

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592502

研究課題名(和文)内耳障害における内耳スーパーオキシド分布について

研究課題名(英文)Superoxide distribution in the inner ear in inner ear disorders

研究代表者

原田 保 (HARADA, Tamotsu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：30165021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：いろいろな疾患でフリーラジカル、特に一酸化窒素(NO)が病態に関与しているとの報告がある。突発性、薬剤性難聴などもNOが病態に深く関与しているとの報告もあるが、推測の域である。そこで我々はすでに報告しているCDDP投与により惹起した内耳障害モデルモットを使用して内耳におけるNOおよび一酸化窒素(NOS)に関して研究をおこなった。鼓室階リンパのNOを測定し存在を明らかにしたが、恒常的な値を得ることはできなかった。real-time PCR法およびWestern Blot法でNOSが内耳に存在した。NOSの発現量とABR閾値が相関していた。この事実から内耳障害にNOSが関与していると考えた。

研究成果の概要(英文)：Free radicals, particularly nitrogen monoxide (NO), are involved in the pathology of various conditions. Several studies have reported that NO is also intimately involved in the pathology of sudden-onset and drug-induced hearing loss, but the results appear speculative. For this reason, we examined the role of NO and nitrogen monoxide synthetase (NOS) in the inner ear, using previously reported guinea pig with inner ear disorders induced by cisplatin administration. The following results were obtained :1)The obvious presence of NO in the lymphatic fluid of the tympanic cavity was detected, but measured values were not consistent;2)real-time polymerase chain reaction and western blotting revealed levels of NOS in inner ear samples; and 3)the level of NOS expression correlated with the auditory brain response threshold. Based on these findings, NOS is likely involved in inner ear disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科

キーワード：耳科学 スーパーオキシド

1. 研究開始当初の背景

いろいろな疾患でフリーラジカル(スーパーオキシド)が病態に関与していることが明らかになっている。スーパーオキシド自体も単独で組織傷害を起こすが、一酸化窒素(NO)と反応し、更に強力な酸化傷害を起こす。NO や一酸化窒素合成酵素(NOS)に関する研究は、悪性腫瘍、虚血性疾患やアレルギー疾患に関して多く、病態に深く関与していると考えられている。突発性、薬剤性、騒音性あるいは糖尿病性難聴などの病態に深く関与しているとの報告はあるが、推測の域を超えてなく、内耳におけるこれらの存在および働きについての詳細な報告はない。そこで今回、我々は内耳におけるNOとNOSの存在および役割に関して検討した。

2. 研究の目的

NOおよびNOSが内耳に存在し、難聴病態にどのように関与しているかを検討する。CDDP(cis-diammine-dichloroplatinum)を投与し、難聴を発現させたモルモットを用いておこなった。また存在した場合、内耳での経日的なNOおよびNOS(特にiNOS)の発現量と難聴の程度との関係をABR(auditory brainstem response)を用いて評価した。また我々が開発に協力したカテーテル型NOセンサーを用いて正常および難聴モデルの鼓室階NOの経時および経日的値の測定をおこなった。

この研究によりNOおよびNOSが難聴の病態に関与しているかを明確にすることは、治療に貢献できると考える。

3. 研究の方法

CDDPを用いて難聴モデルを作製。

4週齢の雄で体重は250から350gのモルモットの腹腔内にCDDP(10mg/kg)を投与して難聴モデルを作製した。

難聴モデルの聴覚検査。

CDDP投与後1から5日目まで連日ABR検査を

おこない閾値を測定した。

難聴モデルにおける内耳でのiNOS発現についての検討。

CDDP投与後1から5日まで毎日蝸牛を摘出し、real-time PCR法およびWestern Blot法にてNOs(特にiNOS)の検出をおこなった。

カテーテル型NOセンサーを用いて正常および難聴モデル内耳(鼓室階)NO値の測定。我々が開発に協力した直径1mmのセンサーを鼓室階に挿入して経時および経日的にNO値を測定した。

4. 研究成果

難聴モデルの作製。

図1にコルチ器の走査電子顕微鏡写真を示す。内有毛細胞は比較的保たれているが、外有毛細胞は3列とも中から高度な組織傷害を認めた。



図1 内耳障害モデルのコルチ器

難聴モデルの聴覚検査。

CDDP投与後1から5日目まで連日ABR検査をおこなった。連日のABR閾値変化を図2に示す。1日目から閾値の上昇を認めたが、3日目が最大で5日目には低下していた。図3にclick音におけるABR閾値検査を示す。コントロールに比べて連日やや閾値の上昇を認めた。また2、4、6、8kHzにおける閾値を測定した。2kHzを図4に8kHzを図5に示す(4、6kHzとも8kHzと同様な結果であったため図は省略する)。2kHzでも3日目に閾値は上昇し、5日目には低下していた。8kHzではより著明に3日目に閾値の上昇を

認めた。

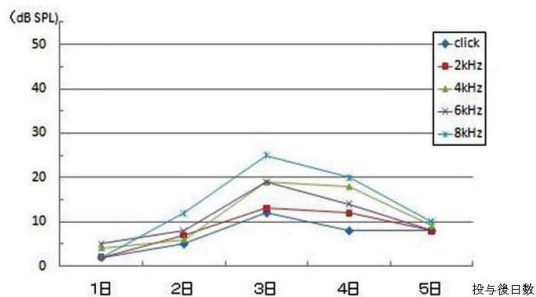


図2 CDDP 投与群における各周波数での ABR 閾値変化

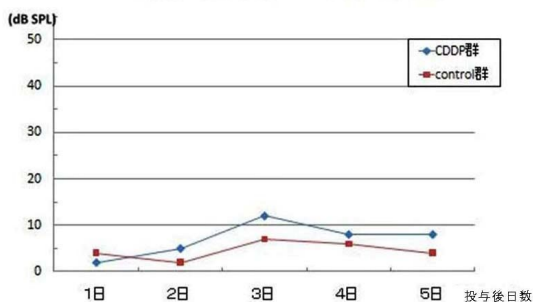


図3 click 音における ABR 閾値比較

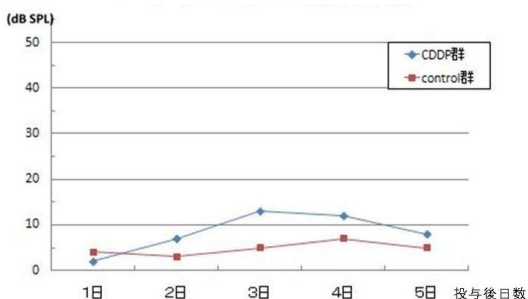


図4 2kHz における ABR 閾値比較

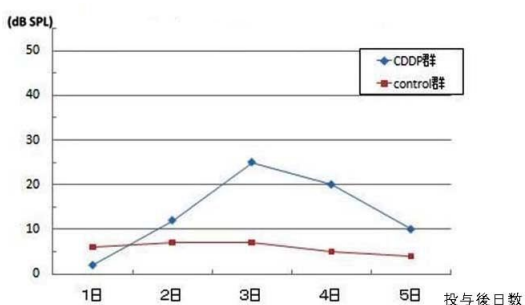


図5 8kHz における ABR 閾値比較

難聴モデルにおける内耳での NO (特に iNO) の発現についての検討。

Western Blot 法の結果を図6に示す。0日目(投与前)のコントロールでは iNOS 蛋白の発現はないが、1日目に出現し、2日目に最大

であった。それ以後は急速に減少していた。この事実は2日目に NO による組織傷害が発現し、3日目に ABR 閾値が上昇していた結果と一致する。そこで NO 値の経時あるいは経日的変動を明確にする必要がある。

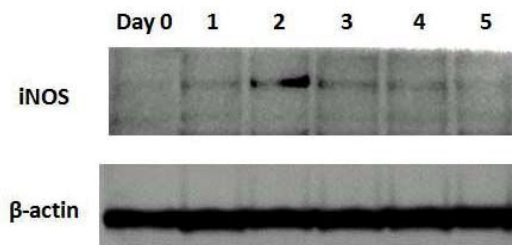


図6 CDDP 投与群 Western Blot 結果

カテーテル型 NO センサーを用いた正常および難聴モデル内耳 NO の測定。

図7に示すように直径1mmのセンサーを鼓室階に挿入することができた。麻酔下では NO の測定は可能であった。コントロール群に比べて明らかに NO 値は上昇していた。CDDP 投与後1から5日目まで自由行動で NO を測定したが、センサーの固定が不十分で再現性のある信頼できる結果を得ることができなかった。そこで最終年度に拘束して NO を測定したが、一定の結果を得ることはできなかった。これはおそらく拘束によるストレスが関与していると考えられ、この問題の解決に現在取り組んでいる。

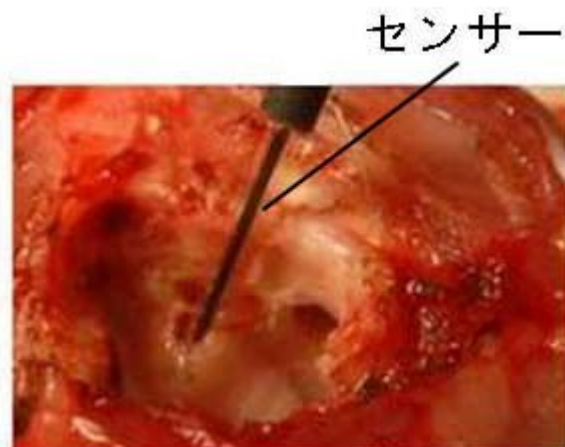


図7 小孔から鼓室階 (scala tympani) へ NO センサーを挿入し、NO 濃度を測定する。

まとめ

鼓室階外リンパに iNO が存在し、経時的に変動し、CDDP 投与後 2 日目に最も高値であった。その 1 日後(CDDP 投与後 3 日目)に ABR 閾値が上昇していたことから、NO は内耳組織傷害に関与していることが明確になった。また今後、カテーテル型 NO センサーを用いて更に NO の内耳における役割を明確にしたいと考えている。

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 3 件)

福島 久毅、原田 保、糖尿病患者の内耳病理 ヒト側頭骨連続切片を用いた形態学的研究、耳鼻咽喉科ニューロサイエンス、査読有、27 巻、2013、pp.89 - 92、

Yoda S, Cureoglu S, Yildirim-Baylan M, Morita N, Fukushima H, Harada T, Paparella MM., Association between type 1 diabetes mellitus and deposits in the semicircular canals, Otolaryngol Head Neck Surg, 査読有、145 巻、2011、pp.458 - 62、

Yoda S, Cureoglu S, Shimizu S, Morita N, Fukushima H, Sato T, Harada T, Paparella MM., Round window membrane in Ménière's disease: a human temporal bone study, Otol Neurotol, 査読有、32 巻、2011、pp.147 - 151、

〔学会発表〕(計 6 件)

Hisaki Fukushima、Tamotsu Harada、The value of magnetic resonance imaging in patients with endocochlear disease、37th ARO Midwinter Meeting、2014 年 2 月 23 日、サンディエゴ、

福島 久毅、原田 保、一側性の高度急性感音難聴を呈した高齢男性症例、第 23 回日本耳科学会、2013 年 11 月 24 日、宮崎、

柴田 大、與田 茂利、森田 倫正、福島 久毅、原田 保、クブラ結石症と半規管結石症における頭部外傷の既往による影響、第 23 回日本耳科学会、2013 年 11 月 24 日、宮崎、

柴田 大、與田 茂利、森田 倫正、福島 久毅、原田 保、クブラ結石症と半規管結石症における頭部外傷の既往による影響、第 31 回耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会、2013 年 8 月 24 日、大阪

與田 茂利、福島 久毅、森田 倫正、秋定 健、原田 保、メニエール病患者における正円窓膜変化、第 21 回日本耳科学会、2011 年 11 月 16 日、沖縄

Hisaki Fukushima、Toshihiro Tachi、Dai Shibata、Masakazu Hamamoto、Tamotsu Harada、Sudden sensorineural hearing loss and Aging, AAO-HNSF Meeting and OTO EXPO 2011、2011 年 9 月 12 日、サンフランシスコ、

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 保 (HARADA, Tamotsu)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号：30165021

(2) 研究分担者

福島 久毅 (FUKUSHIMA, Hisaki)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：70309574

(3) 研究分担者

森田 倫正 (MORITA, Norimasa)
川崎医科大学・医学部・講師
研究者番号：40341119

(4) 研究分担者

舘 俊廣 (TACHI, Toshihiro)
川崎医科大学・医学部・助教
研究者番号：70341120