

学位論文

音響障害における内耳病態の検討

金川英寿

山口大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学分野

情報解析医学系専攻 耳鼻咽喉科学分野

(平成26年 1月)

## 目次

(1) 要約	P3
(2) はじめに	P4
(3) 方法	P5-P8
(4) 結果	P9
(5) 考察	P10-P12
(6) 参考文献	P13-P16
(7) 図表	P17-P19
(8) 図表の説明	P20-P21

## 要約

本研究では、音響障害の蝸牛への影響を音響曝露の前後での Auditory Brain-stem Response (ABR) 閾値の変化、外有毛細胞、シナプスリボン数を評価することで検討した。音響曝露直後に上昇した ABR 閾値は時間とともに回復して音響曝露後 14 日の時点で音響曝露前より約 15 dB の閾値上昇を認めた。外有毛細胞はほとんど障害されていなかった。音響曝露直後には著明に減少した内有毛細胞直下のシナプス数は、その後早期に回復を認め、音響曝露後 24 時間の時点では音響障害前のシナプス数より増加していた。その後、シナプス数は減少した。音響曝露後 7 日目のシナプス数は音響曝露前のシナプス数より少なかった。本研究の音響障害モデルでは、従来の Temporary Threshold Shift (TTS) の報告と同様にシナプスは障害されるが、速やかにシナプス形成が促進され、修復過程としてシナプスが一時的に増加する時期がある可能性を考えた。音響曝露後 7 日の時点で音響曝露前のシナプス数と比べややシナプス数が減少していたのは、音響曝露後 7 日の ABR 閾値と比較して矛盾しない所見であった。本モデルは部分的可逆的シナプス障害モデルと考えた。本研究では音響曝露の強さと機能的・組織学的な侵襲の程度の関係性を示した。

## はじめに

音響障害による難聴は欧米では大変重要視されており、大きな社会問題となっている。音響障害が加わると蝸牛には機械的障害と代謝的障害が生じることが知られている<sup>1)</sup>。音響障害の強さや負荷時間によって、音響障害後の聴力閾値上昇が一時的Temporary Threshold Shift (TTS) か永久的Permanent Threshold Shift (PTS) に閾値が上昇するかはよく知られている<sup>2)3)</sup>。音響障害によって生じる難聴の病態解明を明らかにすることが治療法開発には必須である。今回我々は、音響障害モデルを作成し、障害前後での聴覚の経時的変化、組織学的変化を検討した。

## 方法

正常なプライエル反射と鼓膜を有しているハートレイ系白色モルモット (350-400g; 千代田開発社、東京、日本) を用いた。実験使用前1~2日以内に聴性脳幹反応検査を行い聴力に左右差がないことを確認した。すべての実験は山梨大学生命科学研究施設の許可を得た実施計画に基づいて行い、動物の愛護法、動物管理使用規則を遵守した。

## 聴力評価法

音響曝露前、音響曝露後 3 時間、12 時間、24 時間、3 日、7 日、14 日後に塩酸メデトミジン (1 mg/kg、i. p.)、キシラジン (2 mg/kg、i. p.) とペントバルビタールナトリウム (24 mg/kg、i. p.) での全身麻酔の後、聴性脳幹反応 (auditory brain stem response, ABR) 検査を行い聴力評価を行った。ABR 検査では動物の皮下に白金針電極を刺入した。眉間正中部を陰極、頭頂部を陽極、体幹皮下を接地電極として測定を行い反応を記録した。刺激音は 8 kHz のトーンバースト 0.2 秒間隔の 0.8 秒、合計音刺激 500 回に設定し、信号プロセッサで記録した。刺激は 10 cm のチューブをイヤホンに接続し、外耳道に挿入して行った。ABR 記録装置は、signal processor (Synax 1100、NEC Co., Tokyo, Japan) を用いた。閾値は 3-5 波間の波形で、最も低い刺激で測定可能であった値とした。

## 音響障害法

前述の薬剤で麻酔されたモルモットを固定し無響室にて頭の中央上10 cmの位置にスピーカーを設置した。動物の両側外耳道近くでsound-level meter (NA-60, Rion, Tokyo, Japan)を用いflat modeで音圧を測定し条件を一定化した。強大音響(110 dB SPL, 4 kHz に中心を持つオクターブバンドノイズ)に3時間曝露した。

## シナプスリボンの組織学的検査

音響曝露前、音響曝露後3時間、12時間、24時間、3日、7日後に前述と同麻酔剤投与による深麻酔後、生理食塩水200mlを経心灌流し、直後に4%パラホルムアルデヒドで経心灌流固定を行った。その後断頭して側頭骨を摘出した。摘出した側頭骨の蝸牛の頂点と卵円窓を開け、4%のパラホルムアルデヒドを蝸牛に注入し12時間、室温で後固定した。蝸牛頂点からの基底回転までの距離の、頂点から45%~70%間(蝸牛第二回転)を取り出しPBSで洗浄後、4° C、2時間でブロッッキング(1%ウシ血清アルブミン、0.4%ヤギ血清と0.4%の馬血清)、10分間0.3%トリトンX-100含有PBSで水和した。シナプスリボンを染色するために1次抗体としてC-Terminal Binding Protein-2(CtBP2) (BD biosciences社、Franklin

lakes, NJ USA) (4° C、24時間、1:200)、2次抗体としてAlexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probe, Eugene, OR) (4° C、12時間、1:200) を用いた。またCtBP2で染色されたシナプスリボンが蝸牛神経終末に一致するか確認をするため、蝸牛神経の染色を1次抗体としてanti-neurofilament heavy polypeptide antibody (MILLIPORE社、Billerica, MA USA) (4° C、24時間、1:200)、2次抗体としてAnti-chicken IgY-NL-493 (R&D SYSTEM社、Minneapolis, MN USA) (4° C、12時間、1:200) を用いて行った。その後4;6-diamino-2-phenylindole (DAPI; ; Vector Laboratories社) で核染色し、蛍光顕微鏡 (KETENCE、Biozero、大阪、日本) で観察した。蝸牛頂点からの基底回転までの距離の、頂点から45%~70%間 (蝸牛第二回転) の内有毛細胞直下のシナプスリボンを観察し、最もシナプスリボンの密度が少ない箇所内の内有毛細胞10個あたりのシナプスリボンの数を計測した。蝸牛頂点からの基底回転までの距離の、頂点から45%~70%間 (蝸牛第二回転) の内有毛細胞直下のシナプスリボンを観察した理由としては4 kHzを中心にもつオクターブバンドノイズ負荷により蝸牛第二回転に最も強く障害が出るためである (Viberg, 2004)。

#### 外有毛細胞の組織学的検査

音響曝露前と音響曝露後14日後に、同麻酔剤で深麻酔下に前述と同様の方法で側頭骨を摘出した。摘出した側頭骨の蝸牛の頂回転に小孔を作成し、卵円窓から4%パラホルムアルデヒドにて外リンパ腔を灌流した。その後、12時間、室温で後固定した。コルチ器を取り出し 0.3% Triton X-100で10分間浸透させた。その後標本を fluorescein isothiocyanate-conjugated phalloidin (Sigma, St. Louis, MO, USA : 1 µg/ml PBS)で1時間染色した。PBSで洗浄後DAPIで核染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。蝸牛頂点からの基底回転までの距離の、頂点から45%~70%間（蝸牛第二回転）の外有毛細胞を観察し、最も外有毛細胞の密度が少ない箇所を評価した。

#### 統計学的解析

すべてのDataは平均値と標準誤差を表記した。統計的解析は StatView version 4.5J software package for Macintosh (Abacus Concepts, Berkley, CA, USA)を用いて、FisherのProtected Least Significant Difference法で行った。 $P < 0.05$  を有意とした。全てのデータは平均値±標準誤差で示した。



## 結果

### 音響曝露前後のABR閾値

音響曝露前は約5 dB、音響曝露直後では約45 dBと閾値上昇を認めたが、時間の経過と共に閾値の回復を認めた。音響曝露後14日で音響曝露前のABR閾値より約15 dBの閾値上昇を認めた (Fig 1)。

### 音響曝露後の外有毛細胞欠損について

音響曝露後14日では、外有毛細胞の欠損は認めなかった (Fig 2)。

### 音響障害前後のシナプスリボン数の変化

音響曝露後3時間にシナプスリボンの減少が見られたが、徐々にシナプスリボン数が増加し24時間では音響曝露前のシナプスリボン数より有意にシナプスリボン数が増加した。その後徐々にシナプスリボン数は減少し音響曝露後7日ではシナプスリボン数は音響曝露前よりやや減少した (Fig.3)

## 考察

シナプスリボンは有毛細胞と聴覚神経繊維との間にあるシナプスであり<sup>4)</sup>、シナプスリボンを構成するタンパク質の1つにCtBP2がある<sup>5)6)</sup>。抗CtBP2抗体は内有毛細胞直下のリボンシナプスを評価するのにこれまで種々の研究者に使用されてきた<sup>7)</sup>。以前は、有毛細胞直下のシナプスを評価するためには電子顕微鏡を主に使用していたが<sup>8)</sup>、有毛細胞1個あたりのシナプス数を評価することは容易ではなかった。しかし抗CtBP2抗体を用いることで比較的簡易に有毛細胞直下のシナプスを評価することができるようになった。今回我々の実験でも、この方法を用いて内有毛細胞直下のシナプスリボンを評価した。

## 音響障害の機序

今回我々はABR検査で 8 kHzでの評価を行ったが、それは4 kHzを中心にもつオクターブバンドノイズで音響曝露した場合、4 kHzより高い周波数のABR閾値に影響を及ぼすとされ<sup>9)</sup>、当施設での過去の実験でも4 kHzを中心にもつオクターブバンドノイズで音響曝露した場合は8 kHzのABR閾値が強く障害される<sup>10)11)</sup>ためである。

TTSと異なり、本音響障害モデルではABR閾値は徐々に回復を示したが、障害前のレベルまでは回復しなかった。しかし外有毛細胞の障害はsurface preparation

上では認めなかった。過去にも外有毛細胞欠損率と ABR閾値が一致しないとした報告がある<sup>12)</sup>。これには外有毛細胞が一見正常に見えても、実際には機械電気変換チャンネルやシナプスなどの微細構造が障害されて細胞機能が消失していることが深く関わってくると言われている<sup>13)</sup>。本研究では音響曝露後すぐにシナプス数の回復が見られ、音響曝露後24時間の時点では音響障害前のシナプス数より増加していた。その後、シナプス数は減少し音響曝露後7日の時点では音響曝露前のシナプス数より若干減少していた。最近のシナプスの研究ではシナプス形成は30分から数時間という短時間で起こるとされている<sup>14)</sup>。またTTSでは音響障害後24時間の時点でシナプスは減少していると報告がある<sup>15)</sup>。我々の研究では音響曝露後24時間の時点ではシナプス数はむしろ音響曝露前より増加しており従来の報告の逆の結果であった。前庭領域では無重力状態で末梢前庭のシナプスが増加すると言われている<sup>16)</sup>。このことはストレスの種類や程度によっては影響を受けた部位のシナプスが一時的に増加することを示しており、蝸牛でも同じことが言えるのではないかと考えた。すなわち、本音響障害モデルでは、従来のTTSの報告通りシナプスは障害されるが、速やかにシナプス形成が促進され音響曝露後24時間の時点では修復過程としてシナプスが一時的に増加する時期があるのではないかと考えた。音響曝露後7日の時点で音響曝露前のシナプス数と比べややシナプス数が減少していたのは、音響曝露後7日の8 kHzでのABR閾値が完全に回復していないことと矛盾しない所見であった。以上より、本モデルは部分的可逆的シナプス障害モデルと言える。障害で減少したシナプスは

時的に過剰に再生するが、最終的に機能しないものはアポトーシスに陥り、淘汰される可能性がある。障害後このようなシナプスの経時的変化する報告は本報告が初めてである。このようなタイプの音響外傷に対する治療法としてはシナプスの回復を促進させるような薬物投与が有効であると考え。それらをどのように効率よく内耳へ投与するかは今後の課題である。

## 参考文献

1. Slepecky, N.: Overview of mechanical damage to the inner ear: noise as a tool to probe cochlear function. *Hear. Res.* **22**: 307-321, 1986.
2. Hirose, Y., Sugahara, K., Mikuriya, T., Hashimoto, M., Shimogori, H. and Yamashita, H.: Effect of water-soluble coenzyme Q10 on noise-induced hearing loss in guinea pigs. *Acta. Otolaryngol.*, **128**: 1071-1076, 2008.
3. Sugahara, K., Inouye, S., Izu, H., Katoh, Y., Katsuki, K., Takemoto, T., Shimogori, H., Yamashita, H. and Nakai, A.: Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hear. Res.*, **182**: 88-96, 2003.
4. Griesinger, C. B., Richards, C. D. and Ashmore, J. F.: Fast vesicle replenishment allows indefatigable signalling at the first auditory synapse. *Nature*, **435**: 212-215, 2005.
5. Khimich, D., Nouvian, R., Pujol, R., Tom Dieck, S., Egner, A., Gundelfinger, E. D. and Moser, T.: Hair cell synaptic ribbons are essential for synchronous auditory

- signalling. *Nature*, **434**: 889-894, 2005.
6. Uthaiyah, R. C. and Hudspeth, A. J.: Molecular anatomy of the hair cell's ribbon synapse. *J. Neurosci.*, **30**: 12387-12399, 2010.
  7. Liu, K., Li, S. and Jiang, X.: Quantitative analysis of the ribbon synapse number of cochlear inner hair cells in C57BL/6J mice using the three-dimensional modeling method. *Sci. China C. Life Sci.*, **52**: 807-812, 2009.
  8. Yamasoba, T., Pourbakht, A., Sakamoto, T. and Suzuki, M.: Ebselen prevents noise-induced excitotoxicity and temporary threshold shift. *Neurosci. Lett.*, **380**: 234-238, 2005.
  9. Ohinata, Y., Yamasoba, T., Schacht, J. and Miller, J. M.: Glutathione limits noise-induced hearing loss. *Hear. Res.*, **146**: 28-34, 2000.
  10. Sugahara, K., Shimogori, H. and Yamashita, H.: The role of acidic fibroblast growth factor in recovery of acoustic trauma. *Neuroreport.*, **12**: 3299-3302, 2001.
  11. Sugahara, K., Shimogori, H., Okuda, T., Takemoto, T., Hashimoto, M. and

Yamashita, H.: Cochlear administration of adenosine triphosphate facilitates recovery from acoustic trauma (temporary threshold shift). *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, **66**: 80-84, 2004.

12. Ades, H. W., Trahiotis, A., Kokko-Cunningham, A. and Averbuch, A.: Comparison of hearing thresholds and morphological changes in the chinchilla after exposure to 4 kHz tones. *Acta. Otolaryngol.*, **78**: 192-206, 1974.
13. Mikuriya, T., Sugahara, K., Takemoto, T., Tanaka, K., Takeno, K., Shimogori, H., Nakai, A. and Yamashita, H.: Geranylgeranylacetone, a heat shock protein inducer, prevents acoustic injury in the guinea pig. *Brain Res.*, **1065**: 107-114, 2005.
14. Okabe, S., Miwa, A. and Okado, H.: Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J. Neurosci.*, **21**: 6105-6114, 2001.
15. Kujawa, S. G. and Liberman, M. C.: Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J. Neurosci.*, **29**: 14077-14085, 2009.
16. Ross, M. D., Rogers, C. M. and Donovan, K. M.: Innervation patterns in rat saccular

macula. A structural basis for complex sensory processing. *Acta. Otolaryngol.*, **102**:  
75-86, 1986.



Fig. 1

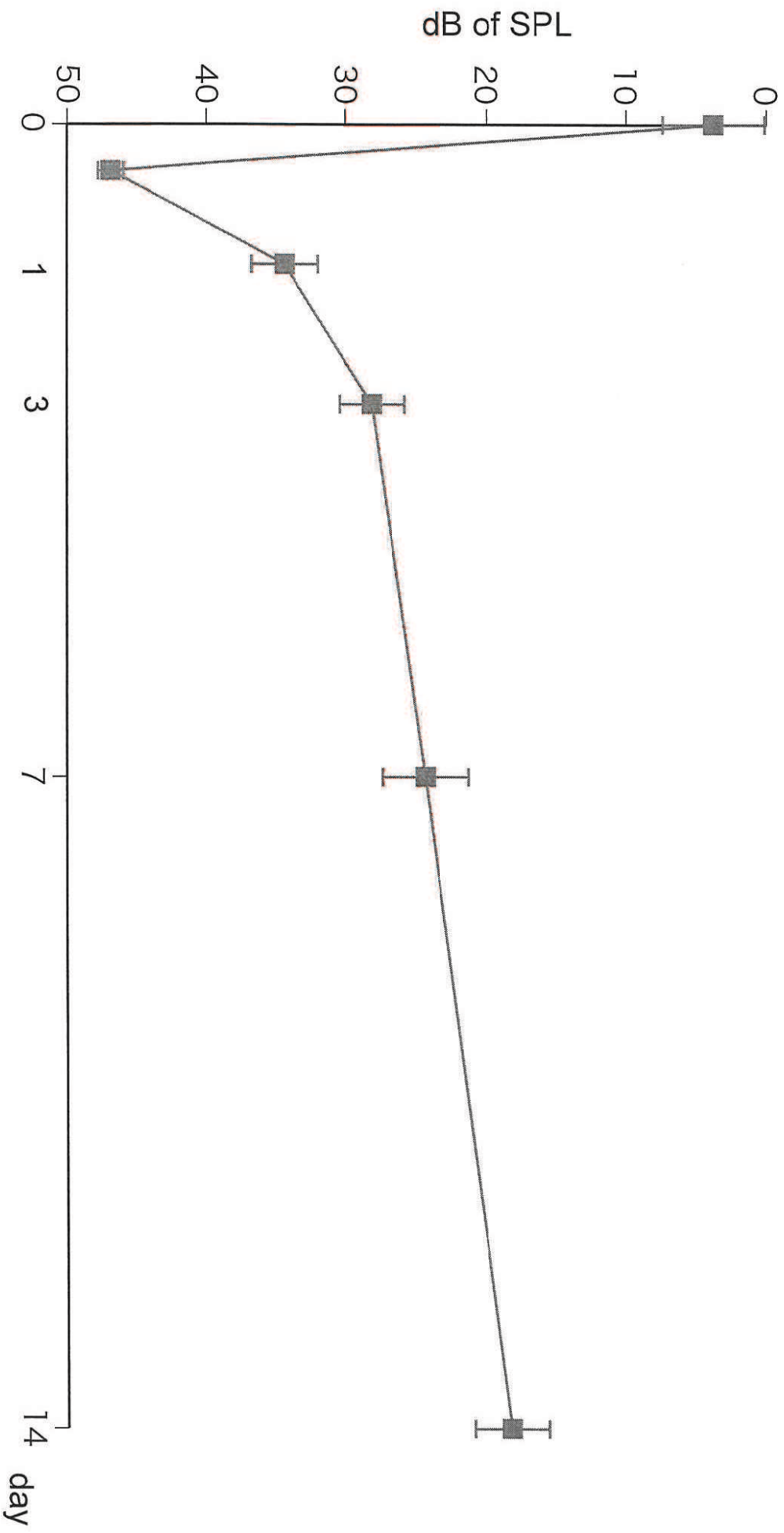
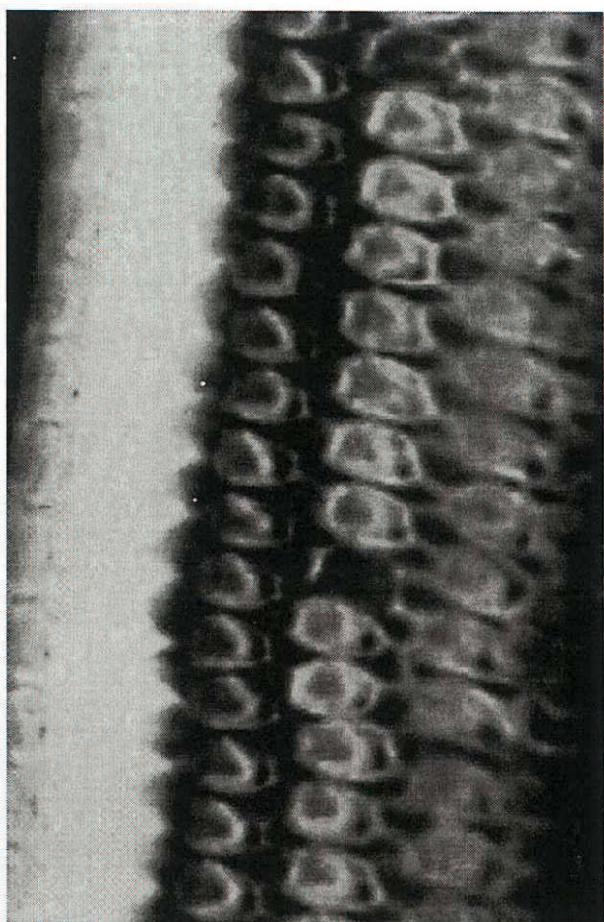
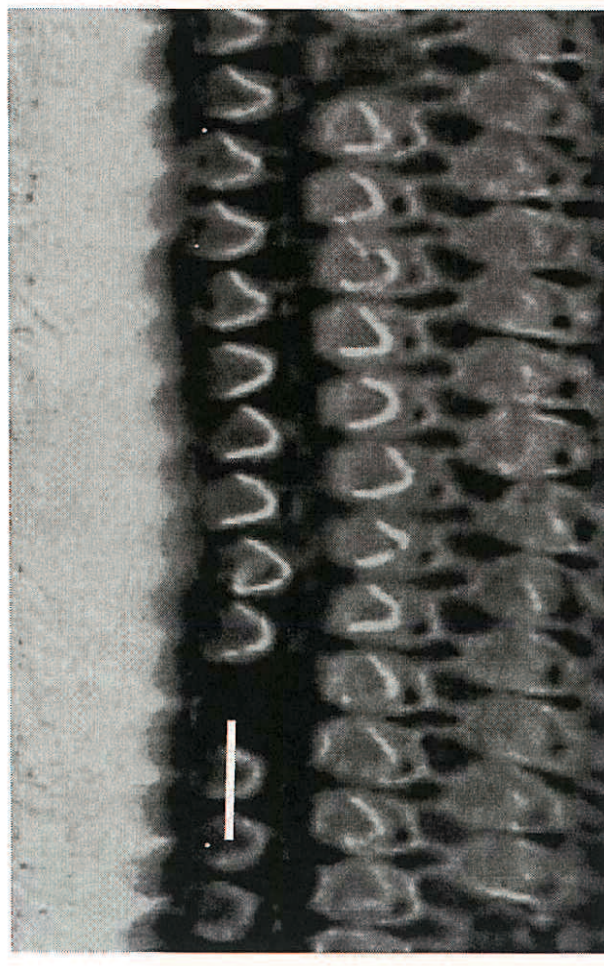


Fig.2

Before noise exposure

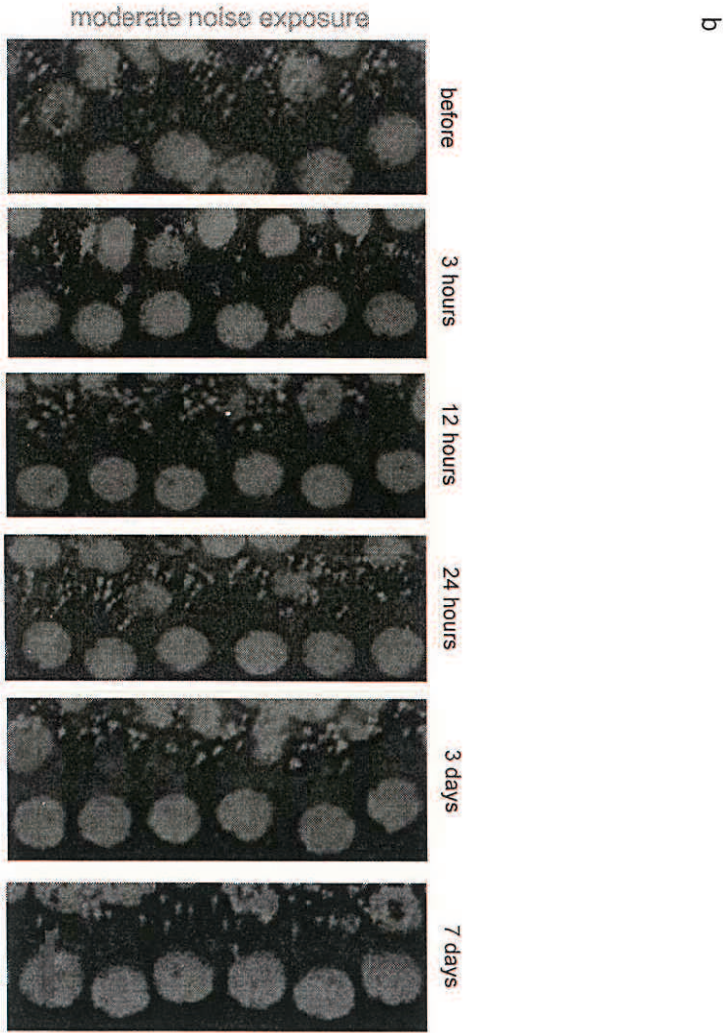
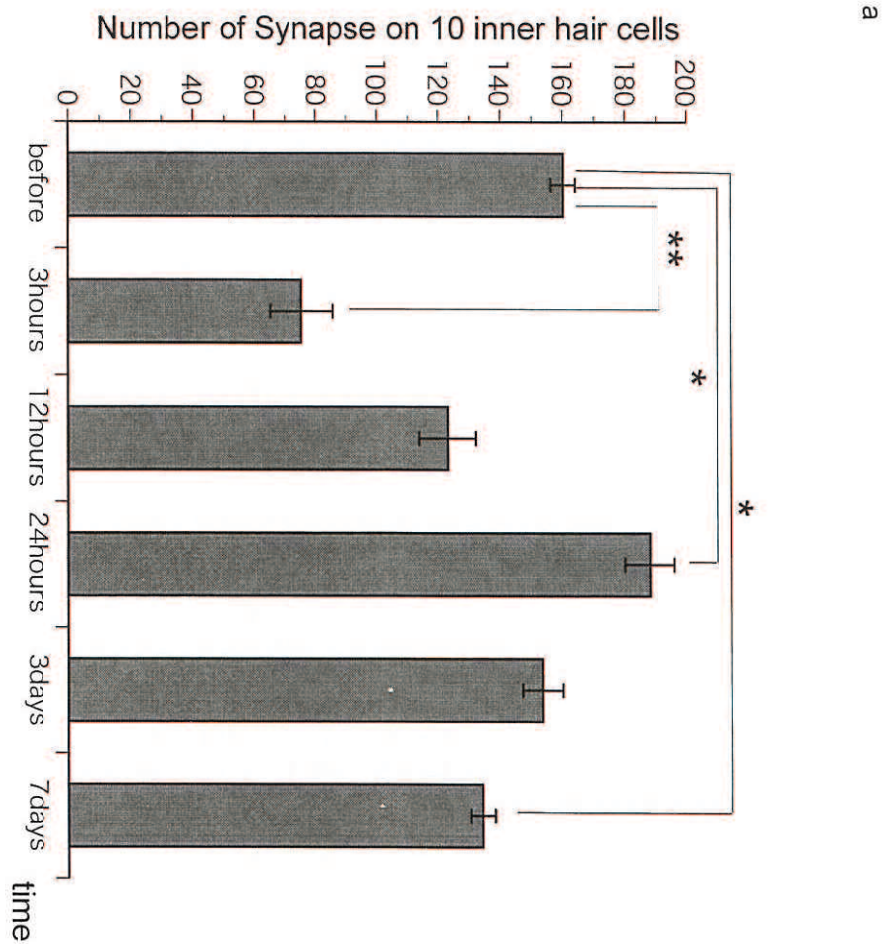


After noise exposure (14 days)



outer hair cell

Fig.3



## 図表の説明

### Figure 1 : ABR閾値

音響曝露前後の8 kHzでのABR閾値を示す。縦軸に閾値 dB SPL、横軸には音響曝露前後の日数を示している。n=8。音響曝露前は約5 dB、音響曝露直後では約45 dBであり、徐々に回復していくが、音響曝露前のレベルまでには回復しない。

### Figure 2 : 音響曝露後の蝸牛第2回転コルチ器の外有毛細胞

音響曝露前と音響曝露後14日後の蝸牛コルチ器の蝸牛第2回転標本の外有毛細胞の写真を示す。外有毛細胞は欠損を認めない。Scale bar = 20  $\mu$  m.

### Figure 3 : 音響曝露前後のシナプスリボン数の変化

(a) 音響曝露前、音響曝露後3時間後、12時間後、24時間後、3日後、7日後の蝸牛コルチ器の蝸牛第2回転内有毛細胞10個あたりのシナプスリボン数を示す。縦軸に内有毛細胞10個あたりのシナプスリボン数、横軸に音響曝露後の時間を示す。n=6。

(b) (a) で比較した蝸牛コルチ器の蝸牛第2回転内有毛細胞のシナプスリボンを示す。音響曝露後3時間でシナプスリボンの減少が見られるも、徐々にシナプスリボン数が増加し24時間では音響曝露前のシナプスリボン数より多くなり、その後徐々に減少し音響曝露後7日後ではシナプスリボン数は音響曝露前よりやや減少した。n = 6。Scale bar = 10  $\mu$  m.