

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11182

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞シナプス障害モデルを用いた薬物のスクリーニング

研究課題名(英文) Screening of drugs using zebrafish lateral lines hair cell synaptic disorder model

研究代表者

廣瀬 敬信 (HIROSE, Yoshinobu)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80555714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：水流を感知するゼブラフィッシュの側線器は構造的、生理学的に内耳有毛細胞と酷似する。利点として、側線器有毛細胞が体表面にあるため、解剖の必要がなく、可視化が非常に容易である。今回我々は、シナプスによる音響障害モデルを作成するために、ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞の音響障害モデルを作成した。超音波発生装置を用いて、様々な周波数、出力で行ったところ、低周波数、高出力ではキャビテーション現象が起こるため稚魚自体を障害したが、高周波数、低出力にて稚魚を障害することなく、側線器有毛細胞を障害する事が可能であった。このモデルにて漢方薬等のスクリーニングを行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有毛細胞の可視化が容易であるゼブラフィッシュ側線器有毛細胞の音波障害によるモデルを作成したことにより、様々な薬物の音響障害モデル作成が可能となった。これらモデルを用いて、様々な薬物のスクリーニングを行い、漢方薬等に保護効果が見られた。今後このモデルを用いて様々な薬物をスクリーニングすることにより、イヤホンや騒音による難聴等からの内耳保護薬物を同定できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The lateral lines of zebrafish that sense water are structurally and physiologically similar to inner ear hair cells. As an advantage, since lateral organ hair cells are on the body surface, there is no need for dissection and visualization.

In this study, we created an acoustic model of zebrafish lateral line hair cells to create a synaptic acoustic impairment model. Using an ultrasonic generator, at various frequencies and outputs, the cavitation phenomenon occurred at low frequencies and high outputs, which hindered the juveniles themselves, but at high frequencies and low outputs, without disturbing the juveniles, it was possible to damage the lateral line hair cells. Using this model, we screened Kampo medicines, etc.

研究分野：耳鼻咽喉科学分野

キーワード：内耳保護 ゼブラフィッシュ 側線器 有毛細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な内耳へのストレス(強大音、加齢、薬剤)によって引き起こされる難聴(騒音性難聴、加齢性難聴、薬剤性難聴)や平衡障害等の内耳障害は、補聴器、人工内耳などの治療を必要とし、患者の QOL を低下させる要因となる。近年、内耳感覚細胞である有毛細胞のシナプス障害が内耳障害と密接に関係していると報告されるようになってきている。しかし、シナプスを保護する薬物治療は確立していない。

(2) ゼブラフィッシュは、一度に 200-300 匹産卵するため、容易に多数の個体を得る事ができる。人との遺伝子の相同性も約 80%と報告されており、発生・構造も人と似ていることから、薬剤を中心としたスクリーニング実験等に用いられている(Graham J, et al 2007)。その側線器有毛細胞は体表面にあるため可視化が非常に容易であり、かつ内耳有毛細胞と構造学的・生理学的に酷似している。これは側線器有毛細胞が内耳有毛細胞に進化したためである。

(3) 我々は、有毛細胞障害を起こす抗癌剤を同定するスクリーニング(Hirose Y, et al 2011)や、サプリメント類や漢方薬などの有毛細胞保護薬物を同定する実験を報告してきた。しかし、近年内耳有毛細胞のシナプスが内耳障害に対して重要な役割を果たしている報告がある一方で、保護薬物治療の確立には至っていない。

## 2. 研究の目的

(1) げっ歯類での強大音による内耳障害モデルは確立されており、それに伴うシナプス障害も報告されている。一方で、ゼブラフィッシュ稚魚にて超音波による側線器有毛細胞の障害モデルは確立されていないため、音波による障害モデルを作成する。

(2) 超音波モデルでの活性酸素種 (ROS) やミトコンドリア機能の評価を行う。

(3) 超音波モデルに内耳保護候補薬物をスクリーニングすることで、有毛細胞を保護する薬物を同定することで、シナプス保護候補薬物を同定する。

## 3. 研究の方法

### (1) 超音波モデルの作成実験

生後 5 日目の野生型ゼブラフィッシュを用いた。1 次抗体として anti-parvalbumin を用い、有毛細胞を免疫染色し標本とした。蛍光顕微鏡で有毛細胞をカウントシグラフを作成した。

#### 音響スピーカーによる音波障害

図 1 のようにスピーカーの下に、稚魚を入れた 48 凹プレートを設置し、音響負荷は 4 kHz 中心のオクターブバンドノイズ、130 dB SPL、3 時間 (モルモット類の Permanent threshold shift モデル) での暴露を行い、暴露後 48, 72 時間で標本とした。

#### 超音波洗浄機を用いた障害モデル

島津製作所、SUS-103、周波数は 28、45、100kHz の 3 周波数、出力は 100W (可変不能)(図 2) を用いた。洗浄機に水を入れ、稚魚を入れた 48 凹プレートを浮かばせた。暴露時間は 5 ~ 180 分で行い、暴露後 24, 48, 72 時間で標本とした。

#### 可変型超音波発生装置 (図 3) を用いた音波障害モデル

ゼブラフィッシュ稚魚を用い、装置はカイジョー、QUAVA mini リアクター、周波数: 35、100、160kHz 出力は可変型 (1-50W)(図 3) での音波障害モデルを試みた。

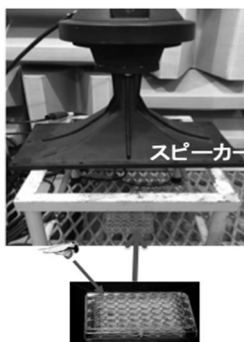


図 1



図 2



図 3

- (2) 超音波による側線器有毛細胞での活性酸素種の発生、ミトコンドリア機能  
 使用材料は生後 5 日目のゼブラフィッシュ稚魚を用い、音波障害：160kHz、10W、1 時間とし、障害直後、24、48 時間後に H<sub>2</sub>DCFDA での染色を行い ROS の評価を行った。輝度は Image J で評価を行った。  
 同様のモデルを用いて、ミトコンドリア機能を MitoTracker Red CMXRos にて染色を行い、輝度は Image J にて評価した。
- (3) スクリーニング  
 生後 5 日目のゼブラフィッシュ稚魚を用い漢方薬(小柴胡湯、黄連解毒湯、当帰芍薬散、四逆散、補中益気湯、十全大補湯、温清飲、四物湯)を投与したのち、音波による有毛細胞障害モデル：160kHz、10W、1 時間とし、障害 48 時間後に固定、有毛細胞残存率を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 超音波モデルの作成結果

###### 音響スピーカーによる音波障害

図 4 に示すように、control 群に有毛細胞は保たれているが、音響障害 72 時間後では有毛細胞が一部消失していた。Control 群の有毛細胞を 100%とし、音響障害直後から 72 時間後のグラフでは、直後、48 時間後には有毛細胞は消失していなかったが、72 時間後には有意に有毛細胞が障害されていた。ただ、障害としては軽度であり、モデルには不十分だと思われた。

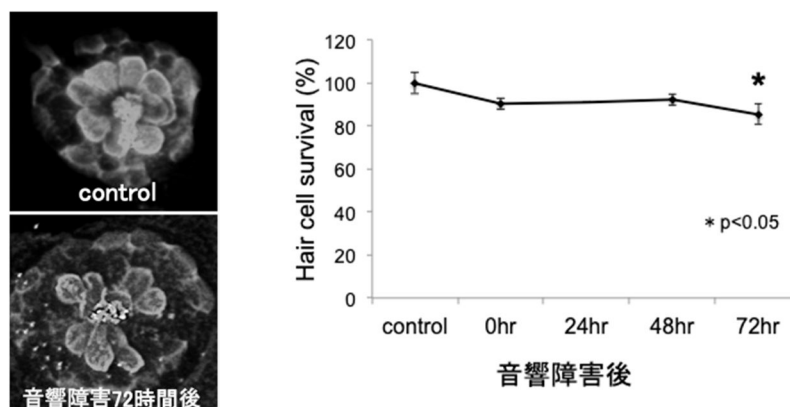
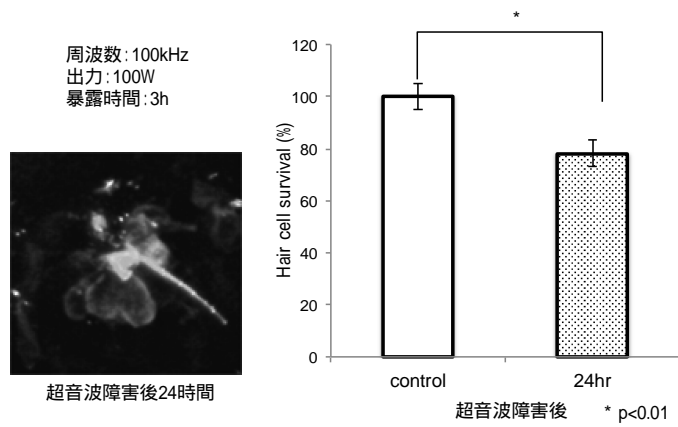


図 4

###### 超音波洗浄機を用いた障害モデル

周波数：28kHz、出力：100W、暴露時間：5min では、稚魚自体が障害され生存できなかった。また同様に、周波数：45kHz、出力：100W、暴露時間：5min でも同様の結果であった。周波数：100kHz、出力：100W、暴露時間：3h では有毛細胞は 20%程度障害されるものの、2/3 の稚魚は生存できなかった(図 5)。周波数：100kHz、出力：100W、暴露時間：1h では 30%程度障害されるものの、やはり一部稚魚が生存できなかった。以上のことから、高出力である 100W での暴露は難しいと判断した。



2/3の稚魚は生存できず

図 5

可変型超音波発生装置（図 3）を用いた音波障害モデル  
周波数：35kHz、出力：10W、暴露時間：30min では有毛細胞が障害されるも、やはり一部稚魚は生存できなかった。周波数：35kHz、出力：1W、暴露時間：30min では稚魚を障害することなく、有毛細胞を障害することができた。周波数 100kHz、160kHz では出力 1, 10W、暴露時間 30～180min でいずれも有意に有毛細胞が障害された（図 6）。

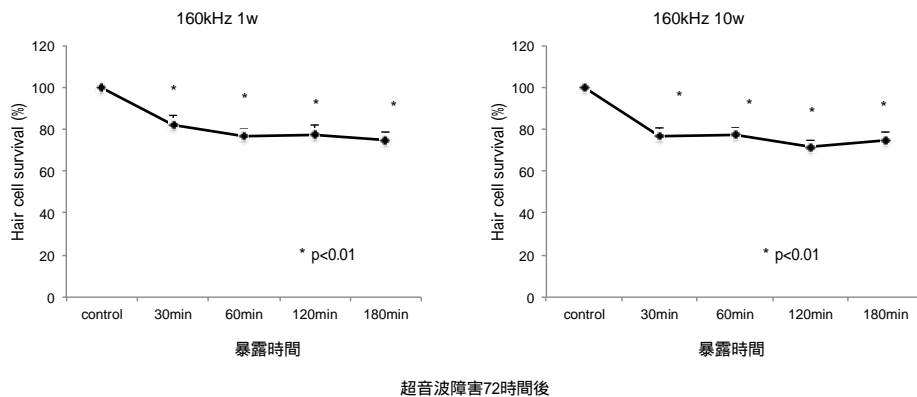


図 6

以上の実験結果より、最適なモデルは周波数 160kHz、出力 10W、暴露時間 60min であると考え、これを音波障害モデルとした。

(2) 超音波による側線器有毛細胞での活性酸素種の発生、ミトコンドリア機能

図 7 に障害直後、24、48 時間後に H<sub>2</sub>DCFDA での染色の結果を示す。超音波暴露直後に ROS は上昇しており、その後は徐々に染色が弱くなっていくのがわかる。図 8 に示すように、暴露直後は有意に染色が強くなるが、24、48 時間後に有意差を認めなかった。

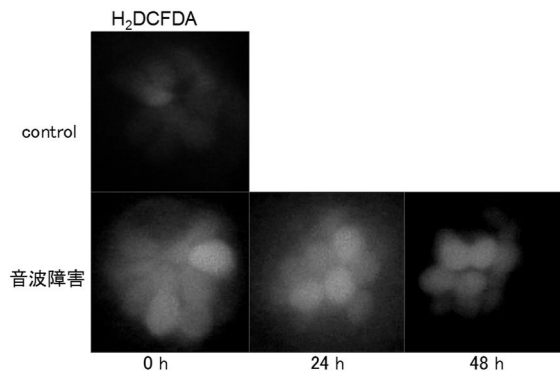


図 7

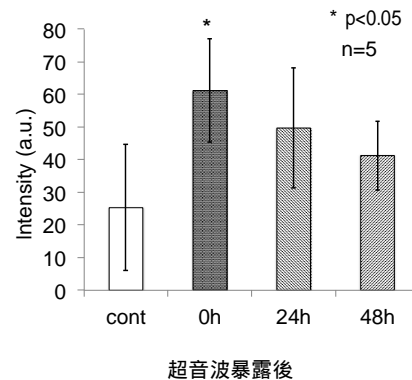


図 8

図 9 に障害直後、24、48 時間後に MitoTracker Red CMXRos での染色の結果を示す。超音波暴露直後に染色は低下しており、その後は更に染色が弱くなっていた。グラフを作成すると、暴露直後、24、48 時間後に有意差に低下しており、ミトコンドリアの機能障害が疑われた。

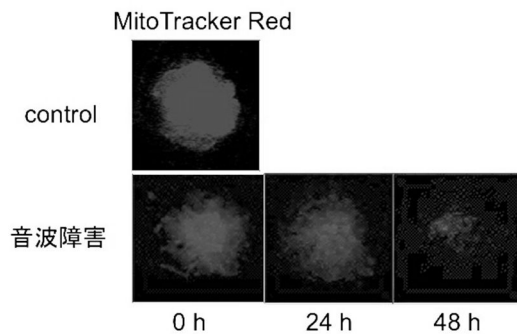


図 9

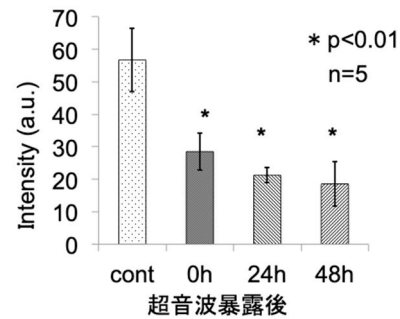


図 10

### (3) スクリーニング

小柴胡湯、黄連解毒湯、当帰芍薬散、四逆散、補中益気湯、十全大補湯、温清飲、四物湯のスクリーニングを行ったが、有毛細胞保護傾向は見られたが有意差は見られなかった。原因としては、有毛細胞の障害が軽度であること、げっ歯類の音響障害による有毛細胞障害は暴露後 1～2 週間程度で起こり、今回の暴露後 48 時間では暴露後の評価期間が短いと考えられた。ただ、有毛細胞は消失後 3 日ごろから再生されると報告されており、これらは今後の課題であると考えられた。

### < 引用文献 >

1. Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat Rev Genet.* 2007;8(5):353-367.
2. Hirose Y, Simon JA, Ou HC. Hair cell toxicity in anti-cancer drugs: evaluating an anti-cancer drug library for independent and synergistic toxic effects on hair cells using the zebrafish lateral line. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2011;12(6):719-728.
3. Hirose Y, Sugahara K, Kanagawa E, Takemoto Y, Hashimoto M, Yamashita H. Quercetin protects against hair cell loss in the zebrafish lateral line and guinea pig cochlea. *Hear Res.* 2016;342:80-85.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 広瀬敬信、菅原一真、竹本洋介、山下裕司
2. 発表標題 超音波発生装置によるzebrafish側線器有毛細胞障害モデル作成の試み
3. 学会等名 第35回 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 広瀬敬信、菅原一真、竹本洋介、山下裕司
2. 発表標題 超音波によるzebrafish側線器有毛細胞障害モデル作成の試み
3. 学会等名 日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 広瀬敬信、菅原一真、竹本洋介、山下裕司
2. 発表標題 zebrafish側線器有毛細胞音波障害モデルのメカニズム
3. 学会等名 日本耳科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshinobu Hirose, Kazuma Sugahara, Yousuke Takemoto, Makoto Hashimoto, Hiroshi Yamashita
2. 発表標題 Hair cell cytotoxicity model of zebrafish lateral line by ultrasonic generator
3. 学会等名 Association for Research in Otolaryngology 41st Annual MidWinter Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 広瀬敬信、菅原一真、竹本洋介、山下裕司
2. 発表標題 zebrafish側線器有毛細胞の音波障害モデル作成の試み
3. 学会等名 第26回日本耳科学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	菅原 一真  (SUGAHARA Kazuma)  (20346555)	山口大学・大学院医学系研究科・准教授    (15501)	