

令和元年5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08343

研究課題名(和文)新規環境因子が誘発する難聴の発症機序の解析と予防法の開発

研究課題名(英文) Analysis of hearing loss induced by a novel environmental factor to develop a preventive method

研究代表者

大神 信孝 (Ohgami, Nobutaka)

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：80424919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：世界で7億人の感音性難聴を誘発する環境因子として騒音が知られているが、食品・飲料水等に含まれる重金属摂取と聴力の関連について殆ど分かっていない。マンガン(Mn)は、食物や飲用井戸水で検出される事が報告されている。Mn曝露は加齢性の神経変性疾患を誘発する事が示唆されているが、聴力への影響は未だ分かっていない。本研究より、Mnを飲水曝露した野生型マウスは、内耳コルチ器のラセン神経節の変性とc-Retの発現低下を伴い難聴が誘発される事が示唆され、ヒトにおいても、Mn曝露と聴覚障害の関連が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、ヒトを対象にした疫学研究では病態との原因化学物質の関連は解析出来るものの、メカニズムに基づいた予知・予防方法を開発するには限界があった。マンガン(Mn)は必須微量元素であり、Mnの摂取量を制限するのは容易ではなく、全てのヒトにMnの慢性曝露による難聴リスクの可能性がある。本研究のヒトを対象にした疫学研究とマウスを対象にした実験研究の相補的アプローチにより、実験研究で得られたメカニズムをベースにした、Mnが誘発する難聴の予知・予防方法の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：There is limited information about an association between hearing loss and heavy metals. In previous studies, manganese has been shown to be detected in drinking well water. Also, exposure to manganese has been shown to cause age-related neurodegeneration. However, there is very limited information showing that oral exposure to manganese causes hearing loss in humans and mice. This study demonstrated that oral exposure to manganese via drinking water caused hearing loss with degeneration of spiral ganglion neurons in inner ears which involved decreased expression of c-Ret. This study also demonstrated the association of hearing loss and manganese levels in biological samples in humans.

研究分野：環境衛生学

キーワード：難聴 ラセン神経節 元素 神経変性

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内耳の変性により発症する感音性難聴は遺伝的因子、加齢因子、環境因子が複合的に影響して発症するが、その患者数は世界で7億人と推計されており、ひとたび発症すると抜本的な治療法は無い為、予防が極めて重要である。難聴の危険因子である騒音は、遮音・防音などの物理的対策により、そのリスクを効果的に軽減出来るが、食物・飲料水由来の元素については、実体が把握されていないだけでなく、曝露源や閾値、発症機序の情報が限られている為、リスクを回避する事は極めて難しい状況である。溶接工など職業現場において、マンガンの吸入曝露はパーキンソン (PD) 様症状を誘発する事が示唆されている。また、実験研究により、マンガンをマウスに飲水曝露すると、大脳黒質にマンガンが蓄積し、PD 様症状を呈する事が報告されている。しかしながら、食品・飲料水中のマンガンの経口曝露と難聴の関連は全く報告されていない。

2. 研究の目的

- (1) 本研究は、マウスを対象にした実験研究により、マンガンと聴覚障害の発症機序を解析し、予防法を検討する。
- (2) ヒトを対象にした疫学研究により、マンガン曝露と聴覚障害の関連を解析する。

3. 研究の方法

(1) マウスを対象にした実験研究

1ヶ月齢の C57BL6/J 系統マウスを対象に、塩化マンガンを 3.30 mg/kg/day の用量で1ヶ月間飲水にて曝露した。曝露の前後で聴性脳幹反応を測定し聴力への影響を評価した。また、ニッスル染色、透過・走査電子顕微鏡解析、免疫組織染色を用いて内耳の病理解析を実施した。

(2) ヒトを対象にして疫学研究

145名の健常者に対して、年齢、性別や喫煙歴などのアンケート調査、純音聴力検査による聴力測定を行った。あわせて、各被検者から非侵襲的生体サンプルとしてツメ、毛髪、尿サンプルを採取し、誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) を用いてツメのマンガン蓄積量を測定した。過去の論文のカットオフ値で設定した聴力異常の有無を従属変数、マンガン高値群と低値群を独立変数としてロジスティック回帰分析を行い、年齢、喫煙歴等を交絡因子として調整オッズ比を算出した。

4. 研究成果

(1) マウスを対象にした実験研究

マンガンの飲水曝露により 4, 12, 20, 32 kHz の聴力が有意に低下した (図1)。

曝露群の内耳コルチ器において、ラセン神経節の神経変性像が観察された。次に、我々の過去の研究より神経成長因子の受容体 c-Ret がラセン神経節の維持に重要である事が示唆されていることから、曝露群の内耳標本を用いて c-Ret の免疫組織染色を実施した。その結果、曝露群のラセン神経節において c-Ret の発現が有意に低下している事が分かった。次に、cell free や *in vitro* の実験系において、マンガンは Hif-1 α を阻害し Hif-1 α 蛋白質を安定化させる事が報告されている。また、神経系細胞株において Hif-1 α 蛋白質の安定化は神経成長因子の受容体 c-Ret の発現レベルを低下させる事が報告されている。我々の過去の研究より、c-Ret は内耳のラセン神経節の維持に重要である事が明らかになっているが、マンガンの経口曝露がラセン神経節の Hif-1 α や c-Ret に影響するか全く分かっていない。そこで、本研究は、マウスを対象にマンガンの飲水曝露による聴力への影響を解析し、内耳のラセン神経節の病理解析を実施した。Hif-1 α と c-Ret の免疫組織染色では、曝露群のラセン神経節において Hif-1 α の発現レベルの増加と c-Ret の発現レベルの低下が観察された。

更に、RET-トランスジェニックマウス (RET-マウス) を対象にマンガンを飲水曝露し、曝露に対する感受性を検討した所、RET-マウスではマンガンを飲水曝露しても非曝露群の聴力レベルと同等の聴力レベルを維持しており、曝露による難聴がレスキューされる事が分かった。以上の実験研究より、マンガンを飲水曝露した野生型マウスは、内耳コルチ器のラセン神経節の変性と

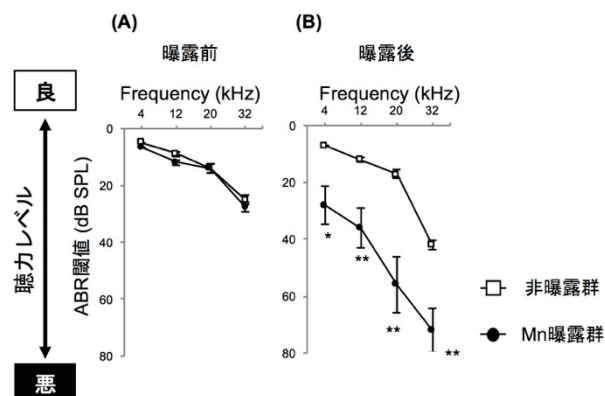


図1 マンガン (Mn) の飲水曝露によるマウスの聴力低下。曝露前 (A) と4週間曝露後 (B) のマウスの聴力レベル (means \pm SE, 各群6匹)。Mn 投与群 (6匹) は 16.50 mg/L の Mn を飲水で投与した。非投与群は10匹のマウスを用いた。統計的有意差 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$) は Steel-Dwass test を用いて解析した。

Hif-1alpha の安定化と c-Ret の発現低下を伴い難聴が誘発される事が示唆された(引用文献①)。

(2) ヒトを対象にして疫学研究

各生体サンプル中のマンガンレベルについて、ツメは $7.3 \pm 7.6 \mu\text{g/g}$ 、毛髪は $20.3 \pm 19.9 \mu\text{g/g}$ 、尿は $0.7 \pm 2.1 \mu\text{g/L}$ で検出された。Receiver operating characteristic (ROC) 曲線と Youden index で各生体サンプル中のカットオフ値 (ツメ: $1.97 \mu\text{g/g}$ 、毛髪: $4.08 \mu\text{g/g}$ 、尿: $0.24 \mu\text{g/L}$) を設定した。単変量解析により、ツメのマンガンの高値群は、低値群と比較して、4、8、12 kHz の聴力が低下傾向を示した ($p < 0.01$) (図2)。また、毛髪のマンガンの高値群も 4、8、12 kHz の聴力が低下傾向を示したが ($p < 0.01$)、尿サンプルのマンガンの高値群は 12 kHz の聴力のみが低下傾向を示した (図2)。

更に、年齢、喫煙歴等を交絡因子で調整した多変量解析においても、マンガンの高値群は低値群と比較して、8 kHz と 12 kHz の聴力異常と有意な相関を示した (8 kHz の聴力異常の調整オッズ比は 4.19、95%信頼区間: 1.18-14.82; 12 kHz の聴力異常の調整オッズ比は 3.88、95%信頼区間: 1.25-12.06)。一方、毛髪や尿中のマンガンのレベルと聴力の有意な相関

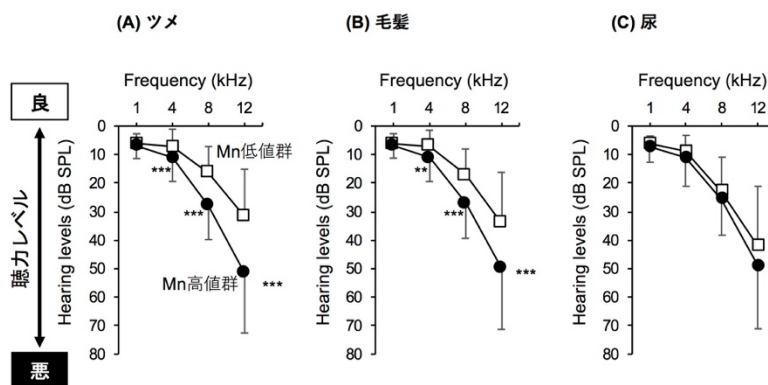


図2 ヒトの生体サンプル中のマンガン (Mn) と聴力の相関。

ツメ(A)、毛髪(B)と尿サンプル(C)中の Mn 高値群 (closed circles) と Mn 低値群 (open squares) の 1-12 kHz の周波数域の聴力閾値 (means \pm SD) を示す。統計的有意差 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) は Mann-Whitney U test を用いて解析した。

は認められなかった。以上の結果より、ヒトのツメに蓄積するマンガンのレベルと高音域の聴力異常の関連が示唆された (引用文献②)。ツメに蓄積する元素レベルは慢性曝露の指標であることから、マンガンの慢性曝露と聴力低下が関連する事が示唆された。騒音曝露は聴力に影響する既知の因子であるが、今回の調査では、騒音レベルを調査していなかった。今後は更に例数を増やして、騒音曝露レベルも交絡因子として解析し、本研究成果を検証する事が重要である。

次にツメと毛のマンガンの蓄積量と内耳のマンガンの蓄積量が相関するか、マウスを対象に実験した。3の(1)方法でマウスにマンガンを曝露した後にツメ、毛と内耳のマンガンのレベルを測定した所、ツメと内耳のマンガンのレベルは有意な相関を示したが、毛と内耳のマンガンのレベルは相関しない事が分かった (引用文献②)。以上の結果より、ツメのマンガンのレベルは内耳のマンガンの蓄積レベルを反映する事が示唆された。内耳にはマンガンを細胞内に取り込むトランスポーターが存在する事が知られているが、ツメや毛の産生細胞に存在するか分かっていない。今後、これらの点が明らかになる事で、ツメと内耳のマンガンのレベルが有意な相関を示した理由が分かってくると思われる。

<引用文献>

① [Ohgami N, Yajima I, Iida M, Li X, Oshino R, Kumasaka MY, Kato M. Manganese-mediated acceleration of age-related hearing loss in mice. Sci Rep. 2016 Nov 8;6:36306. doi: 10.1038/srep36306. 査読有り.](#)

② [Ohgami N, Li X, Yajima I, Oshino R, Ohgami K, Kato Y, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Manganese in toenails is associated with hearing loss at high frequencies in humans. Biomarkers. 2018 Sep;23\(6\):533-539. doi: 10.1080/1354750X.2018.1458153. 査読有り.](#)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計12件)

- ① Xu H, [Ohgami N](#), He T, Hashimoto K, Tazaki A, Ohgami K, Takeda K, Kato M. Improvement of balance in young adults by a sound component at 100 Hz in music. Sci Rep. 2018;8(1):16894. doi: 10.1038/s41598-018-35244-3. 査読有り.
- ② Omata Y, Yoshinaga M, [Yajima I](#), [Ohgami N](#), Hashimoto K, Higashimura K, Tazaki A, Kato M. A disadvantageous effect of adsorption of barium by melanin on transforming activity. Chemosphere. 2018;210:384-391. doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.022. 査読有り.

- ③ Li X, Ohgami N, Yajima I, Xu H, Iida M, Oshino R, Ninomiya H, Shen D, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Arsenic level in toenails is associated with hearing loss in humans. PLoS One. 2018;13(7):e0198743. doi: 10.1371/journal.pone.0198743. eCollection 2018. 査読有り.
- ④ Ohgami N, Li X, Yajima I, Oshino R, Ohgami K, Kato Y, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Manganese in toenails is associated with hearing loss at high frequencies in humans. Biomarkers. 2018;23(6):533-539. doi: 10.1080/1354750X.2018.1458153. 査読有り.
- ⑤ Ninomiya H, Ohgami N, Oshino R, Kato M, Ohgami K, Li X, Shen D, Iida M, Yajima I, Angelidis CE, Adachi H, Katsuno M, Sobue G, Kato M. Increased expression level of Hsp70 in the inner ears of mice by exposure to low frequency noise. Hear Res. 2018;363:49-54. doi: 10.1016/j.heares.2018.02.006. 査読有り.
- ⑥ Yajima I, Ahsan N, Akhand AA, Al Hossain MA, Yoshinaga M, Ohgami N, Iida M, Oshino R, Naito M, Wakai K, Kato M. Arsenic levels in cutaneous appendicular organs are correlated with digitally evaluated hyperpigmented skin of the forehead but not the sole in Bangladesh residents. J Expo Sci Environ Epidemiol. 2018;28(1):64-68. doi: 10.1038/jes.2016.70. 査読有り.
- ⑦ Li X, Ohgami N, Omata Y, Yajima I, Iida M, Oshino R, Ohnuma S, Ahsan N, Akhand AA, Kato M. Oral exposure to arsenic causes hearing loss in young people aged 12-29 years and in young mice. Sci Rep. 2017;7(1):6844. doi: 10.1038/s41598-017-06096-0. 査読有り.
- ⑧ Kumasaka MY, Yajima I, Ohgami N, Ninomiya H, Iida M, Li X, Oshino R, Tanihata H, Yoshinaga M, Kato M. Manganese-Mediated Decrease in Levels of c-RET and Tyrosine Hydroxylase Expression In Vitro. Neurotox Res. 2017;32(4):661-670. doi: 10.1007/s12640-017-9783-0. 査読有り.
- ⑨ Yajima I, Kumasaka MY, Iida M, Oshino R, Tanihata H, Al Hossain A, Ohgami N, Kato M. Arsenic-mediated hyperpigmentation in skin via NF-kappa B/endothelin-1 signaling in an originally developed hairless mouse model. Arch Toxicol. 2017;91(11):3507-3516. doi: 10.1007/s00204-017-1975-0. 査読有り.
- ⑩ Konishi H, Ohgami N, Matsushita A, Kondo Y, Aoyama Y, Kobayashi M, Nagai T, Ugawa S, Yamada K, Kato M, Kiyama H. Exposure to diphtheria toxin during the juvenile period impairs both inner and outer hair cells in C57BL/6 mice. Neuroscience. 2017;351:15-23. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.028. 査読有り.
- ⑪ Ohgami N, Oshino R, Ninomiya H, Li X, Kato M, Yajima I, Kato M. Risk Assessment of Neonatal Exposure to Low Frequency Noise Based on Balance in Mice. Front Behav Neurosci. 2017;11:30. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00030. eCollection 2017. 査読有り.
- ⑫ Ohgami N, Yajima I, Iida M, Li X, Oshino R, Kumasaka MY, Kato M. Manganese-mediated acceleration of age-related hearing loss in mice. Sci Rep. 2016;6:36306. doi: 10.1038/srep36306. 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Xu Huadong, 大神信孝, He Tingchao, 李香、武田湖州恵、加藤昌志、音楽に含まれる音成分と平衡感覚の関連、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019 年
- ② 大神信孝, He Tingchao, Xu Huadong, 押野玲奈、李香、加藤昌志、可聴域の騒音ストレスによるラセン神経節への影響、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019 年
- ③ He Tingchao, 大神信孝, 李香, Xu Huadong, 加藤昌志、生体サンプル中の鉄レベルと聴力異常の相関解析、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019 年
- ④ 大神信孝, 李香, Xu Huadong, He Tingchao, 加藤昌志、生体サンプル中のヒ素レベルと聴力異常の関連、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019 年
- ⑤ 押野玲奈, 大神信孝, 李香, He Tingchao, 加藤昌志、前庭障害モデルマウスを用いた前庭機能の解析、第 89 回日本衛生学会学術総会、2019 年
- ⑥ 李香, 大神信孝, 押野玲奈, 加藤昌志、実験研究と疫学研究によるヒ素曝露の難聴リスクの解析、第 29 回日本微量元素学会学術集会、2018 年
- ⑦ He Tingchao, 大神信孝, 李香, 加藤昌志、ヒトのツメに蓄積するマンガンレベルと聴力の関連、第 29 回日本微量元素学会学術集会、2018 年
- ⑧ 大神信孝, 李香, 押野玲奈, 加藤昌志、マンガンの飲水曝露による聴覚系への影響、第 29 回日本微量元素学会学術集会、2018 年

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 2 件)

名称：音発生装置
発明者：加藤昌志、大神信孝
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許願 2018-239849 号
出願年：2018 年
国内外の別：国内

名称：音発生装置
発明者：加藤昌志、大神信孝、曾根三千彦、杉本賢文
権利者：名古屋大学
種類：特許
番号：特許願 2018-104637 号
出願年：2018 年
国内外の別：国内

○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
https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/laboratory/basic-med/social-science/environmental-health/

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：矢嶋 伊知朗
ローマ字氏名：(YAJIMA, ichiro)
所属研究機関名：名古屋大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：講師
研究者番号（8 桁）：80469022

研究分担者氏名：飯田 真智子
ローマ字氏名：(IIDA, machiko)
所属研究機関名：愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所
部局名：周生期学部
職名：研究員
研究者番号（8 桁）：60465515

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：加藤 昌志
ローマ字氏名：(KATO, masashi)

※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。