

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22659308

研究課題名（和文） 虚血機序に基づく内耳障害の治療戦略—ナノカプセル型人工酸素運搬体の検討

研究課題名（英文） Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates inner ear damage after transient cochlear ischemia in the gerbil

研究代表者

暁 清文 (Gyo Kiyofumi)

愛媛大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00108383

研究成果の概要（和文）：

突発性難聴の新規治療法を探索する目的で、ナノカプセル型人工酸素運搬体 (LEH) による虚血性内耳障害の防御効果を実験動物で検討した。その結果、高酸素親和性 LEH、低酸素親和性 LEH、赤血球、生食の順で、ABR 閾値上昇や内有毛細胞脱落が軽減された。LEH は直径約  $0.2 \mu\text{m}$  の顆粒状に精製されており、赤血球が到達できない末梢にまで酸素を供給できることから、高気圧酸素療法に置き換わる治療薬になりうる。

研究成果の概要（英文）：

To test liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) in transient cochlear ischemia/reperfusion as a model of sudden deafness, Mongolian gerbils were randomly assigned to receive 2 mL/kg of either low-affinity LEH (l-LEH, P5002 = 40 mm Hg), high-affinity LEH (h-LEH, P5002 = 10 mm Hg), homologous red blood cells (RBCs), or saline (each group  $n = 6$ ) 30 min before 15-min occlusion of the bilateral vertebral arteries and reperfusion. As a result, h-LEH was significantly more protective than l-LEH in suppressing hearing loss, in contrast to RBC or saline treatment. The results suggested that pretreatment with h-LEH is significantly more protective than l-LEH in mitigating hearing loss and underlying pathological damage, in contrast to transfusion or saline infusion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,400,000	300,000	2,700,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：突発性難聴、内耳虚血、人工赤血球、h-LEH、l-LEH、スナネズミ

## 1. 研究開始当初の背景

突発性難聴の原因は未だ不明であるが、「ある日、突然発症する」という特徴からその病態に循環障害が関与すると推察される。治療にはステロイドとともに高気圧酸素療法が有効とされるが、高気圧酸素療法には大規模な装置と操作する人員が必要であり、実施可能な施設は限られる。

人工酸素運搬体は、酸素を末梢組織に運ぶという赤血球の機能を代行する合成物質である。本邦で開発されたナノカプセル型人工酸素運搬体である LEH(liposome enveloped hemoglobin)はヘモグロビンをリポソーム膜内に封入したもので、構造や代謝経路が赤血球に類似していることから、生体内での安定性は極めて高い。これまでの基礎研究で、脳梗塞や心筋梗塞の障害防御、創傷治癒促進、癌細胞の放射線感受性増強などの効果が証明されており、新しい原理の治療薬として期待されている(図1)。

我々は突発性難聴治療の鍵は虚血障害の防御・再生にあると考え、一貫してこの課題の研究を進めてきた。末梢細胞にまで酸素を運搬・供給するという斬新な発想は、これまでの虚血障害プロセスの遮断に主眼をおいた研究とは視点が異なり、不足する酸素を積極的に供給して治癒促進を図るというもので、突発性難聴の治療戦略構築におけるブレイクスルーとなりうる。

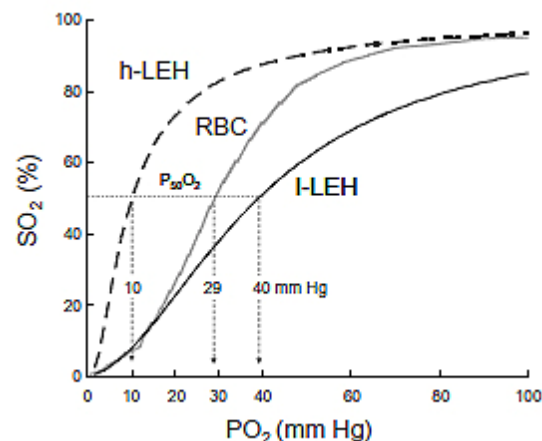


図1 h-LEH と l-LEH の酸素結合能。h-LEH は赤血球 (RBC) よりも酸素濃度が低いところで酸素結合能が高く、虚血部位に多くの酸素を供給することができる。

## 2. 研究の目的

一過性内耳虚血を惹起した動物モデルを用いて1) ナノカプセル型人工酸素運搬体 LEH の酸素親和性と障害防御効果、2) LEH の至適容量、3) therapeutic time window を有効にするための LEH の至適投与タイミング、など LEH の内耳虚血障害に対する防御効果を pilot study として検証し、ナノカプセル型人工酸素運搬体 LEH の臨床応用の可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

実験動物には同一系列のスナネズミ (12~16 週齢) を用いた。スナネズミは Willis 動脈輪の後交通動脈がなく前脳と後脳の動脈支配が独立しているため、頸部で両側

椎骨動脈を遮断することにより、開頭せずに内耳虚血を惹起することができる。

全身麻酔を施し、両側の椎骨動脈を頸部で露出、絹糸を用いて 15 分間、血流を遮断した(図 2)。血流再開の直前に下記のいずれかの処置を加え、①24 時間後の行動評価、②1, 4, 7 日目の ABR による聴力測定、③7 日目の組織学的評価を行った。なお、薬剤の投与には微量注入器を用い、大腿静脈より 0.1ml/min のスピードで静注した。投与した薬剤の種類、投与量は下記のとおりである。

- 1) 高酸素親和性 LEH( $P_{50}=10\text{mmHg}$ ), h-LEH 2ml/kg
- 2) 低酸素親和性 LEH( $P_{50}=45\text{mmHg}$ ), l-LEH 2ml/kg
- 3) 洗浄同種赤血球, Washed RBC 2ml/kg
- 4) 生理食塩水, saline=vehicle 2ml/kg

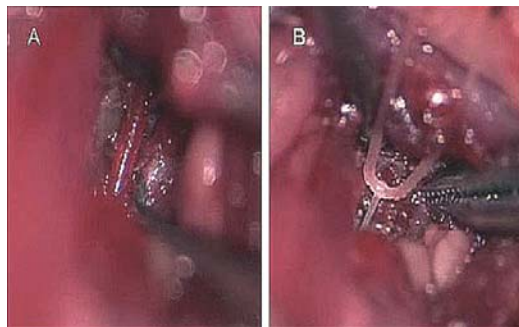


図 2 A. 椎骨動脈の同定、B. 両側の椎骨動脈に糸をかけ牽引する。これで脳底動脈の分枝である迷路動脈の血流が遮断される。

#### (1) 聴力の評価

操作終了後、動物を動物飼育室に戻して飼育を続行した。翌日、4日後、7日後に動物を実験室に戻し、ketamine (50 mg/kg) と xylazine (1 mg/kg)を筋注して麻酔を施し、

聴性脳幹反応(auditory brainstem response, ABR)の測定を行った。検査には8、16、32kHzのtone burst音を用い、5dBステップで測定を行い、加算回数は1000回とした。

#### (2) 組織学的評価

虚血 7 日目の ABR 測定に引き続き、動物を深麻酔にかけて断頭し、側頭骨から耳胞を取り出した。4%パラホルム・アレデヒドにて固定後、surface preparation 法によって顕微鏡下にコルチ器を採取した。虚血による内耳障害が最も顕著な基底回転を摘出し、Rhodamine-phalloidin と Hoechst33342 を用いて二重染色を施し、これを蛍光顕微鏡下に観察、内外有毛細胞の脱落細胞の割合を計測した。

なお、統計学的検討には Mann-Whitney U 検定を用い、 $p < 0.05$  を有意差ありと判定した。

#### 4. 研究成果

虚血前の ABR 閾値を 0 として、h-LEH, l-LEH, 同種赤血球、生食群における一過性虚血後、1、4、7 日目の ABR 閾値の変化を図 3 に示す。

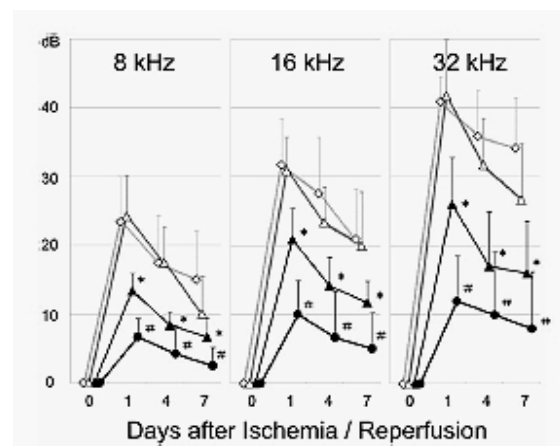


図 3 虚血前後の 8kHz, 16kHz, 32kHz における ABR 閾値の変化

○-○ : h-LEH、△-△ : l-LEH、▲-▲ : RBC、  
●-● : 生食

8, 16, 32kHz のすべての周波数において赤血球群の ABR 閾値は生食群との比較で差は見られなかったが、h-LEH や l-LEH 投与群では閾値上昇は有意に抑制された。h-LEH と l-LEH との比較では、前者の方が後者よりも ABR 閾値上昇を抑制する効果は大きかった。

組織学的変化の指標には一過性内耳虚血で典型的に見られる内有毛細胞の脱落率を用いた。虚血 7 日後における h-LEH、l-LEH、同種赤血球、生食群の代表例の内耳所見を図 4 に示す。生食群と赤血球群では内有毛細胞の核消失や聴毛の脱落が散見された。これに比べ、h-LEH や l-LEH 投与群では内有毛細胞の脱落は少なかった (図 4)。

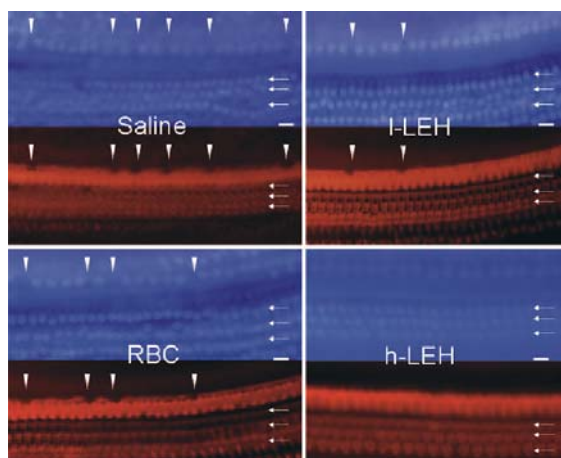


図 4 Hoechst33342 染色 (上段、青色) と Rhodamine-phalloidin 染色 (下段、赤色) の有毛細胞所見。矢印は脱落した細胞

内有毛細胞の脱落率を計測したところ、赤血球群は 15.0+2.2%、生食群は 14.5+2.5%であった。一方、h-LEH や l-LEH を投与した

群では脱落率は極めて少なく、h-LEH 群で 3.7+1.2%、l-LEH 群では 6.5+1.2%であった。

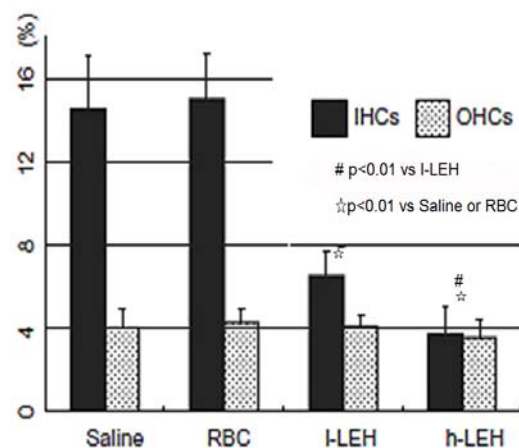


図 5 内有毛細胞(inner hair cell, IHC)と外有毛細胞(outer hair cell, OHC)の脱落率

このように両者を比較すると、h-LEH 群の方が有意に脱落抑制効果は強力であった (図 5)。

以上の結果から、一過性内耳虚血による障害は h-LEH、l-LEH、同種赤血球、生食の順で軽微であり、LEH、とりわけ h-LEH は有力な突発性難聴の治療薬になりうる可能性が示された。なお、h-LEH、l-LEH の投与によると思われる副作用は認められなかった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ①. 白馬伸洋、岡田昌浩、暁 清文。急性感音難聴における新規治療の可能性：人工酸素運搬。JOHNS 28, 5, 807-810, 2012、査読なし

② Okada M, Kawaguchi AT, Hakuba N, Takeda S, Hyodo J, Imai K, Hato N, Gyo K. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia and reperfusion in the gerbil. *Artif Organs*. 2012;36(2):178-84. 査読あり

[学会発表] (計6件)

① Okada M, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia and reperfusion. 第18回日本血液代替物学会年次総会 (平成23年10月27-28日、札幌)

② Okada M, et al. Liposome-encapsulated hemoglobin alleviates hearing loss after transient cochlear ischemia and reperfusion. 47<sup>th</sup> Inner Ear Biology Workshop, 2012, August29-September1, Praha, Czech Republic.

③ 暁 清文. 突発性難聴の病態別治療は可能か? 平成24年度 慶耳会学術講演会 (招待講演) (平成24年5月19日、東京)

④ 岡田昌浩、白馬伸洋、羽藤直人、暁 清文、川口 章. 内耳虚血・循環障害に対する人工酸素運搬体の有用性。第29回頭頸部自律神経研究会 (平成23年8月27日、大阪市)

⑤ 暁 清文. 虚血性内耳病変の発症機序と臨床。日耳鼻広島県地方部会学術講演会 (招待講演) (平成23年4月11日、広島)

⑥ 岡田昌浩、竹田将一郎、白馬伸洋、羽藤直人、暁 清文、兵藤 純、川口 章.

内耳虚血・循環障害に対する人工酸素運搬体の有用性の検討。愛媛大学大学院医学専攻研究発表会 (平成23年3月4日、東温市)

[図書] (計1件)

1) 岡田昌浩、暁 清文

突発性難聴。よくわかる聴覚障害—難聴と耳鳴のすべて  
pp137-147, 2010、永井書店

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

暁 清文 (Gyo Kiyofumi)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：00108383

(2) 研究分担者

羽藤 直人 (Hato Naohito)  
愛媛大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：60284410

白馬 伸洋 (Hakuba Nobuhiro)  
愛媛大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：70304623

(2) 連携研究者

川口 章 (Kawaguchi Akira)  
東海大学・医学部・胸部外科・教授  
研究者番号：30195052