

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：82736

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860089

研究課題名(和文) 神経堤細胞の制御分子を標的にした騒音性難聴予防法の開発

研究課題名(英文) Attempt to develop a prevention against environmental stress-related hearing loss.

研究代表者

後藤 裕子 (Goto, Yuko)

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター(試験管理部、病理・その他部局等・研究員)

研究者番号：80722090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、内耳のラセン神経節に発現する神経堤細胞の制御分子である分子Eに注目し、騒音や農薬などの環境因子の一つであるネオニコチノイド(NN)系農薬が誘発する聴覚障害の発症機序の解析を進めた。NN系農薬が結合する受容体(nAChR)は哺乳類の内耳にも存在し、神経系細胞株において神経堤細胞の制御分子の一つであるSox10により発現が制御される事が報告されている。本研究ではNN系農薬の一つであるアセタミプリドをマウスに4週間飲水投与し、聴性脳幹反応測定を実施した。その結果、NN系農薬投与群で聴力の低下傾向が見られたため、内耳における分子Eの発現の解析を試みたが、分子Eの発現を確認するに至らなかった。

研究成果の概要(英文)：This study analyzed hearing loss in mice caused by environmental stresses including noise and pesticides in order to clarify a role of molecule E, which has been shown to express in auditory neurons. Neonicotinoide (NN-pesticide) is known to one of the pesticides to suppress the function of nAChR in insects. nAChR has been shown to express in inner ears in mammals and to be regulated by Sox10 which is one of the E-related molecules. Thus, it is possible that the NN-pesticide affects hearing. However, there is no study showing the correlation between NN-pesticide and hearing levels in mice. We exposed mice to acetamiprid which is one of the NN-pesticides via drinking water for 4 weeks. Auditory brainstem response showed a tendency to be decrease of hearing in exposed group. Furthermore, we tried qPCR to determine expression levels of molecule E in inner ears from mice exposed to environmental stresses such as NN-pesticide. However, the expression of molecule E was not able to evaluated.

研究分野：医歯薬学

キーワード：環境ストレス 難聴 内耳

1. 研究開始当初の背景

ポータブルミュージックプレイヤーなどの普及に伴い、若者に限らず多くの人々が長時間の音ストレスに曝される機会が確実に増えている。このような環境ストレスは騒音性難聴を誘発し、その患者数は2015年には世界で数億人に達すると推計されている(Lancet 2007)。しかしながら、騒音性難聴の有効な予防方法はなく、騒音性難聴を治療することは現在のところ不可能である。また、騒音だけではなく農薬などの有機化合物の曝露と聴覚障害の関連がヒトで示唆されている(Am. J. Ind. Med. 2001)。このような状況から、騒音や有機化合物などの環境因子の曝露による聴覚障害を緩和させる、あるいはその進行を遅らせる抜本的な予防・治療方法の開発は急務である。一方、神経堤(neural crest)細胞制御遺伝子、分子Eは色素異常及び先天性難聴を伴うワーデンブルグ症候群の原因遺伝子の一つとして、内耳血管条の中間細胞(色素細胞)の発達に関与している事が知られている(Hum. Mol. Genet. 1995)。

ネオニコチノイド(NN)系農薬は正常な神経伝達の遮断および異常な神経伝達を引き起こすことで殺虫効果を示す事が知られており、近年、その使用量が増加の一途をたどっている。一方、NN系農薬の受容体であるnAChRは哺乳類の内耳にも存在している事が報告されており(Brain Res. 1997)、神経系細胞株において神経堤細胞の制御分子の一つであるSox10により発現が制御される事が報告されている(J. Neurosci. 1999)。これらの事から、NN系農薬が耳毒性を示す可能性が考えられる。しかしながら、NN系農薬が哺乳類の聴覚系に与える影響は未だ報告されていない。また、分子Eはラセン神経節に発現しているが、聴覚に影響をおよぼす環境因子が聴神経系に発現している分子Eに与える影響は全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究は、内耳のラセン神経節に発現する神経堤細胞の制御分子である分子Eに注目し、将来的にこの分子を標的にした聴覚障害の予防法を開発する事を目標に、騒音等の環境因子が誘発する聴覚障害の発症機序の解析を進めた。

3. 研究の方法

3.1. 農薬曝露

NN系農薬の1種で、体内での代謝が比較的遅いと報告(Chem. Res. Toxicol. 2006)があるアセタミプリド(以下ACE、関東化学株式会社)をオスのC57BL/6マウス(4週齢)に飲水投与した。投与濃度は、10 mg/kg/dで摂取する値に設定した。ACE投与期間は1か月とし、ACEの加水分解による半減期が最短で13日であったことから(環境省 2013)、1週間おきに投与する水を交換した。また、週に1回、体重、摂餌量、飲水量の測定を行

った。投与群(n=16)の対照としてACEを投与しない非投与群(n=32)も同様に飼育し、測定を行った。統計的有意差はt検定により求めた。本研究は、中部大学動物実験委員会の承認を受け(2610016)、中部大学動物実験指針に基づき行った。

3.2. 聴力および平衡感覚の測定

聴力として聴性脳幹反応(ABR)システム(PowerLab2/25; AD Instruments, Castle Hill, Australia. System 3; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL. ER-1; Cygnus Technology, Southport, NC)を用いて週に1回測定を行った。ABRでは4、12、20、32 kHzの周波数で、徐々に音量をあげていき、聴こえた最小値を記録した。測定したABR波形I-V波のうち、内耳の聴神経を起源とするI波を対象に投与前と投与後の高さの解析も行った。

平衡感覚としてローターロッド(Ugo Basile, Italy, Varese)および平均台を用いて週に1回測定を行った。ローターロッドでは5 rpmから回転させ、5分間で40 rpmまで回転速度を上げる間にマウスが落下した時間と落下した時の回転速度を記録した。1回の測定は5分間までとし、1回測定するごとに5分間の休憩を挟んで5回測定して平均値を算出した。平均台では直径1.5 cm、長さ60 cmの木製の棒を渡り終えるまでの時間および落下回数を測定した。1回の測定時間は最大で60秒とした。1匹につき5回測定したうちの最小値と最大値を除いた3回の測定値の平均値を算出した。

3.3. 内耳中の残留農薬の分析

内耳中の農薬蓄積を検討するため、ACE投与期間終了後にマウスの内耳を採取した。採取した内耳にアセトニトリルを添加してホモジナイズした後に無水硫酸ナトリウムで脱水し、遠心分離後に上澄みを分取した。上澄みをC18カートリッジで脱脂した後、窒素ガスを吹き付けて濃縮、定容し、分析に用いた。この方法による回収率は92.1±16.2% (n=3)であった。ACEの定量には液体クロマトグラフィー質量分析計を用いた。液体クロマトグラフィーとしてACQUITY UPLC SYSTEM (Waters, Milford, MA) 分析カラムとしてACQUITY UPLC BEH C18 (内径1.0 mm、長さ100 mm)を用い、流量は0.1 mL/min、カラム温度は40°Cで行った。移動相にはA: 0.01%ギ酸水溶液/アセトニトリル(9:1)およびB: 0.02%ギ酸アセトニトリルを用い、流量は0.1 mL/min、カラム温度は40°Cでグラジエント分析(A: 100% (10分) A: 30%、B: 70% (3分) B: 100% (2分) A: 100%)を行った。質量分析装置にはAB SCIEX 4000 QTRAP (AB SCIEX, Redwood City, CA)を用い、対象物質はESI法のポジティブモードで測定した。定量限界は1 ng/mLであった。

3.4. 内耳における酸化ストレスの測定
酸化ストレスの指標として、ACEを投与したオスマウスの生殖器官において有意に増加したとの報告がある脂質過酸化物の分解生成物であるマロンジアルデヒド(MDA)および一酸化窒素(NO)を対象に(Agr. Sci. China 2011) ACE投与期間終了後に採取したマウスの内耳を用いて測定した。MDAの測定にはTBARS(TCA Method) Assay Kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) NOの測定にはNitric Oxide(total), detection kit(Enzo, Farmingdale, NY)を用いた。いずれもマイクロプレートリーダーによる吸光度の測定により定量を行った。MDAは531nm、NOは540nmで測定した。

3.5. 分子Eの発現レベルの解析
ACE投与期間終了後に採取したマウスの内耳からHigh Pure RNA Tissue Kit(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を用いてRNAを抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いて逆転写反応を行い、相補的DNA(complementary DNA; 以下cDNA)を合成した。合成したcDNAを用いて定量的RT-PCRを施行し、分子Eの発現レベルの解析を試みた。

4. 研究成果

4.1. 体重

投与群と非投与群で体重変化に有意な差はみられなかった。

4.2. 摂餌量

投与群と非投与群で摂餌量に有意な差はみられなかった。

4.3. 飲水量

投与群と非投与群で飲水量に有意な差はみられなかった。

4.4. 聴力

投与群の聴力レベルは非投与群に比べて低下傾向が観察された。また、I波の高さを解析したところ、投与群の聴こえの感度の低下傾向が見られた。

4.5. 平衡感覚

ローターロッドの回転速度および回転時間、平均台を渡り終えるまでの時間および落下回数、いずれにおいても投与群と非投与群に有意な差は見られなかった。

4.6. 内耳中の残留農薬

ACE投与終了後のマウスの内耳からACEは検出されなかった。

4.7. 内耳における酸化ストレス

投与群と非投与群で内耳におけるMDAおよ

びNO濃度に有意な差は見られなかった。

4.8. 内耳における分子Eの発現レベル
内耳における分子Eの発現レベルの解析を試みたが、分子Eの内因性コントロールとして用いたアクチンの発現は確認できたものの、分子Eの発現を確認するに至らなかった。

5. まとめ

本研究ではNN系農薬が聴覚系に与える影響を検討した。NN系農薬の1つであるアセタミプリドを10mg/kg/dの用量でマウス(C57BL/6系統、オス、4週齢、n=16)に4週間飲水投与し、経時的にABR測定を実施したところ、投与群の聴力レベルに低下傾向が観察された。また、I波の高さを解析したところ、投与群の聴こえの感度の低下傾向が見られた。体重、摂餌量、飲水量、平衡感覚にはACE投与による影響は見られなかった。また、投与終了後の内耳を用いてACEの内耳への蓄積および酸化ストレスレベルを検討したところ、ACE蓄積は見られず、酸化ストレスレベルにもACE投与による影響は見られなかった。以上、有意ではないもののNN系農薬が聴力に影響する可能性が示唆されたため、内耳における分子Eの発現レベルの解析を試みたが、分子Eの発現を確認するに至らなかった。

<引用文献>

Lancet 2007
Am. J. Ind. Med. 2001
Hum. Mol. Genet. 1995
Brain Res. 1997
J. Neurosci. 1999
Chem. Res. Toxicol. 2006
環境省 2013
Agr. Sci. China 2011

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)

[学会発表](計2件)

後藤 裕子, 浅井 優希. ネオニコチノイド系農薬の耳毒性の検討. 第32回農薬環境科学研究会, 静岡(2014.11)

後藤 裕子. 小型哺乳類の聴覚に対するネオニコチノイド系農薬の影響. 第63回日本生態学会, 宮城(2016.3)

6. 研究組織

(1)研究代表者

後藤 裕子(GOTO Yuko)

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター・試験管理部・主任研究員

研究者番号: 80722090

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし