

機関番号：16301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890173

研究課題名（和文） 虚血性内耳障害における内・外有毛細胞障害と低体温による障害抑制効果に関する研究

研究課題名（英文） The effect of hypothermia on the inner and outer hair cell damages due to cochlear ischemia.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：虚血障害後に行う低体温を加えることによって、虚血後に生じる聴力の閾値上昇が抑制され、また虚血による内・外有毛細胞における脱落変性が抑制されることが明らかとなった。またその効果は、虚血後早期に導入し、また低体温の時間が長い方がより効果が顕著であった。

研究成果の概要（英文）：The effect of post-ischemic hypothermia on the inner ear had not been clarified. We investigated whether hypothermia after transient ischemia could prevent the inner and outer hair cell damages and its therapeutic time window. The protective effect was greater when the hypothermia was induced earlier and had a longer duration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
総計	1,990,000	597,000	2,587,000

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：虚血性内耳障害、内・外有毛細胞、低体温

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会に伴い、難聴に対する社会的関

心が高まっている。しかしながら、今なお感音難聴に対する確実な治療法は開発されて

おらず、現存する治療手段にも限界があるのが現状である。これまでの報告によると感音難聴、特に突発性難聴には背景に内耳虚血が存在すると推察されている。実際、内耳の栄養動脈である前下小脳動脈あるいは迷路動脈の血流を遮断して虚血を負荷すると、聴力障害や蝸牛組織障害が生じることが古くから証明されている (Kimura 1958、Perlman 1958)。我々はこれまでに一過性内耳虚血モデルを確立し、虚血後に内有毛細胞に進行性の脱落や聴力障害が生じることを明らかにしてきた (Hakuba 2000)。この脱落を抑制することができれば、虚血性内耳障害による聴力障害を防御することが可能であると考えられる。

脳虚血に関する基礎的研究では、虚血後のわずか数℃の体温低下が虚血・再還流による脳神経細胞障害に対して保護効果を持つことが明らかになっている。スナネズミを用いた虚血実験では虚血再還流 5 時間までに 31～32℃の低体温処置を開始することで、著明な神経細胞死の防御効果が得られることが示されている。臨床の現場においても、脳腫瘍や脳動脈瘤の手術では虚血による神経細胞を防ぐために低体温麻酔が導入され、その有効性が報告されている。また、脳梗塞や脳損傷においても脳低温療法が施行され、その有効性が証明されている。しかしながら、耳科学の分野では虚血障害に対する低体温の影響に関する研究は数少ない。我々の内耳虚血障害研究グループはこれまで、スナネズミの一過性内耳虚血モデルを用いて、虚血障害が生じる前から低体温を負荷した場合には蝸牛有毛細胞の聴力閾値の上昇が有意に抑制され、さらにその機序のひとつとして低体温により内有毛細胞蝸牛神経系シナプスにおけるグルタミン酸神経毒性が抑制されること (Hyodo 2001) を報告している。また虚

血障害後に行う低体温が聴力の閾値上昇を抑制することを報告してきた (Takeda 2008)。しかしながら、虚血による外有毛細胞障害と虚血後の低体温による有毛細胞における脱落変性抑制効果に関しては検証されていない。臨床の現場で低体温療法を用いることを検討する上で、内・外有毛細胞障害の病態を明らかにし、更に虚血障害後の低体温がその病態に及ぼす影響や低体温開始のタイミング、低体温の持続時間等を検討することは不可欠である。

2. 研究の目的

耳科学の分野では虚血障害に対する低体温の影響に関する研究は数少ない。我々の内耳虚血障害研究グループはこれまで、スナネズミの一過性内耳虚血モデルを用いて、虚血障害が生じる前から低体温を負荷した場合には蝸牛有毛細胞の聴力閾値の上昇が有意に抑制され、さらにその機序のひとつとして低体温により内有毛細胞蝸牛神経系シナプスにおけるグルタミン酸神経毒性が抑制されることを報告している。臨床の現場で低体温療法を用いることを検討する上で、有毛細胞障害の病態を明らかにし、虚血障害後の低体温がその病態に及ぼす影響や低体温開始のタイミング、低体温の持続時間等を検討することは不可欠である。本研究は虚血障害を負荷した後に低体温を導入した場合、虚血によって生じる内有毛細胞における進行性の脱落や聴力障害に対する保護効果を明らかにすることにより、突発性難聴における新しい治療法として低体温療法の有用性を示すことを目的とする。

3. 研究の方法

研究計画、方法について以下に示す。

1) 虚血後に動物に 32°Cの低体温を虚血後 1 時間の時点から 3 時間施行し、虚血後の内耳障害が抑制されるかを、虚血後 7 日目の内外有毛細胞脱落率の算出し及び聴性脳幹反応 (Auditory Brain Stem: ABR) の閾値変化の測定を行い、37°Cの場合と比較検討する。

2) 低体温の開始時間で効果に差があるかどうかを判断するため、虚血後 1 時間の時点から 3 時間低体温を負荷した場合と虚血後 1 時間の時点から 6 時間負荷した場合の内・外有毛細胞における細胞脱落率の算出と ABR 閾値変化の測定を行う。さらに、低体温で差があるかどうかを検討するため、低体温開始時間を虚血後 1、3、6 時間の時点の 3 点で、3 時間低体温を負荷した場合の内・外有毛細胞脱落率と ABR 閾値変化を調べ、37°Cの場合と比較検討する。

3) 虚血後の細胞障害メカニズムの 1 つと考えられている NOx の濃度について、32°Cの低体温を負荷した場合にはどのように変化するかを検討する。前頸部切開で実験動物の骨胞を開放し、蝸牛を明視下に蝸牛基底回転鼓室階に小孔を作成する。そこに透析膜付微小プローブを挿入して外リンパを回収し、経時的に鼓室階外リンパ中の NOx 濃度を微小透析法と窒素分析システムを用いて測定する。マイクロシリンジポンプオートインジェクターシステムを用い、透析液を参加窒素分析装置に送ることによりリンパ球中の NO₂-、NO₃-の濃度を 0.1 pmol の検出感度で in vivo で測定が可能となる。37°Cの常温群と比較して虚血負荷後の NOx の濃度上昇について検討する。

4. 研究成果

1) 外有毛細胞の形態変化

虚血負荷時間を 30 分に延長した場合、外

有毛細胞のシナプス間隙における樹状突起に空胞変性や細胞膜の脱落所見が散見された。

2) 内・外有毛細胞障害の観察と定量

蛍光顕微鏡にて基底回転の有毛細胞数の脱落細胞数率を算出した結果、虚血 1 時間後から低体温を負荷した場合には内・外有毛細胞の脱落細胞数率が有意に抑制された。

以上の結果より、虚血内耳障害では虚血時間が延長されることによって外有毛細胞においても障害が誘導され、またそれらの障害は虚血後に低体温を負荷することによって生理学的にも組織学的にも抑制されることが明らかとなった。

3) 蝸牛鼓室階の NOx 濃度の測定

蝸牛基底回転鼓室階の外リンパを回収して NOx 濃度を測定を行った結果、37°Cの常温群では虚血後に上昇が認められたリンパ中の NOx 濃度は、虚血 1 時間後から低体温を負荷した群では有意に上昇が抑制されていた。

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 6 件)

1.Hakuba N, Iwanaga M, Tanaka S, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M, Okanoue Y, Hiwatashi N, Wada T Ear-pick injury as a traumatic ossicular damage in Japan. 査読有 Eur Arch Oto-Rhino-L 267(7) 2010 1035-1039

2.Hakuba N, Iwanaga M, Tanaka S, Hiratsuka Y, Kumabe Y, Konishi M, Okanoue Y, Hiwatashi N, Wada T Ear-pick injury as a traumatic ossicular damage in Japan. 査読有 Eur Arch Oto-Rhino-L 267(7) 2010 1035-1039

3.Maetani T, Hyodo J, Takeda S,

Hakuba N, Kiyofumi G. Prednisolone prevents transient ischemia-induced cochlear damage in gerbils. Acta Otolaryngol Suppl. 査読有 562 2009 24-27

4. Watanabe F, Hakuba N, Gyo K Measurement of DPOAE after ischemia/reperfusion injury of the cochlea in gerbils. Neurosci Lett. 査読有 267 2009 135-138

5. Takeda S, Hata R, Cao F, Yoshida T, Hakuba N, Hato N, Gyo K. Ischemic tolerance in the cochlea. Neurosci Lett. 査読有 262 2009 263-266

6. Hyodo J, Hakuba N, Hato N, Takeda Shoichirou, Okada, Omotehara, Gyo K. Glutamate agonist causes irreversible degeneration of inner hair cells. Neuroreport. 査読有 23 2009 1255-1259

[学会発表] (計9件)

1. Hakuba N, Gyo K; Glutamate agonist causes irreversible degeneration of inner hair cells, Inner Ear Biology, チェコ、2010 (一般講演)

2. 白馬伸洋. 穿孔性中耳炎に対する鼓膜再生治療. 喜多八幡浜耳鼻咽喉科医会講演会, 愛媛, 2010 (教育講演)

3. 白馬伸洋. 穿孔性中耳炎に対する鼓膜再生治療. 岡山 Translation 研究会, 岡山, 2010 (特別講演)

4. 白馬伸洋. 穿孔性中耳炎に対する鼓膜再生治療. 東予耳鼻科会, 愛媛, 2010 (特別講演)

5. 白馬伸洋. 鼓膜再生による新しい穿孔性中耳の治療法. 信州耳鼻咽喉科臨床問題懇話会, 長野, 2010 (招待講演)

6. 白馬伸洋. 耳鼻咽喉科の再生治療. 愛媛県医師会生涯研究, 愛媛, 2009 (特別講演)

7. 白馬伸洋. MRSA 中耳炎に対する治療. 栃木下野耳鼻咽喉科アレルギー感染症研究会, 栃木, 2009 (招待講演)

8. 白馬伸洋. 虚血性内耳病変の発症機序と臨床. 東大阪 ORL 研究会, 大阪, 2009 (特

別講演)

9. 白馬伸洋. 新しい鼓膜穿孔閉鎖法. 第5回明石耳鼻咽喉科学術講演会, 兵庫, 2009 (特別講演)

[図書] (計1件)

白馬伸洋. アテロコラーゲン/シリコン膜とヒト線維芽細胞増殖因子(bFGF)製剤を用いた鼓膜穿孔閉鎖術. 田畑康彦編, 遺伝子医学MOOK 再生遺伝子治療 患者までとどいている再生誘導治療, 第1版, 大阪:メディカルドゥ, 2009: 139-143.

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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