

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791199

研究課題名（和文）内耳虚血耐性とその機序

研究課題名（英文） Ischemic tolerance in the cochlea

研究代表者

竹田 将一郎（TAKEDA SHOICHIRO）

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70403821

研究成果の概要（和文）：スナネズミ一過性内耳虚血モデルを用いて、予め2分間一過性虚血を負荷した後に15分間一過性虚血を負荷する虚血耐性群と15分間一過性虚血のみを負荷するコントロール群を生理学的、組織学的に比較検討した。虚血耐性群ではコントロール群に比べ、ABR 閾値上昇と内毛細胞の脱落が軽減された。本実験の結果より、内耳に虚血耐性機構が存在することが示された。耐性獲得機序の解明を今後の課題としたい。

研究成果の概要（英文）：The present study clearly demonstrated ischemic tolerance phenomenon in the cochlea, using an animal model of transient cochlear ischemia, although it remains unclear how it works in prevention of an ischemic attack.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：内耳虚血、虚血耐性、有毛細胞、砂ネズミ

1. 研究開始当初の背景

突発性難聴は40~50歳代に好発し急激に発症して高度の感音性難聴をきたす疾患であり、現在我が国では年間約3万5000人が罹患する。本症の原因は未だ不明であるが、ウイルス性内耳障害説とともに内耳循環障害説が有力である(Am J Otol 20:587-595, 1999)。内耳の栄養動脈は脳底動脈の枝である迷路動脈のみであり、梗塞、塞栓、血管攣縮、動脈硬化や血管炎などによる血流障害で内耳機能障害を生じやすい。従って、臨床における突発性難聴や騒音性難聴などの急性感音性難聴の成因の一つとして、内耳循環障害説が古くから論じられてきた。

残念な事に内耳循環障害に関しては、適当な内耳虚血モデル動物がないために十分な検討がなされていなかった。そこで我々のグループは一過性内耳虚血の動物モデルを世界で初めて作成し(Neurosci Lett. 230:69-71, 1997)、その後数多くの新しい知見を報告した。我々がこれまでに行ってきた一連の研究によって、一過性内耳虚血により内毛細胞が外毛細胞に比べ優位に障害されること(J Comp Neurol. 418:217-26, 2000)、その障害は虚血後から3日目まで徐々に進行していくこと(Neuroreport. 13:2459-2462, 2002)、虚血によって蝸牛外リンパ中に過剰に放出されたグルタミン酸は、内毛細胞に局限するグルタミン酸受容体を介して進行性細胞死を引き起こし、最終的にはラセン神経節細胞も散在的変性をきたし難聴を引き起こすこと(J Comp Neurol. 456:105-11, 2003)などを明ら

かとした。

ところで致死的な脳虚血を負荷する前に予め軽微な虚血を負荷しておく、脳組織の障害は軽減され死滅を免れることが知られている。軽微な先行虚血によりその後の脳虚血障害が起こりにくくなるこの現象は、虚血耐性現象(ischemic tolerance)と呼ばれる。我々が世界に先駆けてこの虚血耐性現象を報告(Brain Res. 528:21-24, 1990: SCOPUSによると2007年10月現在でこの論文は実に512回引用されている)して以来、その保護機構を巡って多くの研究が報告されてきた。そして中枢神経は虚血という破滅的な病態に対して虚血耐性という対抗する手段を保持していることが明らかとなってきた(Nat Rev Neurosci. 7:437-448, 2006)。

実際には再発する患者もあるが、一般に突発性難聴はほとんど再発しないと言われている。このことが突発性難聴の主因が内耳循環障害では説明できない点であるとされてきた。しかしながら、中枢神経系と同様な耐性機構が内耳にあれば突発性難聴の主因が内耳循環障害であっても、再発しにくい理由を説明することが十分可能と考えられる。即ち内耳循環障害により突発性難聴が一度起こると、虚血耐性機構が発動し再発が起こりにくくなるという仮説である。この仮説を証明する為には、内耳に中枢神経系と同様な虚血耐性現象があるかどうかを検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では上記の仮説を証明する為に、一

過性内耳虚血の動物モデルを用いて、中枢神経系と同様な虚血耐性現象が内耳に見られるかどうか検討を行う。

3. 研究の方法

実験動物には 60～80g、雄のスナネズミを用いた。コントロール群として 16 耳、虚血耐性温群として 12 耳の計 28 耳について検討した。内耳一過性虚血は、ハロセン吸入麻酔下に仰臥位にて頸部正中切開を施行し両側の椎骨動脈を露出し血流を遮断・再開通することにより負荷した。コントロール群では 15 分間一過性虚血のみを負荷することとし、実験前と 15 分間一過性虚血の 1、4、7 日後の ABR 閾値を測定して聴力閾値の経時的变化を評価した。虚血耐性群では 15 分間一過性虚血を負荷する 2 日前に、予め 2 分間の一過性虚血を負荷することとし、実験前と 2 分間一過性虚血 1 日後および、15 分間一過性虚血の 1、4、7 日後の ABR 閾値を測定して聴力閾値の経時的变化を評価した。また両群とも、最終の ABR 閾値測定後に深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドにて経心灌流固定し骨髄を摘出した。実体顕微鏡下に基底回転のコルチ器を採取した。その後、核と聴毛の療法を観察するために PBS で 250 倍に希釈した口ダミン・ファロイジン(0.25% Triton-X-100、1%ウシ血清アルブミン)を用い室温で 30 分間染色し、PBS 洗浄後に 20 μ g/ml のヘキスト 33342 で 60 分間染色した。グリセロールで封入後、蛍光顕微鏡下(聴毛はグリーンフィルター:BP546,FT580,LP590、核は UV フィルター:BP365,FT395,LP397)に観察

し、確認可能な細胞中の脱落細胞率を算出した。

4. 研究成果

虚血耐性とは、組織に対して致死的な虚血を負荷する前に予め比較的軽微な虚血を負荷しておくこと、虚血による組織の障害が軽減される現象として報告されている。脳領域では、虚血性脳神経細胞障害に対し虚血前に予め軽微な虚血を加えることで 1~2 日後に負荷する致死的な虚血による障害が抑制されたとの報告がある。これに類似した現象は心筋虚血にでも確認されている。しかし、耳科領域においては現在のところ虚血耐性に関する報告はない。そこで、我々は内耳における虚血耐性について生理学的、組織学的に検討した。

実験動物には 60～80g、雄のスナネズミを用いた。コントロール群として 16 耳、虚血耐性温群として 12 耳の計 28 耳について検討した。内耳一過性虚血は、ハロセン吸入麻酔下に仰臥位にて頸部正中切開を施行し両側の椎骨動脈を露出し血流を遮断・再開通することにより負荷した。コントロール群では 15 分間一過性虚血のみを負荷することとし、実験前と 15 分間一過性虚血の 1、4、7 日後の ABR 閾値を測定して聴力閾値の経時的变化を評価した。虚血耐性群では 15 分間一過性虚血を負荷する 2 日前に、予め 2 分間の一過性虚血を負荷することとし、実験前と 2 分間一過性虚血 1 日後および、15 分間一過性虚血の 1、4、7 日後の ABR 閾値を測定して聴力閾値の経時的变化を評価した。また両群とも、

最終のABR閾値測定後に深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドにて経心灌流固定し骨胞を摘出した。実体顕微鏡下に基底回転のコルチ器を採取した。その後、核と聴毛の療法を観察するためにPBSで250倍に希釈した口ダミン・ファロイジン(0.25% Triton-X-100、1%ウシ血清アルブミン)を用い室温で30分間染色し、PBS洗浄後に20µg/mlのヘキスト33342で60分間染色した。グリセロールで封入後、蛍光顕微鏡下(聴毛はグリーンフィルター:BP546,FT580,LP590、核はUVフィルター:BP365,FT395,LP397)に観察し、確認可能な細胞中の脱落細胞率を算出した。

コントロール群では15分間一過性虚血7日目に34.3dBの閾値上昇が残った。一方、虚血耐性群では、2分間一過性虚血の聴力閾値上昇はほとんど認められず、15分間一過性虚血後の聴力閾値上昇は1、4、7日目いずれにおいてもコントロール群より軽減されていた。7日目の閾値上昇の平均値は10.7dBであり、コントロール群のそれとの間には有意な差が認められた。内有毛細胞の脱落細胞率の平均値は、コントロール群で基底回転が約15.2%、第2回転が8.6%、頂回転が1.4%であった。それに対し虚血耐性群では基底回転が約7.7%、第2回転が4.5%、頂回転が1.2%であった。基底回転内有毛細胞の脱落率では両者の間には統計学的な有意差が認められた。

脳領域の動物実験では、古くから虚血耐性もしくはそれに類似すると思われる現象の報告がなされている。しかし、虚血負荷を繰

り返すことで組織に対する障害は累積してより重度となるとの報告もなされており、両者は一見矛盾した現象にもとれるものであった。1990年Kitagawaらは虚血の負荷時間、間隔、回数の条件によって虚血耐性が誘導されることを示した。これが皮切りとなり虚血耐性現象についての様々な検討がなされ、現在では虚血以外の刺激が虚血障害を軽減する交差耐性(cross tolerance)や、先行虚血の部位が異なっても虚血耐性が誘導される遠隔耐性(remote tolerance)も報告されている。耐性獲得機序についての報告はまだ断片的なものであるが、虚血耐性は刺激の種類や部位によらず同様の効果が得られることから、共通のシグナル伝達機構を介した細胞障害防御メカニズムの存在が示唆されている。一方、耳科領域においては感音難聴の原因の一つに内耳虚血が挙げられており、本現象の検討はその病態解明および予防法の確立の一助となることが期待できる。本報告では同種の刺激を同一部位に負荷することによって内耳の虚血耐性が誘導されることを示した。耐性獲得機序の解明を今後の課題としたい。

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2件)

1. Takeda S, Hata R, Gao F, Yoshida T, Hakuba N, Hato N, Gyo K: Ischemic tolerance in the cochlea. *Neurosci Lett* 462(3): 263-266. 2009.査読有
2. 竹田将一郎、吉田正、秦龍二、白馬伸洋、兵頭純、羽藤直人、暁清文: 内耳における虚血耐性、頭頸部自律神経 23: 40~43、2009.査読無

[学会発表](計2件)

1. 竹田将一郎、吉田正、白馬伸洋、羽藤直人、暁清文: 内耳における虚血耐性、第19

回日本耳科学会総会学術講演会平成21年
10月8日～10日 東京

2. 竹田将一郎、吉田正、秦龍二、白馬伸洋、
兵頭純、羽藤直人、暁清文：内耳における虚
血耐性、第26回頭頸部自律神経研究会 平
成20年8月23日 大阪

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹田 将一郎 (TAKEDA SHOICHIRO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70403821