

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791214

研究課題名（和文） 骨形成因子阻害剤の投与による髄膜炎後蝸牛骨化の予防

研究課題名（英文） Prevention of the cochlea ossification after the meningitis, using the osteogenic factor inhibitor.

研究代表者

増田 聖子 (MASUDA MASAKO)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70346998

研究成果の概要：

細菌性髄膜炎の重篤な後遺症として両側高度感音性難聴がある。有効な治療法は確立されておらず、髄膜炎後におこる蝸牛骨化のため、人工内耳埋め込み術も難しい場合が多い。

本研究にて、Lipopolysaccharide を髄腔内に投与することにより、新しいモルモットの髄膜炎後難聴・蝸牛骨化モデルを作成した。また骨形成因子阻害剤である Noggin を正常ラットおよびモルモットに投与してその蝸牛形態や聴力に影響を与えないことを確認した。今後は蝸牛骨化モデル動物に Noggin を投与して、蝸牛骨化を抑制できるかどうか、検討を行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：医歯薬系

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：髄膜炎、内耳障害、蝸牛骨化、Noggin

## 1. 研究開始当初の背景

細菌性髄膜炎の重篤な後遺症として両側高度感音性難聴がある。現在多くの両側高度難聴例では人工内耳埋め込み術により聴力を獲得することが可能である。人工内耳は電極を蝸牛鼓室階に挿入し、ラセン神経節細胞に電気刺激を与えることにより音を感知させるシステムであるため、蝸牛外リンパ腔に電極挿入のための十分なスペースがある症例が手術のよい適応となる。しかし髄膜炎後の難聴症例は髄膜炎罹患後に蝸牛リンパ腔の線維化および骨化による閉塞が急速に進行するため、人工内耳埋め込み手術時には電極の挿入スペースがなくなり、電極の挿入が非常に困難となる。そのため現在高度感音性難聴に対する唯一の治療法である人工内耳は、髄膜炎後聾症例に対しては手術適応とならないこともある。

申請者はこのような髄膜炎後に生じる蝸牛線維化および骨化を抑制する方法の開発を目的とし、平成 17～18 年度に科学研究費若手研究 B「Smad7 遺伝子の蝸牛への導入による細菌性髄膜炎後の蝸牛骨化の予防」を受けて、現在その研究に従事している。これまでに新しい髄膜炎モデル動物を作成し、その聴覚機能評価と内耳の組織学的評価を行ってきた。しかし内耳の遺伝子治療は、倫理的問題やウイルスベクターの安全性の問題などから、臨床応用が難しいと考えられる。

そのため今回は臨床応用が比較的容易であると思われる方法を検討することにした。骨形成因子 BMP の阻害剤の

ひとつである Noggin を用いる方法である。Noggin は分子量の小さいタンパク質であり、また複数ある BMP 阻害剤の中でも BMP に比較的特異的に働くため、実験に用いやすいという利点がある。

## 2. 研究の目的

髄膜炎後に生じる蝸牛骨化を抑制する方法の開発を目的とする。

正常内耳組織における Noggin 投与の影響の有無について確認し、安全な投与法を確立する。髄膜炎モデル動物の蝸牛に Noggin を投与し、蝸牛骨化が抑制されるか組織学的に検討する。

## 3. 研究の方法

### 安全なNoggin投与法の確立

Nogginは強力なBMP阻害作用を持ち、ニワトリの内耳器官形成時期（胎生期）に投与すると、内耳の形態変化をもたらすことが確認されている。またNogginは四肢や関節、頭蓋骨などの骨・軟骨器官形態形成に影響を及ぼすことが知られている。しかし成熟動物に対して骨増殖抑制を目的にNogginを投与した研究はほとんど行われておらず、基礎データに乏しい。そのためまずNogginの安全な投与法を確立し、正常な成熟ラットの蝸牛にNogginを投与した場合に聴力、内耳形態に異常所見が現れないことを確認することにした。

Wistar系ラット7週齢を麻酔後、ABRにて聴力が正常であることを確認する。その後右耳後部を切開し、耳骨胞にドリルで小孔をあける。正円窓を確認して、Mouse Jugular Catheter (Alzet) を挿入し、開窓部は

結合組織で閉鎖する。カテーテルは骨胞にデンタルセメントで固定し、Osmotic mini pump (Alzet) にRecombinant Mouse Noggin (R&D Systems)を充填させたものを背部に留置し、カテーテルと接続させる。Nogginの投与法は10、30、100 µg/mL、0.5 µL/時間、2週間の持続投与とする。1週間後に一部ラットの右内耳を摘出し、内耳凍結切片を作製して、抗リン酸化Smad1/5/8抗体で免疫染色を行い、Nogginの作用発現 (BMPシグナル伝達系が阻害されていること)を確認する。

Noggin投与開始から2週間、1ヶ月、3ヵ月後にABRにて聴力閾値を測定後、内耳を摘出し、まず実体顕微鏡下に観察し、形態的異常がないかを確認する。固定、脱灰に続いてJB-4包埋、ウルトラミクロトーム (申請備品)を用いて切片を作製、HE染色を行い、組織学的異常がないかを調べる。この実験ではカテーテル挿入による聴力低下、組織学的変化も予想されるため、コントロール動物には人工脳脊髄液を充填したosmotic mini pumpを留置し、2週間、1ヶ月、3ヵ月後に同様の聴力測定、組織学的解析 (HE染色)を行う。

以上の実験から聴力や内耳組織に極力影響を及ぼさないラット蝸牛外リンパ腔への薬物投与手技を確立し、有効なNogginの投与量を決定する。

#### 髄膜炎モデル動物に対するNogginの投与および聴力、組織学的解析

平成18年度までの研究で確立したLPS髄腔内投与による髄膜炎後難聴モデルラットにNogginの投与を行い、蝸牛骨化に対する抑制作用がみられるかどうかを確認する。

Wistar系ラット7週齢を麻醉後、ABRにて聴

力閾値を測定する。その後、ラット頭部を脳定位固定装置に固定し、27G針を大槽内に刺入して、髄液が吸引されることを確認する。直ちに*E. Coli*由来のLPS(25mg/mL)10 µLをゆっくりと注入する。ラットの痙攣様症状および髄液内の白血球増加により髄膜炎の発症を確認する。1週間後にABRにて聴力閾値を測定し、処置前と比較して聴力閾値が20dB以上上昇したものをモデル動物として次の実験に使用する。

LPS注入2、4、8週間後に、前年度に確立した方法で正円窓 (右)よりNogginを注入する。濃度と速度については、前年度の研究結果を参考にして決定する。コントロール動物には前年度と同様に正円窓 (右)より人工脳脊髄液を同量注入する。Nogginの作用発現も前年度と同様の方法で確認する。投与終了1、2、4週間後にABRにて聴力閾値を測定し、その後内耳を摘出する。固定、脱灰、JB-4包埋を行い、ミクロトームにて切片を作製して、HE染色を行い、Noggin注入ラットとコントロールラットの組織学的な違いを検討する。

#### 4. 研究成果

(平成19年度)

今年度はラット蝸牛に対してNogginが与える影響の有無と、Noggin投与の指摘濃度を決定するための実験を行った。Wistar系ラット7週齢を麻醉後、ABR (トーンバースト、4000Hz, 16000Hz)にて聴力域値正常 (40dBで波形が確認される)ものを実験に使用した。その後右耳後部を切開し、耳骨胞

にドリルで小孔をあけた。正円窓を確認して、カテーテルを挿入し、開窓部は結合組織で閉鎖した。カテーテルは骨胞にデンタルセメントで固定し、Osmotic mini pump (Alzet) にRecombinant Mouse Noggin (R&D Systems)を充填させたものを背部に留置し、カテーテルと接続させた。Nogginの投与法は10、30、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{L}/\text{時間}$ 、2週間の持続投与とした。

カテーテル挿入し、蝸牛にnogginを持続注入させる手技がまだ安定しておらず、聴力が低下するもの、この操作により蝸牛骨化がみられるものがまだみられる。一部のラットでは蝸牛の形態変化を伴わず、聴力も低下しない所見が得られたが、この先の実験に使用できるほど安定しないため、動物をモルモットに変更し、同様の手技での実験を試みているところである。モルモットでは蝸牛にカテーテルを挿入する手技がラットよりはるかにやりやすく、今後予定していた実験をモルモットでもやっていく予定である。ただしモルモットの髄膜炎モデルはこれまで作っていなかったため、今回はモルモット蝸牛に直接LPSを注入し、蝸牛骨化を試みる実験も始めている。

(平成20年度)

今年度はモルモット蝸牛に対してNogginが与える影響の有無と、Noggin投与の指摘濃度を決定するための実験を行った。Hartley系モルモット8週齢を麻酔後、ABR (トーンバースト、4000Hz, 16000Hz) にて聴力域値正常 (40dBで波形が確認される) ものを実験に使用した。その後右耳後部を切開し、耳骨胞にドリルで小孔をあけた。正円窓を確認して、カテーテルを挿入し、

開窓部は結合組織で閉鎖した。カテーテルは骨胞にデンタルセメントで固定し、Osmotic mini pump (Alzet) にRecombinant Mouse Noggin (R&D Systems)を充填させたものを背部に留置し、カテーテルと接続させた。Nogginの投与法は10、30、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{L}/\text{時間}$ 、2週間の持続投与とした。

モルモットは前年度のラットと比較して、蝸牛内にカテーテル挿入し、nogginを持続注入させる手技は容易であった。Nogginによる聴力の低下はほとんどみられなかった。また内耳に形態学的な変化もみられなかった。またモルモットの髄膜炎モデルはこれまで作っていなかったため、今回はモルモット蝸牛に直接LPSを注入し、蝸牛骨化を試みる実験を行った。約30%の動物で蝸牛の骨化がみられた。

## 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)

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 聖子 (MASUDA MASAKO)  
熊本大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：70346998

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし