

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09384

研究課題名(和文)新規耳鳴治療のための耳鳴動物実験モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of an experimental tinnitus animal model for the new treatment of tinnitus

研究代表者

山下 哲範 (YAMASHITA, AKINORI)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：50588522

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)：我々は、過去に報告されたサリチル酸誘発耳鳴動物モデルを自施設で再現し、最も耳鳴行動が観察される条件を確定させた。この動物モデルに対して、耳鳴患者に臨床上用いられる漢方薬の牛車腎気丸を内服させると、蒸留水内服群と比較して耳鳴行動は抑制された。次に牛車腎気丸が脳に与える影響を神経活動の指標であるc-Fosを用いて検討した。一次聴覚野、二次聴覚野背側、背側蝸牛神経核、下丘中心核において牛車腎気丸はサリチル酸によるc-Fos発現細胞数の増加を有意に抑制した。牛車腎気丸はこれらの領域の神経活動を抑制することで耳鳴を抑える可能性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により牛車腎気丸がサリチル酸誘発耳鳴に対して動物行動学的、免疫組織化学的な検討の両方で抑制効果を及ぼすことを示した。これまで漢方薬の耳鳴への効果を動物実験により検証されたことはなく、世界で初めての試みであった。本研究は牛車腎気丸の耳鳴への有用性の根拠となるものであり、耳鳴治療法の確立の一助となりえるものである。また、耳鳴への内服薬の効果を検証する動物実験のモデルケースとなりうるもので、今後、別の内服薬や別の耳鳴を検討する研究につなげることも可能となる。

研究成果の概要(英文)：We replicated a previously reported salicylic acid-induced tinnitus animal model and determined the conditions under which the most tinnitus behavior was observed. In this animal model, tinnitus behavior was suppressed in the tinnitus rats model induced by salicylic acid which were given the Japanese traditional herbal medicine(Goshajinkigan), as compared to those which were given distilled water. Next, the effects of Goshajinkigan on the brain were examined using c-Fos, a measure of neural activity. In the primary auditory cortex, dorsal secondary auditory cortex, dorsal cochlear nerve nucleus, and central nucleus of the inferior colliculus, Goshajinkigan suppressed the salicylic acid-induced increase in the number of c-Fos-expressing cells. It was found that Goshajinkigan may suppress tinnitus by inhibiting neural activity in these regions.

研究分野：聴覚医学

キーワード：耳鳴 漢方薬 動物モデル c-fos

### 1. 研究開始当初の背景

耳鳴は多くの人々が悩まされる事象であるにも関わらず、発生機序は解明されておらず、有効な薬物療法が確立されていない。

耳鳴の客観的な評価には、耳鳴動物モデルが用いられる。これまで、サリチル酸などの耳毒性薬剤を投与することで耳鳴を誘発し、耳鳴を動物の行動により評価する実験が行われてきた。そのなかでも Kizawa らが考案した耳鳴動物モデル ( Kizawa, K. 2010) は自施設で再現が可能な実験系と考えられたため、まずその実験系の確立を目標とした。

牛車腎気丸は、臨床上、耳鳴への効果を指摘されている漢方薬の一つ ( Ohnishi, S. 1994) であるが、動物実験でその効果を検証した報告はこれまで無かった。我々は前述の動物行動実験を応用して牛車腎気丸の耳鳴への影響を検証することにした。

サリチル酸耳鳴を生じると聴覚領域の一部の神経活動が活発になることが知られている。これまでの研究では、脳神経の活動を評価するマーカーとして知られる c-Fos を用いた研究 ( Santos P. 2017; Wallhausser-Franke E. 2003) を散見する。我々は c-Fos を用いて牛車腎気丸が実際に脳の聴覚関連領域の神経活動に影響を及ぼすのかを調べることにした。

### 2. 研究の目的

- (1) Kizawa らが考案した耳鳴動物モデルを自施設で再現すること。
- (2) 耳鳴動物モデルに牛車腎気丸を投与して耳鳴行動が減少するか調べること。
- (3) 牛車腎気丸投与により c-Fos 発現が減少するかを調べること。

### 3. 研究の方法

(1) 過去に報告されている「Kizawa らのラット耳鳴モデル」の再現をおこなった。この耳鳴モデルは電気刺激によって隣の部屋に逃避する行動を観察するための装置 (図1) を用い、5秒間音を呈示し、1秒後にラットのいる側の部屋の床に電気刺激をあたえることを繰り返す。条件付けができると音呈示だけで隣の部屋に移る逃避行動を示すようになる (図2)。このラットにサリチル酸 (400mg/kg) を投与し耳鳴をおこさせると、音呈示がないときにも逃避行動を起こすようになる。このようにラットが音呈示がないにもかかわらず部屋移動 (耳鳴行動) する数 (False positive) をカウントすることで耳鳴の程度を評価することができる。

False positive が最も多くなる音が、ラットが感じる耳鳴に近い音と考えられるので、呈示する音の周波数や音圧レベルを変化させて、我々の施設で行う実験系で用いるのに最適な呈示音を調べた。96匹の雄の Wistar 系ラット (8~23週齢、172~360g) を用いて、周波数を 12kHz、16kHz、20kHz (いずれも 60dB)、音圧レベルを 40dB、60dB、80dB (いずれも 16kHz) で呈示音を変えて耳鳴に近い音を調べた。

(2) 牛車腎気丸が耳鳴行動に与える効果を調べた。36匹の雄の Wistar 系ラットに対してコントロール群 (生理食塩水 + 蒸留水投与)、サリチル酸投与群 (サリチル酸 + 蒸留水投与)、牛車腎気丸 0.3g/kg/日投与群 (サリチル酸 + 牛車腎気丸 0.3g/kg/日投与)、牛車腎気丸 1.0g/kg/日投与群 (サリチル酸 + 牛車腎気丸 1.0g/kg/日投与) を設定し、耳鳴行動の回数を比較した。

(3) c-Fos を用いた免疫組織学的手法により中枢神経の神経活動を評価した。生理食塩水 + 蒸留水投与群と、サリチル酸 + 蒸留水投与群と、サリチル酸 + 牛車腎気丸 1.0g/kg/日投与群とを6匹ずつ設定し、それぞれの脳組織切片を作成 (図3) し、c-Fos 陽性細胞の単位面積当たりの個数を、一次聴覚野 (A1)、二次聴覚野 (AuD, AuV)、内側膝状体 (MGB)、背側蝸牛神経核 (DC)、下丘中心核 (ICc) の各部位でカウントし、各群を比較した。

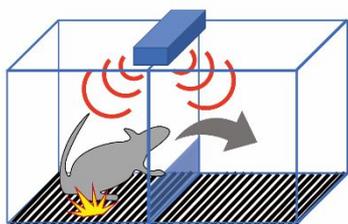


図1 実験装置の概略図



図2 実験中の画像

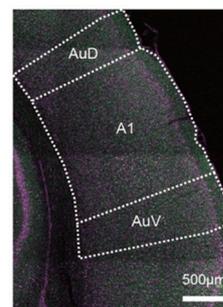


図3 共焦点レーザー顕微鏡像

#### 4. 研究成果

(1) 音圧レベルは 40dB と 60dB は 80dB よりも有意に耳鳴行動が増加し、周波数は有意差を認めなかった (図 4)。60dB、16kHz の条件が有意に大きいとは言えない結果だった。このことは条件刺激に適した音圧と周波数はある程度広く分布していることが示唆される。一部のサリチル酸耳鳴行動実験の結果 (60dB 程度, 10 - 16kHz) を支持する結果だった ( Yang, G. 2007; Ralli, M. 2010; Hu, S.S. 2014; Xia, C. 2020 )。

(2) コントロール群とサリチル酸投与群との比較をおこなうと、サリチル酸により耳鳴行動が有意に増加していた。サリチル酸投与群と牛車腎気丸 1.0g/kg/日投与群との比較により、牛車腎気丸 1.0g/kg/日 が有意に耳鳴行動を抑制することが分かった (図 5)。このことは牛車腎気丸がサリチル酸誘発耳鳴ラットの耳鳴行動を抑制することを示す。

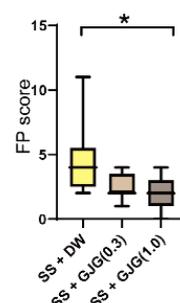
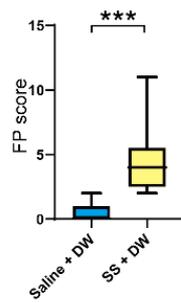
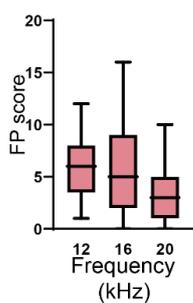
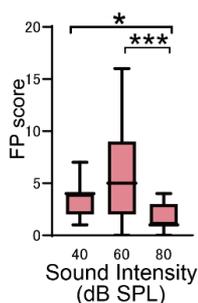


図 4 音圧レベルもしくは周波数別の耳鳴行動比較  
Median (interquartile range). Dunn's test. 40dB ( $n = 19$ ), 60dB ( $n = 31$ ), 80dB ( $n = 12$ ), 12kHz ( $n = 17$ ), 16kHz ( $n = 31$ ), 20kHz ( $n = 17$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.0005$

図 5 内服を伴う耳鳴行動実験  
Median (interquartile range). Mann-Whitney  $U$  or Dunn's test.  $n = 9$  each group. \*\*\* $p < 0.0005$ , \* $p < 0.05$

(3) コントロール群とサリチル酸投与群との比較で、サリチル酸が一次聴覚野、二次聴覚野腹側・背側、内側膝状体における c-Fos 発現細胞数を有意に増加させた。これは以前のスナネズミを用いた研究 ( Wallhäusser-Franke, E. 2003 ) と同様であった。サリチル酸投与ラットに牛車腎気丸を投与したところ、一次聴覚野、二次聴覚野背側、蝸牛神経核、下丘中心核で c-Fos 発現細胞数を有意に減少させた (図 6)。牛車腎気丸はこれらの領域の神経活動を抑制することで耳鳴を抑える可能性があることがわかった。

本研究は牛車腎気丸が耳鳴を抑制することを動物実験で示した初めてのエビデンスである。本研究が耳鳴の発生機序の解明や治療法の確立の一助になることを期待する。

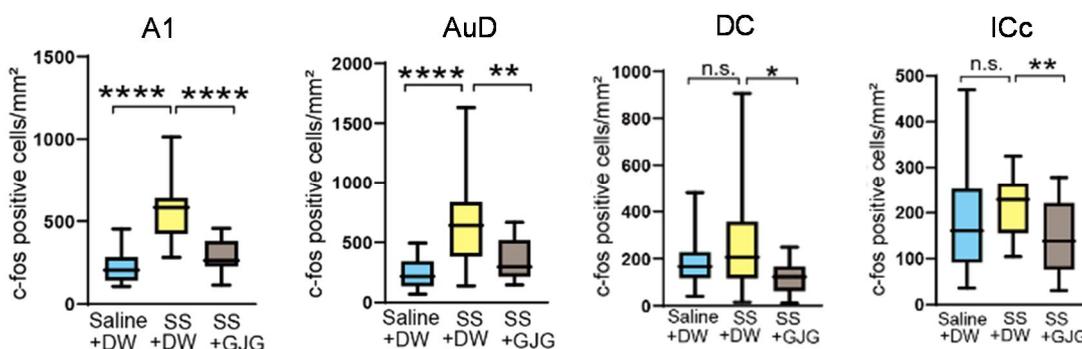


図 6 c-Fos による免疫組織学的実験

Median (interquartile range). Mann-Whitney  $U$  test,  $n = 6$  in each group. \*\*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p < 0.005$ , \* $p < 0.05$

Kizawa, K.; Kitahara, T.; Horii, A.; Maekawa, C.; Kuramatsu, T.; Kawashima, T.; Nishiike, S.; Doi, K.; Inohara, H. Behavioral assessment and identification of a molecular marker in a salicylate-induced tinnitus in rats. *Neuroscience* 2010, 165, 1323-1332.

大西信治郎、澤木修二、土屋幸造、柊光一、谷内晶子、古川政樹、和田廣巳、田中洋二、伊藤真郎、坊野馨二、沼田早恵子、竹田英子、牛嶋達次郎、山口宏也、和田昌士、堤内邦彦、田中省三、野崎信行. TJ-107(ツムラ牛車腎気丸)の多施設共同臨床試験による耳鳴に対する効果. *耳鼻咽喉科展望* 1994, 37, 371-379.

Santos, P.; da Silva, L.E.; Leão, R.M. Specific immediate early gene expression induced by high doses of salicylate in the cochlear nucleus and inferior colliculus of the rat. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2017, 83, 155-161.

Wallhäusser-Franke, E.; Mahlke, C.; Oliva, R.; Braun, S.; Wenz, G.; Langner, G. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp. Brain Res.* 2003, 153, 649-654.

Yang, G.; Lobarinas, E.; Zhang, L.; Turner, J.; Stolzberg, D.; Salvi, R.; Sun, W. Salicylate induced tinnitus: Behavioral measures and neural activity in auditory cortex of awake rats. *Hear. Res.* 2007, 226, 244-253.

Ralli, M.; Lobarinas, E.; Fetoni, A.R.; Stolzberg, D.; Paludetti, G.; Salvi, R. Comparison of salicylate- and quinine-induced tinnitus in rats: Development, time course, and evaluation of audiologic correlates. *Otol. Neurotol.* 2010, 31, 823-831.

Hu, S.S.; Mei, L.; Chen, J.Y.; Huang, Z.W.; Wu, H. Expression of immediate-early genes in the inferior colliculus and auditory cortex in salicylate-induced tinnitus in rat. *Eur. J. Histochem.* 2014, 58, 2294

Xia, C.; Yin, M.; Wu, C.; Ji, Y.; Zhou, Y. Neuroglial activation in the auditory cortex and medial geniculate body of salicylate-induced tinnitus rats. *Am. J. Transl. Res.* 2020, 12, 6043-6059.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitano Koichi, Yamashita Akinori, Sugimura Taketoshi, Okayasu Tadao, Sakagami Masaharu, Osaki Daisuke, Kitahara Tadashi, Saito Yasuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Behavioral and Immunohistochemical Evidence for Suppressive Effects of Goshajinkigan on Salicylate-Induced Tinnitus in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 brain science	6. 最初と最後の頁 587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci12050587.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yokota Yoshihiro, Yamashita Akinori, Koyama Shinji, Kitano Koichi, Otsuka Shintaro, Kitahara Tadashi	4. 巻 47（5）
2. 論文標題 Retrospective evaluation of secondary effects of hearing aids for tinnitus therapy in patients with hearing loss	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx.	6. 最初と最後の頁 763-768
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kitahara Tadashi, Sakagami Masaharu, Ito Taeko, Shiozaki Tomoyuki, Kitano Koichi, Yamashita Akinori, Ota Ichiro, Wada Yoshiro, Yamanaka Toshiaki	4. 巻 46（2）
2. 論文標題 Meniere's disease with unremitting floating sensation is associated with canal paresis, gravity-sensitive dysfunction, mental illness, and bilaterality	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 186-192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okayasu Tadao, Nishimura Tadashi, Uratani Yuka, Yamashita Akinori, Nakagawa Seiji, Yamanaka Toshiaki, Hosoi Hiroshi, Kitahara Tadashi	4. 巻 696
2. 論文標題 Temporal window of integration estimated by omission in bone-conducted ultrasound	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurosci Lett.	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下 哲範、北野 公一、岡安 唯、西村 忠己、北原 糺
2. 発表標題 拍動性耳鳴を繰り返した脳硬膜動静脈瘤の一例
3. 学会等名 第6回耳鳴・難聴研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北野 公一、岡安 唯、山下 哲範、長谷 芳樹、杉村 岳俊、齋藤 康彦、北原 糺
2. 発表標題 ラット耳鳴モデルに対する漢方薬投与実験
3. 学会等名 第6回耳鳴・難聴研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下哲範、北野公一、齋藤 修、岡安 唯、西村忠己、山中敏彰、北原 糺
2. 発表標題 耳鳴患者における連続周波数自記オーディオメトリー
3. 学会等名 第65回日本聴覚医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北野公一、山下哲範、岡安 唯、北原 糺
2. 発表標題 サリチル酸ラット耳鳴モデルの再現と漢方薬投与によるラットへの影響
3. 学会等名 第30回日本耳科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 横田尚弘, 小山真司, 山下哲範, 北原 紘
2. 発表標題 補聴器を用いた耳鳴に対する音響療法について
3. 学会等名 第120回日本耳鼻咽喉科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中敏彰, 大山寛毅, 松村八千代, 伊藤妙子, 山下哲範, 太田一郎, 上村裕和, 藤田信哉, 北原 紘
2. 発表標題 ナビゲーション支援による内リンパ嚢開放術
3. 学会等名 第81回耳鼻咽喉科臨床学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下哲範, 西村忠己, 北野公一, 北原 紘
2. 発表標題 当科耳鳴外来の現状について
3. 学会等名 第5回耳鳴・難聴研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下哲範, 西村忠己, 藤田裕人, 山中敏彰, 北原 紘
2. 発表標題 完全な形でキヌタ骨が外耳道皮下に脱出した外傷性耳小骨離断の1例
3. 学会等名 第29回日本耳科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北野公一, 山下哲範, 長谷芳樹, 岡安 唯, 齋藤康彦, 北原 紘
2. 発表標題 ラット耳鳴モデルを使用した漢方研究
3. 学会等名 第35回日本耳鼻咽喉科漢方研究会
4. 発表年 2019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	北原 紘  (KITAHARA TADASHI)  (30343255)	奈良県立医科大学・医学部・教授   (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------