

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791814

研究課題名(和文)音響障害モデル動物を用いた難聴治療法の開発 - 細胞生物学的視点よりのアプローチ -

研究課題名(英文) Cellular biological investigation of cochlear function after acoustic trauma in animals models.

研究代表者

乾 崇樹 (Inui, Takaki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：60465614

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)：急性音響性聴覚障害モデル動物において、蝸牛内直流電位(EP)が低下することが知られている。無呼吸負荷や高濃度フロセミドの全身投与によってもEPは低下し、同時に蝸牛内リンパ腔のCa²⁺濃度([Ca]_e)が上昇する。高Ca²⁺濃度人工内リンパ液の注入により[Ca]_eを上昇させてもEPは変化せず、これにイオノマイシンの内リンパ腔投与を追加するとEPの低下が観察された。よって、EP低下に伴う二次的な事象として[Ca]_e上昇が起こり、内リンパ腔を取り巻く細胞の細胞内Ca²⁺濃度が、EPの維持・産生に重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It is known that EP decreases by transient asphyxia, systemic application of high dose furosemide, and acoustic trauma, with simultaneous increase in Ca²⁺ concentration in endolymph ([Ca]_e). EP was not changed by the endolymphatic perfusion with high Ca²⁺ artificial endlymph, but decreased by simultaneous injection with ionomycin. These results indicate that the increase in [Ca]_e arouse secondary from the decrease in EP, and the cytosolic Ca²⁺ in the cochlear cells surround endolymph plays an important role in the generation and mediation of EP.

研究分野：医歯薬学

キーワード：音響性聴覚障害 音響負荷モルモット 細胞内Ca²⁺濃度 内耳組織障害

1. 研究開始当初の背景

急性音響性聴覚障害は、強大音曝露により生じる内耳障害である。その病態生理についてはいまだ不明な点が多いものの、機械的障害、虚血、神経毒障害、代謝障害、内耳組成液のイオン不均衡やフリーラジカルの関与などが報告されている。

蝸牛内耳は、物理的な振動として外耳、中耳と伝わった音刺激を、電気信号に変換して蝸牛神経に伝達する役割を担っている。蝸牛中央階は内リンパ腔と呼ばれ、内腔を満たしている内リンパ液は低 Na^+ 、高 K^+ であり、+80 mV 程度の蝸牛内直流電位 (Endocochlear potential: EP) を有している。この EP が駆動力となり、コルチ器の有毛細胞で受容器電位を発生し、神経伝達物質が放出されることにより、蝸牛神経の活動電位として音刺激が伝達される。EP の発生機構として、一般に蝸牛血管条の中間細胞におけるカリウムチャンネルを介した K^+ の拡散電位により EP が発生するとされている。

研究代表者が所属する研究グループは、これまで無呼吸負荷や高濃度のフロセミドの全身投与により EP が低下し、同時に蝸牛内リンパ腔の Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_i$) が上昇することを報告している (Inui T, et al. J Physiol Sci; 2007、Mori Y, et al. J Physiol Sci; 2009)。一方で、音響性聴覚障害モデル動物において、EP が低下することが報告されている (Nagasaki R, et al. J Pharmacol Sci; 2010)。

急性音響性聴覚障害を含めた聴覚障害の治療において、EP を維持するという一面が重要であることは疑いないが、前述の知見から、 $[\text{Ca}]_i$ と EP との関係が明らかになれば、これに介入することが治療に繋がる可能性がある。具体的には、EP が低下した結果 $[\text{Ca}]_i$ が上昇するのか、あるいは $[\text{Ca}]_i$ が上昇した結果 EP が低下するのかを明らかにすることが、EP を維持するための治療方の確立に寄与することになると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、音響性聴覚障害モデルモルモットを作製し、これを用いて音響障害の病態解明と新規治療方を開発することを目的とした。前述の如く、申請者の所属する研究グループは EP 低下と $[\text{Ca}]_i$ との関係についての報告を行ってきている。この知見をもとに、本研究では音響性聴覚障害における EP 低下と内リンパ腔における Ca^{2+} イオン代謝の関係を解明し、その結果から新規治療法の検討を行うことを目的とした。

作製したモデル動物を用い、EP が $[\text{Ca}]_i$ を規程しているのか、あるいは $[\text{Ca}]_i$ の変化が EP の変化をもたらすのかを明らかにする。また、申請者が所属するグループの過去の研究により、辺縁細胞など内リンパ腔を取り囲む細胞の細胞内と内リンパ腔の間で、L 型カルシウムチャンネルや Ca^{2+} -ATPase などを通じて

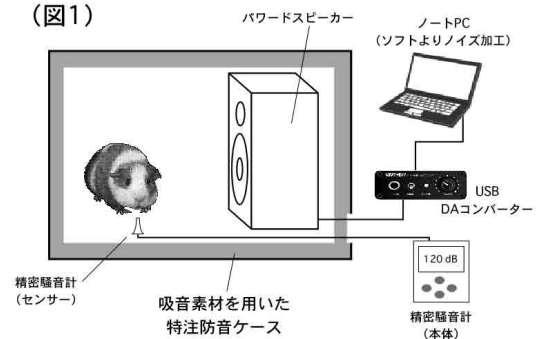
Ca^{2+} の輸送が行われていることが明らかになっている (Inui T, et al. J Physiol Sci; 2007)。このことから、蝸牛血管条の薬剤投与が可能であれば、同部での Ca^{2+} 代謝に介入することで EP の維持調整ができる可能性が考えられる。これを受けて、EP ならびに内リンパ腔の Ca^{2+} 濃度の変化と、内リンパ腔を取り囲む細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}]_i$) との関係を示すことで、治療介入の方法論の確立をも図った。

3. 研究の方法

実験動物として週齢 3 週、プライエル反射陽性のハートレー系白色モルモットを用いた。コンピューターで制御するトーンジェネレーターソフト (トーンジェネレーター 2.14、NCH Software) を用いて、デジタル信号を USB デジタル・アナログ変換器により変換し、これを防音ボックス (Randoll, ISO 12 sound isolation cabinet) 内で音響として出力した。

動物に対する音響負荷は過去の報告 (Nagasaki R, et al. J Pharmacol Sci; 2010) と同様、モルモットを前述の音響負荷装置内のケージに入れ、8 kHz を中心とした Octave Band Noise 120dB SPL で 1 時間の音響負荷を行った。音響負荷中、音響負荷装置内のケージ脇に置いたマイクロフォンを用い、継続的に音響レベルをモニターした (図 1)。

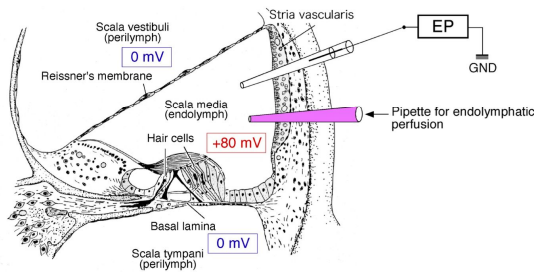
(図 1)



EP の測定など電気生理学的な評価は、上記音響負荷の 1 週間後に、モルモットに全身麻酔を施した上で行った。気管切開による人口呼吸管理下に腹側からの手術操作によって蝸牛を露出し、蝸牛第 2 回転の骨を削開した後に経血管条的にガラス微小ピペットを蝸牛中央階に刺入することで、内リンパ腔に各種薬剤を投与しながら EP を同時に測定した。EP 測定用電極には 0.5 M の KCL 溶液を充填し、電極ホルダーを介してエレクトロメーター (WPI, FD223) に接続し、EP の変化を MacLab 8s (ADInstrument) にて記録した (図 2)。また、内リンパ注入用ピペットから内リンパ腔に注入した薬剤として、様々な Ca^{2+} 濃度の人工内リンパ液とイオノマイシンを使用した。さらに、一部の実験ではさらに Ca^{2+} 濃度測定用電極を内リンパ腔に経血管条的に刺入し、

[Ca]_eを経時的に測定しながら実験を行った。

METHODS 2



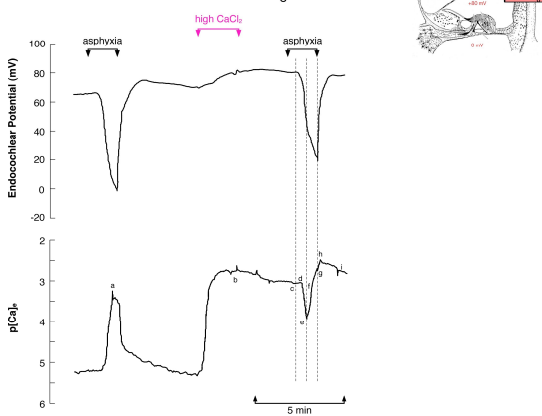
(図2: 蝸牛での操作図)

4. 研究成果

新規に構築した音響負荷装置内において、騒音計での測定により、安定して120 dB SPLの音圧を維持できた。この装置を用いて音響性聴覚障害モデル動物を確立したが、他家のマウスを用いた報告(Nagasaki R, et al. J Pharmacol Sci; 2010)と同様、音響負荷後7日目の測定で音響負荷によるEP低下が確認された。

次いで、様々なCa²⁺濃度の人工内リンパ液を内リンパ腔に注入することで、[Ca]_eを変化させる実験を行った。まず、内リンパ腔に5 mMのCaCl₂を含んだ人工内リンパ液を注入しながら、[Ca]_eの測定を行った。すると、薬剤注入により[Ca]_eは大きく上昇した(図3)。この結果から、この手法により内リンパ腔のCa²⁺濃度を制御できることが確認された。

高濃度Ca²⁺人工内リンパ液注入時のEPおよびp[Ca]_eの変化

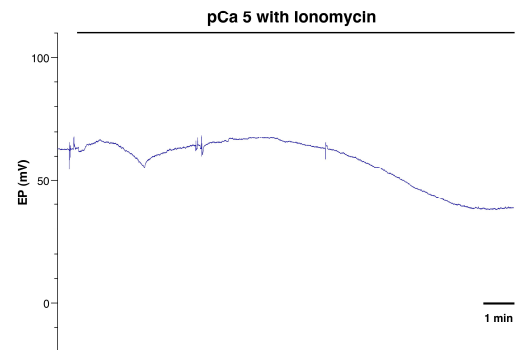
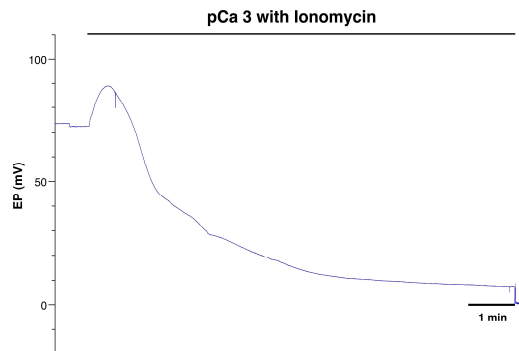


(図3)

さらに、様々なCa²⁺濃度のCaCl₂を含んだ人工内リンパ液を注入し、同時にEPを測定することで[Ca]_eとEPの関係を検討した。Ca²⁺濃度が10⁻² Mから10⁻⁷ Mの人工内リンパ液を内リンパ腔に投与することで[Ca]_eを変化させたが、EPはほとんど変化を認めなかった。したがって、無呼吸負荷における[Ca]_eの上昇は、EPが低下した結果として生ずるものであり、[Ca]_eそのものがEPを決定するものではないことが明らかである。

過去の報告で申請者らは、血管条辺縁細胞に存在するL型Ca²⁺チャネルに対して、L型Ca²⁺チャネル阻害剤であるnifedipineの内リンパ腔への注入あるいは全身投与を行い、無呼吸負荷時のEP低下を抑制できることを報告している(Inui T, et al. J Physiol Sci; 2007)。このことは、膜透過性の薬剤は内リンパ腔周囲の細胞に拡散し、EPを発生する血管条内にも浸透すること、また血管条中間細胞付近に存在する微小血管から薬剤が周囲の細胞に到達することで、血管条細胞におけるCa²⁺濃度を変化させようことを意味する。さらにnifedipineが結合するL型Ca²⁺チャネルの局在を免疫染色法により検討したところ、血管条では辺縁細胞に強陽性反応が観察された。したがって、辺縁細胞は細胞内Ca²⁺濃度の維持を通じて、直接あるいは間接的にEPの発生・調節機構に関与することが示唆される。

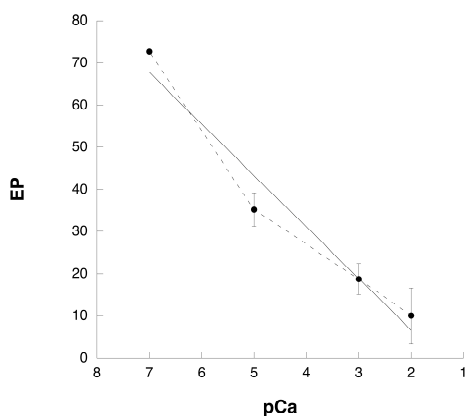
これを受けて、内リンパ腔を取り囲む細胞の細胞内Ca²⁺濃度([Ca]_i)を直接変化させるため、Ca²⁺イオノフォアであるイオノマイシンを含んだ様々なCa²⁺濃度の人工内リンパ液を内リンパ腔に投与し、EPの変化を観察した。内リンパ腔にイオノマイシンを含んだCa²⁺濃度が10⁻³ Mの人工内リンパ液を注入すると、EPは圧力による上昇を見せたのち急激に低下し、注入後10分程度で0 mVになった。次に、イオノマイシンを含んだCa²⁺濃度が10⁻⁵ Mの人工内リンパ液の注入では、EPは緩やかに低下し、注入後10分では約30 mVのEP低下を認めた(図4)。



(図4)

さらに、注入した人工内リンパ液のCa²⁺濃

度と EP の関係を検討したところ、負の相関が示された(図 5)。内リンパ腔にイオノマイシンとともに Ca^{2+} を注入した場合、内リンパ腔を取り巻く細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度は通常では 10^{-7} M 以下であると考えられるため、内リンパ腔から細胞内へ Ca^{2+} が拡散することによる拡散電位を発生し、これによる EP の変化は Nernst 式に基づき線形になるものと考えられる。しかしながら、 Ca^{2+} 濃度が 10^{-5} M においては線形近似曲線よりも低い EP を示していることから、単純な拡散電位以外の作用により EP が低下したのと考えられ、血管条細胞、特に辺縁細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が EP 低下に関わる可能性が示唆された。



(図 5)

以上の結果から、 $[\text{Ca}]_i$ の上昇は EP 低下による 2 次的な事象であり、細胞内の Ca^{2+} 濃度を維持することが、EP の維持、産生に重要な役割であるものと考えられた。近年では経鼓室的な drug delivery system が多く検討されており、これを応用した内リンパ腔を取り巻く細胞に対する治療方の開発が期待される。本研究により、内リンパ腔を取り囲む細胞における Ca^{2+} 濃度上昇を阻害することにより、急性音響負荷による内耳障害を防止できる可能性が示唆された。

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 5 件)

1. 大村修士、寺田哲也、櫛原新平、鈴木 学、乾 崇樹、東野正明、河田 了：皮膚の自潰を伴う耳下腺ワルチン腫瘍例。耳鼻臨床、査読有、2016; 109, 113-7
2. 谷口紀子、乾 崇樹、栗山達朗、櫛原健吾、李 昊哲、寺田哲也、河田 了：ボタン型アルカリ電池の小児鼻腔異物例。耳鼻臨床、査読有、2015; 108, 121-5
3. 乾 崇樹、谷 裕基、荒木倫利、河田了：鼻腔悪性黒色腫に対する DAC-Tam 療法施行中に発症した急性心筋梗塞例。耳鼻喉頭頸、査読有、2013; 85, 833-6

4. Higashino M, Kawata R, Haginomori S, Lee K, Yoshimura K, Inui T, Nishikawa S: Novel differential diagnostic method for superficial/deep tumor of the parotid gland using ultrasonography. Head Neck. 査読有、2013; 35, 1153-7
5. 寺田哲也、奥 雄介、辻村恵子、乾 崇樹、吉村勝弘、河田 了：好酸球性副鼻腔炎の診断および評価基準作成の試み。好酸球性副鼻腔炎と NO. 日鼻誌、査読有、2012; 51, 45-7

[学会発表](計 13 件)

1. Inui T, Balaban CD: Mild blast wave exposure produces intensity-dependent changes in MMP2 expression patches in rat brains. Association for Research in Otolaryngology, 39th Annual MidWinter Meeting, 2016.2.22, San Diego, CA, USA
2. 乾 崇樹、萩森伸一、鈴木 学、菊岡祐介、森 京子、櫛原崇宏、金沢敦子、荒木倫利、河田 了：グリセロールテストの結果と長翌予後の関係について。第 74 回日本めまい平衡医学会学術講演会、2015.11.26、岐阜
3. 乾 崇樹、河田 了：軽度外傷性脳損傷モデルラットにおいて、脳幹における MMP2 発現は急性期に相対的に増加する。第 116 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2015.5.22、東京
4. 森 禎章、乾 崇樹、渡辺正仁、河田了：モルモット蝸牛内直流電位の細胞内 Ca^{2+} による調節。第 6 回 総合福祉科学学会、2015.3.5、柏原
5. Inui T, Balaban CD, Kawata R: Blast-induced brain injury leads the relative increase of MMP2 expression in the brainstem in rats. 第 73 回日本めまい平衡医学会学術講演会、2014.11.6、横浜
6. 乾 崇樹、寺田哲也、谷口紀子、櫛原新平、鈴木 学、河田 了：当科で手術を施行した鼻副鼻腔内反性乳頭腫例の検討。第 52 回日本鼻科学会学術講演会、2013.9.27、福井
7. 長谷川恵子、乾 崇樹、森 京子、萩森伸一、白岩有佳、河田 了、窪田隆裕：内リンパ腔表面細胞の Ca^{2+} 濃度は、モルモットにおける蝸牛内電位および蝸牛管経上皮細胞抵抗を調節する。第 23 回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2013.11、宮崎
8. 綾仁悠介、萩森伸一、森 京子、櫛原崇宏、乾 崇樹、李 昊哲、河田 了：大阪医大耳鼻科で治療した聴器癌 9 例について。第 75 回日本耳鼻咽喉科臨床学会総会・学術講演会、2013.7.12、神戸
9. 乾 崇樹、萩森伸一、松村 麗、長谷川

- 恵子、森 京子、櫛原崇宏、金沢敦子、藤山吉更、荒木倫利、河田 了：一側性メニエール病における聴力低下時の頭振り眼振所見と聴力の短期予後の関係。第114回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2013.5.17、札幌
10. 乾 崇樹、萩森伸一、松村 麗、辻村恵子、櫛原崇宏、藤山吉更、金沢敦子、森京子、荒木倫利、河田 了：メニエール病における聴力低下時の頭振り眼振所見と聴力予後の関係。第71回日本めまい平衡医学会学術講演会、2012.11.30、東京
11. 松村 麗、乾 崇樹、鈴木倫雄、辻村恵子、荒木倫利、萩森伸一、河田 了：当科めまい外来における良性発作性頭位めまい例の検討。第71回日本めまい平衡医学会学術講演会、2012.11.29、東京
12. 乾 崇樹、寺田哲也、西角 章、鈴木倫雄、櫛原新平、河田 了：慢性副鼻腔炎手術が下気道に及ぼす影響。第51回日本鼻科学会学術講演会、2012.9.29、千葉
13. Inui T, Takamaki-Mori A, Hasegawa-Tsujimura K, Haginomori S, Kawata R, Mori Y: PKC-dependent phospholysation processes contribute to the decrease in the endocochlear potential induced by the transient asphyxia. The first Asian Otology Meeting, 2012.6.3, Nagasaki

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾 崇樹 (Inui Takaki)

大阪医科大学・医学部・講師

研究者番号：60465614