

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861407

研究課題名(和文)聾モデルラットにおける聴覚連合野での形態学的変化の検討

研究課題名(英文)The morphological change of auditory association area in deaf model rat

研究代表者

荒井 康裕 (ARAI, Yasuhiro)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：90614818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：研究の目的は、先天聾や失調期間の長い成人における言語発達や言語理解の程度を神経解剖学的観点から検討するため、言語理解に重要である聴覚連合野にいたる神経細胞、髄鞘化等を正常ラットと聾モデルラットを用いて明らかにすることである。まず、正常ラットで神経トレーサーを聴覚連合野に注入し1週間後に脳の内側膝状体に標識された細胞体数を観察した。次に、聾ラットで内側膝状体にいたる細胞の評価を行い、正常ラットと比較検討したが明らかな細胞数、大きさの変化を認めなかった。次に、髄鞘化、星状膠細胞の関与について解明するために、抗体を用いて免疫組織化学染色を施行したが、正常ラットと比較し違いを認めなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate auditory nerve and myelination to auditory association area which is important for language understanding in order to understand neuroanatomically the development and understanding of speech in the persons with deaf-mutism. We used normal rats and deaf model rats in this study. We injected neuronal tract-tracer into the auditory association area in normal and deaf model rats. After 1 week, we observed medial geniculate body of brain in each normal and deaf model rats. There were not significant different cellular number and size between normal and deaf model rat. Then, we immunostained with anti MBP antibody and anti GFAP antibody in order to clarify the myelination and the relation with macroglia in the auditory centers. There were not significant difference between normal and deaf model rat.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：聾モデルラット 内側膝状体 聴覚中枢路 聴覚連合野

1. 研究開始当初の背景

先天性高度難聴の小児や言語習得後に聾となった成人に対する人工内耳治療は、一定の有効性がある。しかし、**先天性高度感音難聴の小児で難聴の発見が遅れた症例や先天性難聴の成人症例では、言語発達や言語理解という点で有効ではないと言われている。**(Miyamoto et al. Acta otolaryngol 1999)

成人に対する人工内耳の適応基準(日本耳鼻咽喉科学会作成)では、**失聴期間に関する記載はなく、先天性聾の成人例については、“言語理解の面での効果が乏しく、非使用者となる可能性があることを十分理解させておく必要がある”**と付記があるのみであり、人工内耳の非使用者を生み出さないためにも早急な基礎的な裏付けが期待されている。

言語理解の面での効果が乏しくなる機序は、十分な音刺激がないままに言語獲得の臨界期を過ぎた際、**言語理解に重要である言語聴覚野が視覚や体性感覚等の他の感覚に奪われる事**に起因すると考えられている。実際、先天性難聴の成人症例における PET (Naito et al. Acta otolaryngol 1999) やグルコース代謝 (Catalan-Ahumada et al. Brain Res 1993) の評価により、聴覚連合野の活動性の低下が報告されている。また、先天性難聴の新生児、乳幼児の中樞聴覚伝導路における髄鞘化が遅延していることが頭部 MRI にて確認されている。(Peijen SU et al. Int J Pediatr Otorhinolaryngol 2008)

難聴の聴覚伝導路における解剖学的病態を研究するために、動物で神経トレーサーを用いた実験が施行されているが、多くの報告では言語発達、言語理解が正常である一側のみ聾としたモデルにおいて蝸牛神経核、上オリブ核複合体、下丘を評価するものである。しかしながら、**言語発達、言語理解が問題とされる両側聾モデルを用いて、言語理解に重要である聴覚連合野にいたる神経細胞数、大きさ、星状膠細胞の発生、神経線維の髄鞘化、血管の新生の関与について正常モデルとの発達の違いを解剖学的に検討した報告はなく、基礎的検討が必要であると思われた。**

2. 研究の目的

先天性聾の成人や失聴期間の長い成人における言語発達や言語理解の程度を神経解剖学的観点から検討するため、聴覚中枢路、特に言語理解に重要である聴覚連合野にいたる神経細胞数、大きさ、髄鞘化、血管新生の変化を正常ラットおよび聾モデルラットを用いて明らかにすることにより、

聾患者の聴覚中枢路における形態学的変化を理解する。また、形態学的変化を明らかにすることにより先天性聾の成人や失聴期間の長い成人における人工内耳の新たな適応を検討する事である。

3. 研究の方法

(1) 正常 Wister ラットで神経トレーサー(フルオロゴールド)をラット用の脳定位固定装置を用い、ラット用脳地図の座標軸に準じてトレーサーを用いて聴覚連合野に注入し(図1)、1週間後に脳の連続凍結切片で、内側膝状体に標識された細胞体数を蛍光顕微鏡下で観察計測した。(図2)



図1.ラットを脳定位固定装置で固定し、聴覚連合野へトレーサーを注入する。

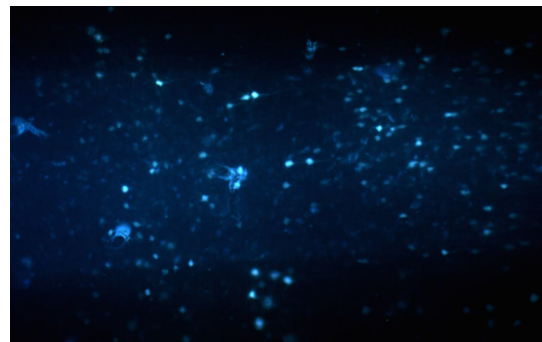


図2.脳の連続切片で聴覚連合野に逆行性に標識された細胞体を観察する。

(2) Hearing on set 前(6日齢)に聾としたラットでの内側膝状体にいる細胞数、大きさの評価(図3)

ラットの hearing onset は生後 12 日頃である。

そこで hearing onset 前に Wister ラットにアミカシン 0.5mg/g を 14 日間連続で皮下注射する事により聾モデルラットを作成する。聾としてから A. 短期(4週間後) B. 中期(8週間後) C. 長期(16週間後)に(1)と同様な実験を行い比較検討した。

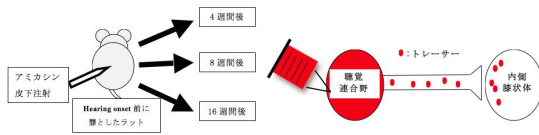


図3. Hearing on set 前(6日齢)に聾としたラットでの内側膝状体にいる細胞数、大きさの評価

(3) 正常ラットおよび聾モデルラットでの髄鞘化、星状膠細胞、血管新生の発達の評価

(1)(2)で用いた正常ラット、hearing onset 前に聾としたラットを用いる。短期、中期と期間別に以下の免疫染色を行った。

髄鞘形成期に多く産生され、髄鞘の主要構成蛋白のひとつである myelin basic protein(MBP)の免疫組織化学染色を行った。この方法で、聾モデルラットでの聴覚伝導路と髄鞘化の関与を検討した。

星状膠細胞は、血管周囲のグリア境界膜を介して循環系から最初にグルコースを取り込みニューロンの代謝的支援に関与している。星状膠細胞の主要細胞内骨格蛋白である glial fibrillary acidic protein (GFAP)を抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学染色を行う事で、聾モデルラットでの聴覚伝導路と星状膠細胞の関与について検討した。

血管内皮細胞のマーカーで血管新生にも関係しているといわれる Platelet endothelial cellular adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31)の免疫組織化学染色を行う事で、聾モデルラットでの聴覚伝導路と血管新生の関与について検討した。

(4) 形態学的観点からの新たな人工内耳の適応基準の検討

以上の実験結果をもとに先天聾の成人や失聴期間の長い成人における言語理解、言語発達への影響を形態学的観点から予測し、人工内耳の新たな適応を検討した。

4. 研究成果

(1) 正常 Wister ラットでの観察

1.8%フルオロゴールドを用いて聴覚連合野に注入することにより、1週間後に内側膝状体に標識された細胞体を蛍光顕微鏡下で観察計測することに成功した。(図4)

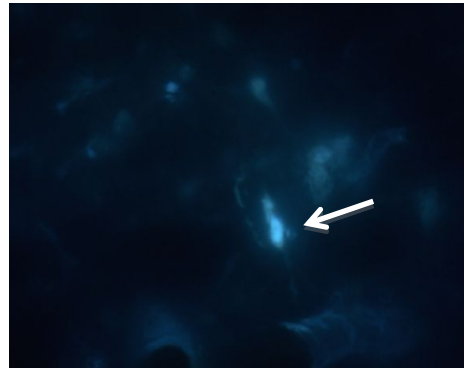


図4. 正常ラットでの内側膝状体に標識された細胞体 (細胞体)

(2) 聾モデルラットでの観察

生後1日から14日まで連続して、アミカシン 0.5mg/g を皮下注射することにより先天性聾モデルラットを作成した。聾モデルラットを使用して、A.短期(4週間後、2匹)、B.中期(8週間後、2匹)経過後に正常 Wister ラットと同様な実験を行い比較検討したところ、Hearing on set 前聾モデルラットでは正常ラットと比較し明らかな細胞数、大きさの変化を認めなかった。また、C.長期(16週間後、1匹)経過後でも明らかな細胞数、大きさの変化を認めなかった。

(3) 髄鞘化、星状膠細胞の関与について解明

抗 myelin basic protein(MBP)抗体、抗 GFAP 抗体を用いて正常ラットおよび Hearing on set 前聾モデルラットで4週間後および8週間後に得られた凍結切片に免疫組織化学染色を施行した。抗 MBP 抗体では oligodendrocyte 部位が染色されていたが、正常ラットと聾モデルラットで明らかな差をみとめなかった。また、抗 GFAP 抗体では、astrocyte が染色されていたが、正常ラットと聾モデルラットで明らかな差をみとめなかった。CD31染色では、コントロールである正常ラットでもうまく染色結果を得られなかったため、聾モデルラットとの比較を行えなかった。

(4) 形態学的観点からの新たな人工内耳の適応基準の検討

今回の研究結果からは、聾モデルラットにおいて聴覚連合野からトレーサーを注入し内側膝状体における細胞体を観察したが、正常ラットと比較して短期、中期、長期で明らかな差を認めなかったことから、聴覚中枢路、特に、内側膝状体から聴覚連合野における評価においては、ラットにおける16週に相当する人間の年齢においては人工内耳の適応ありとの判断になる。しかし、

さらに長期間、16週以上のラットモデルでの検討をしなければ、**先天性高度感音難聴で人工内耳を挿入することにより、何歳まで言語習得という観点で人工内耳手術の適応となるかの判断にはつながらない。**また、もし聴覚中枢路で差がないならば、**内耳レベルでの解剖学的検討や、今回は差がみとめられなかったが、髄鞘化や血管新生などの検討が必要であり、今後も行っていく予定である。**

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)

Sakuma N, Moteki H, Takahashi M, Arai Y, Yamashita Y, Oridate N, Usami S: An effective screening strategy for deafness in combination with a next-generation sequencing platform: a consecutive analysis. Journal of Human Genetics, 61(3):253-261, 2016. 査読有

Sakuma N, Moteki H, Azaiez H, Booth, Takahashi M, Arai Y, Shearer AE, Sloan CM, Nishio SY, Kolbe DL, Iwasaki S, Oridate N, Smith RJ, Usami S: Novel PTPRQ mutations identified in three congenital hearing loss patients with various types of hearing loss. Annals of Otology Rhinology Laryngology, 124 suppl 1:184S-192S, 2015. 査読有

6. 研究組織

(1)研究代表者

荒井 康裕 (YASUHIRO Arai)

横浜市立大学・附属病院・助教

研究者番号：90614818