

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20591970

研究課題名(和文) 内耳性難聴の機序の解明と治療法究明のための研究

研究課題名(英文) Study for mechanisms and treatments of inner ear impairment

研究代表者

辻 茂希(TSUJI SHIGEKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：90375501

研究成果の概要(和文)：

音響性障害に保護作用を示すグルココルチコイドの作用機序を考察するために細胞質受容体阻害薬(Mifepristone)の効果を検討した結果、グルココルチコイドは細胞質レセプターを介して保護効果をもたらすことが推測された。また神経系の修復・保護作用を有する糖脂質であるGM1-ガングリオシドは音響性聴器障害において内耳保護作用を示し、その機序としては抗酸化作用としての役割が関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

The deleterious effects of mifepristone, a glucocorticoid receptor antagonist, on acoustic injury were reported. This finding suggests that glucocorticoids exhibited the protective effects against acoustic injury via a glucocorticoid-receptor-dependent pathway. GM1 ganglioside showed the protective effects against acoustic injury as an antioxidant agent.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	100,000	30,000	130,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

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：内耳性難聴、フリーラジカル、内耳虚血、虚血再灌流障害、薬剤性内耳障害、音響性障害、GM1-ガングリオシド

1. 研究開始当初の背景

感音難聴（内耳性難聴）は、突発性難聴や音響性障害を代表として耳鼻咽喉科領域において極めて重要な疾患と考える。現在まで世界的に様々な研究がなされており、我々の研究グループでも日々努力を続けているが、いまだその病態の解明には至っていない。しかし、近年内耳性難聴の病態への様々な傷害因子の関与について明らかにされつつあり、特に活性酸素や一酸化窒素などのフリーラジカルが大きく関わっていることがわかってきている。

研究代表者は、内耳循環障害動物や強大音負荷動物などのモデル動物を用い、各種薬剤の保護・治療効果につき研究を進めてきている。内耳障害には一時的な障害と永久的な障害があり、現在まで一時的な障害をみる急性実験については当研究室を含め報告は多い。しかし、長期的に観察した研究についてはいまだ十分な成果とはいえないのが現状である。特に内耳循環障害動物については動物に対する侵襲が大きくなるため、長期に生存させ観察可能なモデルは確立されていなかった。研究代表者は、以前、頭蓋底への操作を加えず後頭部よりアプローチし、聴覚評価にABRを用いることにより、侵襲が少なく長期的な評価が可能な内耳循環障害モデルを確立し、国内外を通じて初めて報告した。このモデルを用いれば現在まで研究されている薬剤および新しい薬剤すべてにおいて、より長期的な観察が可能となりその動態、効果についての新しい知見が得られるものと考えられる。また長期的な音響性障害モデルや薬剤性聴器毒性モデルと比較検討していくことにより、内耳性難聴とフリーラジカルの関係をより明らかにし、ひいては感音難聴の病態の解明および治療法の究明に近づくと考えて

研究を行っている。一連の研究の結果、内耳循環障害モデルでは、一酸化窒素合成酵素（NOS）やスーパーオキシド類の関与を示す結果が得られ、フリーラジカルが虚血による蝸牛障害において重要な役割を担うことが確認された。音響性障害においても、マウスを用いた強大音負荷動物モデルを用い、フリーラジカルスカベンジャーである Tempol および PARS 阻害薬である 3-aminobenzamide が保護効果を有することを確認した。

また、薬物による聴器毒性（内耳性難聴）も臨床的に重要であり、アミノグリコシド系薬剤やシスプラチンなどの白金系抗腫瘍剤において様々な研究がなされている。現在、シスプラチンによる聴器毒性にもフリーラジカルが関与していると考えられており、各種フリーラジカルスカベンジャーを使用した研究も行われている。

2. 研究の目的

内耳性難聴の成因・メカニズムを解明し、その予防法、治療法を開発することを究極の目標とする。現在までに内耳循環障害、音響性障害それぞれのモデル動物を用いて各種薬剤の効果を検討し、蝸牛障害のうち特に循環障害と音響障害の病態につき研究を重ねてきた。その結果、上述のように内耳性難聴の病態へのフリーラジカルの関与についてある程度の成果が認められた。本研究では、内耳循環障害、音響性障害それぞれのモデル動物において、聴覚生理学的手法に加え形態学的・免疫組織学的にも NOS 阻害薬（N-nitro-l-arginine, 7-nitroindazole, Aminoguanidine）やフリーラジカルスカベンジャー（Tempol）、poly (ADP-ribose) synthetase:PARS などの保護効果を引きつ

づき検討するとともにグルコシルチコイドの作用機序を検討する。また、神経系の修復・保護作用を有することが知られている糖脂質である GM1-ガングリオシドの音響性聴器障害における内耳保護作用についても検討し、総合的に内耳性難聴の成因・メカニズムを究明していく予定である。

3. 研究の方法

- (1)実験動物：マウス、モルモット
- (2)全身麻酔：ペントバルビタール 50mg/kg 腹腔内投与
- (3)蝸牛機能(聴力)評価：聴性脳幹反応 (ABR) 測定、蝸牛神経複合活動電位(CAP)
- (4)モデル動物の作成：
 - ・内耳循環障害動物：迷路動脈を圧迫し内耳一過性虚血を作成。中耳骨胞を一部開放し、蝸牛骨壁よりレーザードップラー計にて血流測定
 - ・強大音負荷動物：120～128dB SPL、4 kHz 純音、4 時間
 - ・薬剤性聴器障害モデル：シスプラチン投与（腹腔内・静脈内）、至適投与量の確定
- (5)実験プロトコール：
 - ①虚血あるいは強大音負荷前に聴力評価
薬剤投与群：保護効果（虚血あるいは強大音負荷前に薬剤投与）治療効果（虚血あるいは強大音負荷後連日あるいは数日毎に薬剤投与）
対照群：生理食塩水投与を同様の手順にて投与
 - ②負荷後聴力評価

負荷直後：一過性閾値上昇の評価

1～2 週間後：永久閾値上昇の評価

- ③pentobarbital 大量投与により動物を安楽死の上、組織学的評価
組織評価：機能評価後、組織学的にも蝸牛障害の程度を評価する。有毛細胞の核の消失率

4. 研究成果

虚血性内耳障害モデル：内耳虚血再灌流障害の進行機序におけるフリーラジカルの関与を示した。各種薬剤投与による影響を検討し、結果として虚血中は蝸牛の上記のいずれの細胞でも障害が進行したが、再灌流後には内毛細胞、蝸牛求心性神経では障害が軽減し、外毛細胞が障害の主座となることを示した。

音響性障害モデル動物：グルコシルチコイドは細胞質レセプターを介して保護効果をもたらすことが推測された。一方、神経系の修復・保護作用を有することが知られている糖脂質である GM1-ガングリオシドは音響性聴器障害において内耳保護作用を示し、その機序としては抗酸化作用としての役割が関与していることが示唆される結果を得た。

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 1 件)

- ① Tanaka S, Tabuchi K, Hoshino T, Murashita H, Tsuji S, Hara A: Protective effect of exogenous GM-1 ganglioside on acoustic injury of the mouse cochlea. Neuroscience Letters 473: 237-241, 2010
査読有

[学会発表] (計3件)

①音響性聴器障害における GM1-ガングリオシドの効果

田中 秀峰、辻 茂希、原 晃
第110回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2009年5月16日 東京

②音響外傷におけるグルココルチコイドとホスホリパーゼ A2 の保護効果

廣瀬 由紀、辻 茂希、原 晃
第110回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会、2009年5月16日 東京

③虚血再灌流蝸牛障害におけるフリーラジカルの関与

田渕 経司、辻 茂希、原 晃
第53回 日本聴覚医学会総会・学術講演会、2008年10月2日 東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 茂希 (TSUJI SHIGEKI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：90375501

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし