シリーズ教育講座「末梢前庭器から前庭神経核へー最近の知見ー」

2. 末梢前庭器障害におけるフリーラジカル

工田 昌矢

Free Radicals and Peripheral Vestibular Disorders

Masaya Takumida

Department of Otolaryngology, Hiroshima University School of Medicine

In the past years significant advances have been made in our understanding of the functional significance of free radicals in the inner ear. This localization of free radical production sites has now been established by immunohistochemistry and the fluorescent indicator of NO and ROS. Increasing evidence suggests that excessive free radical production may play an essential role in vestibular disorders. Based on the mechanisms of inner ear disorders, new pharmacological strategies for preventing and/or treating vestibular disorders have been also suggested.

Key words: inner ear, nitric oxide, reactive oxygen species, pathology, Meniere's disease

目 次

1. はじめに
2. 前庭器でのフリーラジカル (NO, ROS) の産生
 - 2.1. フリーラジカル産生の間接的 (免疫組織学的) 検討
 - 2.2. フリーラジカル産生の直接的検討
3. フリーラジカルによる末梢前庭器障害
4. フリーラジカルによる前庭器障害のメカニズム
5. フリーラジカル制御による前庭器障害の治療
6. フリーラジカル制御剤の臨床応用への可能性

1. はじめに

前庭器は平衡覚を司る器官であり、その障害はめまいの原因となる。前庭器障害の原因には感染、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、各種生物学的分野において活性酸素種 (ROS)、一酸化窒素 (NO) に代表される、いわゆるフリーラジカルの病態への関連が注目されるようになり、前庭器の病的変化にもフリーラジカルが関わっていることが示唆されている^{1)~6)}。これまで、前庭器では 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、感染などにより NO が過剰産生された場合には細胞障害性に働き病態を惹起することなどが示唆されている⁴⁾。同様に ROS に関してもヒドロキシルラジカル (OH・) などは極めて組織障害性が強く、内耳でも障害を起こすことがよく知られている⁵⁾。加えて、アミノ配糖体、シスプラチン、騒音などによる内耳障害は ROS スカベンジャーにより軽減されることが明らかになっていることなどから⁴⁾⁶⁾、NO と ROS は各々単独に、あるいは両者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めまいを引き起

こす病態に共通したものと推測され、前庭器の機能障害と NO, ROS 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めまいの予防、治療に大きく役立つものと思われる。本稿では末梢前庭器障害におけるフリーラジカルの関わりを NO, ROS との関連から述べるとともに、めまいの新たな治療法の可能性についても言及する。

2. 前庭器でのフリーラジカル (NO, ROS) の産生

前庭器での NO, ROS の産生様式の検討には大きく分けて2つの方法がある。1つは間接的方法で、一酸化窒素合成酵素 (NOS) やキサンチンオキシダーゼ (XO) などの存在部位を組織化学的、免疫組織学的に検討するもので、もう1つは細胞や組織での NO や ROS の産生を直接的に検出する方法である。これまでの研究から内耳では様々な条件下で NO, ROS が発生することが明らかになってきている。

2.1. フリーラジカル産生の間接的 (免疫組織学的) 検討

正常動物あるいはモルモットのリポポリサッカライド (LPS) 内耳炎モデル、ゲンタマイシン (GM) 投与モデルなどの各種の障害モデル動物を利用して、内耳における NO, スーパーオキシド、パーオキシナイトライトなどの生成様式が抗 NOS I, II, III 抗体、抗 XO 抗体、抗ニトロチロシン抗体などを用いて免疫組織学的に解析されている。

正常動物の前庭器では半規管膨大部稜、卵形嚢斑、球形嚢斑の感覚上皮で I 型および II 型感覚細胞の細胞質で強い NOS I, III の活性が認められる。神経杯では一般に NOS 活性は認められず、神経線維では一部で弱い活性が認められる他は、通常、陰性である。前庭神経節では神経節細胞の細胞質や神経線維で NOS I, III が認められる。支持細胞には NOS は認められず、前庭暗細胞、移行上皮、半月状面の細胞では弱～中等度の NOS 活性が細胞質に認められ、上皮結合組織では主として血管周囲に NOS III の活性が認められる^{7)~9)}。

一方、正常動物では、誘導型の NOS II は内耳のいずれの部位にも認められない。一般に、NOS II は通常は細胞内に発現していないが、ほとんどすべての細胞で LPS やインターフェロン γ 、イ

ンターロイキン 1, TNF- α などの炎症性サイトカインの刺激により誘導される^{1)~3)}。これらのことより、内耳障害を引き起こすような病態の下では内耳でも NOS II が誘導されるのではないかとの仮説のもとに、我々はモルモットの中耳腔内に経鼓膜的に LPS を投与し、内耳での NOS II の発現を検討した。その結果、一定の条件下では内耳でも NOS II が誘導されることを初めて明らかにすることができた¹⁰⁾¹¹⁾。

我々の検討では、正常コントロール動物および傷害作製後6時間まではコルチ器、末梢前庭器、前庭神経節、内リンパ嚢とともに、NOS II, XO, ニトロチロシンに対する反応は認められなかったが、それ以降になると LPS や GM による内耳障害モデル動物ではコルチ器、半規管膨大部稜、平衡斑の感覚細胞に種々の程度の変性ととともに、コルチ器の内、外有毛細胞、内、外有毛細胞下部の神経や神経終末、支持細胞であるダイテルス細胞やヘンゼン細胞、血管条などで NOS II に対する反応が認められた。前庭器では半規管膨大部稜、平衡斑の感覚細胞細胞質に NOS II の発現が認められ、この反応は特に細胞質に空胞を有する細胞で著明であった。また、暗細胞、移行上皮細胞、前庭神経節、内リンパ嚢上皮細胞においても細胞質に中等度の活性が認められるようになった。さらに NOS II の発現部位に一致して XO, ニトロチロシンに対する反応が認められ、同部位で NO, ROS が産生されていること、NO とスーパーオキシドが反応してより反応に富むパーオキシナイトライトが生じていることが明らかとなった。これ以後、同様の報告が相次ぎ、LPS^{10)~12)}, GM¹³⁾, シスプラチン¹⁴⁾ の投与や、内リンパ水腫¹⁵⁾¹⁶⁾, 加齢¹⁷⁾ などの種々の病態下で内耳の様々な部位で NOS II が誘導されることが明らかになり、内耳障害の発現には原因のいかに関わらず NO, ROS が大きく関与していることが明らかとなった。

2.2. フリーラジカル産生の直接的検討

前庭器での NO, ROS 産生の直接的検出について、NO の産生は DAF-2DA, ROS の産生は DHTMRos などの蛍光指示薬を用いることで可能となり、両者を一緒に用いれば NO と ROS の同時検出ができる¹⁸⁾。これらのことを応用して、GM 刺激による NO と ROS の発生を検討した結

果, GM 刺激により内耳では免疫組織学的結果に一致した部位で NO, ROS の産生が認められることが確認されている。同様に他の障害刺激での検討でも, シスプラチン, LPS, 内リンパ水腫, グルタミン酸, NMDA, AMPA などにより内耳で NO, ROS が産生されることが明らかとなっている⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾。さらに NO と各種病態との関連について, 正常動物の内耳では NO は主として構成型の NOS (NOS I, NOS III) により産生されているが内耳障害時, 例えば耳毒性薬剤, 虚血・再灌流, 音響障害などの病的刺激に際しては最初に構成型 NOS (cNOS) からの多量の NO の産生が起これ, これが exitotoxicity などの早期の内耳障害に関係していること, 引き続いて, NOS II が誘導され, 正常動物に比べて有意に多量の NO が産生され, さらに高度な内耳障害を引き起こすことがわかってきている¹⁹⁾²⁰⁾。

また, *in vitro* の検討で, すでに *in vivo* の実験で内耳障害予防効果が認められている NOS 阻害剤の L-NAME, radical scavenger の D-methionine, エダラボン, ニューロトロフィンである BDNF などはフリーラジカルの産生を抑制することが明らかとなっている。さらに, NO 産生の抑制は ROS の産生に影響しないものの, ROS の消去は NO の産生を亢進させることが示されている。この理由として, NO は活性酸素と短時間に反応し, より毒性の強いパーオキシナイトライトが作られることが知られており, ROS が D-methionine や BDNF により減少したため NO の消去が行われず結果として NO の産生が亢進したものと考えられている。また, BDNF も ROS の産生を抑制することが明らかになっているが同様の作用はシスプラチンによる ROS の産生でも確認されており, BDNF の内耳障害軽減作用の一部はフリーラジカルの抑制によるものであることが確認されている²¹⁾。

3. フリーラジカルによる末梢前庭器障害

近年, 各種の内耳障害がフリーラジカルの産生を制御あるいは消去することにより軽減されることからフリーラジカルが内耳障害性に働くことが示唆されている。例えば, *S. pneumoniae* から抽出された毒素である pneumolysin を用いた一連の実験では pneumolysin は蝸牛に対する毒性を有し, この蝸牛毒性は NOS の阻害剤である N^G-methyl-

L-arginine により軽減されることが報告されている。また NO 供与体である S-nitroso-N-acetylpenicillamine の鼓室階灌流により CAP, CM の低下と感覚細胞, 支持細胞の障害が惹起されるが, NO 放出を阻害する L-methyl arginine やスーパーオキシド消去剤である superoxide dismutase (SOD) を前投与することによりこれらの障害が有意に抑制されることなどから, NO の過剰産生が蝸牛障害を引き起こす要因となるとともに NO とスーパーオキシドとの反応が耳毒性に強く関連していると考えられている²²⁾²³⁾。ROS に関していえば虚血・再灌流障害, アミノ配糖体, シスプラチン投与による内耳障害, 騒音による障害などはいずれも, マンニトールなどの ROS のスカベンジャーにより軽減されることが明らかになっており⁵⁾, 前庭器においても強力な ROS スカベンジャーであるエダラボンで前庭障害が軽減することが知られている²⁴⁾。

末梢前庭器障害とフリーラジカルとの関係を明らかにするために, 我々は, LPS や GM の鼓室内投与により内耳障害モデルを作製し, NOS 阻害剤, 活性酸素消去剤, ステロイド, および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前庭器障害予防効果を検討した。NO 合成阻害剤は L-NAME を障害作製と同時に 1 mg 中耳腔内に投与。NOS II の発現を mRNA レベルで阻害するとされているステロイドはデキサメタゾン 1 mg/kg を障害作製 2 時間前に筋注。活性酸素消去剤は SOD 3000 IU を中耳腔内に投与。エブセレンは 100 mg/kg を障害作製直前と 24 時間後に経口投与した。前庭器障害の予防効果の判定のためには薬剤投与前, および投与終了後 48 時間で前庭器障害の程度を形態学的に光顕, 走査電顕で観察するとともに, カロリックテストを行い眼振持続時間を測定した。その結果, 内耳障害動物では蝸牛コルチ器, 半規管膨大部後, 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, エブセレンなどの投与により軽減した。また, 障害動物では投与 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, ROS が前庭器障害に強く関連しているという仮説を裏付けるものとなった⁶⁾²⁵⁾。

4. フリーラジカルによる前庭器障害のメカニズム

これまでの知見をまとめると、前庭器障害を来たすような病態、例えば、虚血、感染、耳毒性薬剤などは、最初は末梢前庭器で NMDA 受容体を介するグルタミン酸誘発ニューロン死を引き起こす。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 NOSII 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⁶⁾(図 1)。

5. フリーラジカル制御による前庭器障害の治療

フリーラジカルを介した前庭器障害の発生機構が明らかになったことから、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くるが、その手段として具体的には、i) 大量

図 1 フリーラジカルによる前庭器障害のメカニズム

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) NOSII 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, vii) ニューロトロフィン, ix) HSP の誘導, などが挙げられる。動物実験の結果からは NMDA 拮抗剤の投与によりアミノ配糖体系薬剤の耳毒性が軽減すること²⁶⁾, NOS 阻害剤である L-NAME により LPS, GM, シスプラチンによる障害が軽減すること⁶⁾²⁵⁾²⁷⁾, NOSII の発現を mRNA レベルで阻害するとされているステロイドにより LPS, GM による障害が軽減すること, パーオキシナイトライト消去剤であるエブセレンにより LPS, GM による障害が軽減すること, LPS, GM による障害が SOD 投与により軽減すること⁶⁾, ストレプトマイシンや AMPA による末梢前庭障害がエダラボンにより抑制されること²⁴⁾, あるいは内リンパ水腫の発生がエダラボンにより軽減すること²⁸⁾ などが報告されている。また, 近年ニューロトロフィンの効果の一部は活性酸素の消去によるものであることが考えられている²¹⁾。

これら *in vivo* での検討の一方, 各種薬剤の効果の比較や併用効果について *in vitro* での解析も行われている。その結果, NOS 阻害剤 (L-NAME), ROS 消去剤 (D-methionine, マンニトール), BDNF, アポトーシス制御剤 (calpain, caspase 阻害薬) などはいずれも GM 障害後の感覚細胞の生存率を有意に改善させることが明らかになっている。また, これらの薬剤の効果は決して感覚細胞の生存率を100%にするものではなく部分的な障害軽減効果しか得られないこと, 各種薬剤の間で生存率に有意差は認められないことも明らかとなった。薬剤の併用効果についての検討ではともにフリーラジカル系を制御する作用を持つ薬剤同士の併用 (NOS 阻害薬と radical scavenger など), あるいはその他の作用を持つ薬剤同士の併用 (アポトーシスを制御する calpain inhibitor とニューロトロフィンなど) では併用効果は認められなかったが, フリーラジカルを制御する薬剤とその他の作用を持つ薬剤という異なった作用機序を有する薬剤の組み合わせでは, それぞれ単独で使用するよりも高い効果を得ることが判明している。これらの検討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る

た²¹⁾。

次に, 治療効果, すなわち, 一旦生じた障害に対する治療がフリーラジカルの制御で本当に可能かどうか, についても内耳障害モデルを使用した検討が行われている。その結果は, 障害作製後早期, おおむね1時間以内にフリーラジカルの制御を行ったものでは障害軽減効果が認められるものの障害作成後24時間を越えるとフリーラジカルの制御を行っても障害の回復は不良であるという結果であり, 前庭器障害の治療は障害の発生後早期に行うことが望ましいと考えられている²⁹⁾。

6. フリーラジカル制御剤の臨床応用への可能性

フリーラジカルの制御による実際の臨床応用については始まったばかりである。我々はコントロール不良のメニエール病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ので紹介する。

対象はすでにイソソルビドを中心とした薬物療法を施行されているメニエール病患者でコントロール不良の症例, 25例とし, レバミピド 300 mg/日を中心にビタミン C 600 mg/日, グルタチオン 300 mg/日などの抗酸化剤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, 抗酸化剤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: 16/25, 改善: 5/25, 軽度改善: 0/10, 不変: 4/25, 悪化: 0/25であり, 聴力は改善: 12/27, 不変: 14/27, 悪化: 0/10, 耳鳴は改善: 17/27, 不変: 10/27, 悪化: 0/27, 能力低下は改善: 18/25, 不変: 7/25, 悪化: 0/25であった。さらに聴力に対する効果を周波数別に検討してみると 125, 250, 500, 1 kHz では危険率1%以下, 2 kHz では危険率5%以下で有意に聴力が改善していた。これらのことより, メニエール病の治療, 特に聴力障害に関して抗酸化剤が有効な薬剤となり得る可能性が示唆された³⁰⁾。

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コントロール不良のメニエール病に対して少なからぬ効果をもたらすことができ, メニエール病のみならず末梢前庭障害によるめまいの新しい治療法が開発できる可能性が出現している。

文 献

1) Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al:

- Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* 23: 1121-1131, 1994
- 2) Schmidt HHHW, Walter U: NO at work. *Cell* 78: 919-925, 1994
- 3) Beckman JS, Koppenol WH: Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996
- 4) Takumida M, Anniko M: Nitric oxide in the inner ear. *Curr Opin Neurol* 15: 11-15, 2002
- 5) 原 晃: 蝸牛障害とフリーラジカル. *耳鼻・頭頸外科* 73: 735-740, 2001
- 6) Takumida M, Anniko M, Popa R, et al: Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide. *Acta Otolaryngol* 121: 16-20, 2001
- 7) Franz P, Hauser-Kronberger C, Böck P, et al: Localization of nitric oxide synthase I and III in the cochlea. *Acta Otolaryngol* 116: 726-731, 1996
- 8) Hess A, Bloch W, Arnold S, et al: Nitric oxide synthase in the vestibulocochlear system of mice. *Brain Res* 813: 97-102, 1998
- 9) Takumida M, Anniko M: Localization of nitric oxide synthase isoforms (NOS I, II and III) in the vestibular end organs of the guinea pig. *ORL* 60: 67-72, 1998
- 10) Takumida M, Anniko M: Lipopolysaccharide-induced expression of nitric oxide synthase II in the guinea pig vestibular end organs. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 255: 184-188, 1998
- 11) Takumida M, Anniko M, Popa R, et al: Lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase in the guinea pig organ of Corti. *Hear Res* 140: 91-98, 2000
- 12) Hess A, Bloch W, Huverstuhl J, et al: Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the cochlea of guinea pigs after intratympanic endotoxin-treatment. *Brain Res* 830: 113-122, 1999
- 13) Takumida M, Popa R, Anniko M: Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL* 61: 63-70, 1999
- 14) Watanabe K, Hess A, Bloch W, et al: Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) in the vestibule of guinea pigs after the application of cisplatin. *Anticancer Drugs* 11: 29-32, 2000
- 15) Hess A, Bloch W, Su J, et al: Expression of inducible nitric oxide-synthase in the vestibular system of hydropic guinea pigs. *Neurosci Lett* 264: 145-148, 1999
- 16) Michel O, Hess A, Su J, et al: Expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOSII) in the hydropic cochlea of the guinea pig. *Hear Res* 143: 23-28, 2000
- 17) Inafuku S, Wu M, Kimura M, et al: Immunohistochemical demonstration of inducible nitric oxide and nuclear factor-kappa B with reference to age-related changes in the mouse spiral and vestibular ganglion. *Okajimas Folia Anat Jpn* 77: 125-132, 2000
- 18) Takumida M, Anniko M: Simultaneous detection of both nitric oxide and reactive oxygen species in guinea pig vestibular sensory cells. *ORL* 64:143-147, 2002
- 19) Takumida M, Anniko M: Direct evidence of nitric oxide production in guinea pig vestibular sensory cells. *Acta Otolaryngol* 120: 34-38, 2000
- 20) Takumida M, Anniko M: Glutamate-induced production of nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells. *Acta Otolaryngol* 120: 466-472, 2000
- 21) Takumida M, Anniko M, Shimizu A, et al: Neuroprotection of vestibular sensory cells from gentamicin ototoxicity obtained using nitric oxide synthase inhibitors, reactive oxygen species scavengers, brain-derived neurotrophic factors and calpain inhibitors. *Acta Otolaryngol* 123: 8-13, 2003
- 22) Amaee FR, Comis SD, Osborne MP: NG-methyl-L-arginine protects the guinea pig cochlea from the cytotoxic effects of pneumolysin. *Acta Otolaryngol* 115: 386-391, 1995
- 23) Amaee FR, Comis SD, Osborne MP, et al: Possible involvement of nitric oxide in the senso-

- rineural hearing loss of bacterial meningitis. *Acta Otolaryngol* 117: 329-336, 1997
- 24) Horiike O, Shimogori H, Ikeda T, et al: Protective effect of edaravone against streptomycin-induced vestibulotoxicity in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 464: 75-78, 2003
- 25) Takumida M, Anniko M, Popa R: Possible involvement of free radicals in lipopolysaccharide-induced labyrinthitis. a morphological and a functional investigation. *ORL* 60: 246-253, 1998
- 26) Basile AS, Huang J-M, Xie C, et al: N-methyl-D-aspartate antagonists limit aminoglycoside antibiotics-induced hearing loss. *Nat Med* 2: 1338-1343, 1996
- 27) Watanabe K-I, Hess A, Bloch W, et al: Nitric oxide synthase inhibitor suppresses the ototoxic side effect of cisplatin in guinea pigs. *Anticancer Drugs* 11: 401-406, 2000
- 28) 竹田泰三, 工田昌也, 柿本章伸, 他: 薬剤による内リンパ水腫が及ぼす内耳フリーラジカルへの影響. 厚生労働科学研究研究費補助金 特定疾患対策研究事業 前庭機能異常に関する調査研究 平成14年度総括・分担研究報告書: 95-97, 2003
- 29) Popa R, Anniko M, Takumida M: Otoprotectant minimizes hearing defects caused by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A. *Acta Otolaryngol* 120: 350-358, 2000
- 30) Takumida M, Anniko M, Ohtani M: Radical scavengers for Meniere's disease after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 123: 697-703, 2003

原稿到着: 平成16年10月29日

別刷請求先: 工田昌矢

〒734-8551 広島市南区霞1-2-3

広島大学医学部耳鼻咽喉科