年

演題名：先天性サイトメガロウイルス感染症により治療が奏功した症例の検討

著者名/発表者名：岡田岳歩・坂田英明・高浪太郎・大石勉

学会名：第 11 回小児耳鼻咽喉科学会、徳島、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。