

学位論文（博士）

エイコサペンタエン酸エチルエステルの
経口摂取による糖尿病モデルマウスの
進行性難聴の予防

氏名 松浦 貴文

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 耳鼻咽喉科学

令和5年1月

目 次

1. 要旨	1
2. 研究の背景	3
3. 目的	5
4. 方法	6
5. 結果	12
6. 考察	16
7. 結語	21
8. 研究資金	22
9. 謝辞	23
10. 参考文献	24
11. 図表	28
12. 図表の説明	34

1. 要旨

背景：糖尿病患者における聴覚障害の有病率は有意に高く、その予防法の開発が望まれている。

目的：本研究では、糖尿病マウスに対するエイコサペンタエン酸（EPA）投与による早期難聴の予防効果を検討した。

方法：糖尿病モデルとして TSOD（Tsumura, Suzuki, Obese Diabetes）マウスを、コントロールとして TSNO（Tsumura, Suzuki, Non Obesity）マウスを使用した。TSNO 群と TSOD（EPA-）群（ひまわり油投与）、TSOD（EPA+）群（EPA 投与）の 3 群に分けた。聴性脳幹反応（ABR）を測定し、蝸牛を組織学的に評価した。

結果：TSOD（EPA+）群は TSOD（EPA-）群に比べ、閾値の上昇が小さい傾向を認めた。TSOD（EPA+）群では、生後 11 ヶ月から 14 ヶ月にかけて、4kHz での ABR 閾値が TSOD（EPA-）群よりも有意に低かった。TSOD（EPA-）群では、血管条の毛細血管内腔の狭小化と蝸牛軸における血管壁の肥厚が観察された。

結論：TSOD マウスに対する EPA 投与による蝸牛血管の動脈硬化の抑制は、
加齢に伴う早期難聴を抑制することが示唆された。

2. 研究の背景

国際糖尿病連合によると、現在、世界的に成人の 10 人に 1 人以上が糖尿病を患っており、今後も糖尿病患者の数は急速に増加されている[1]。また、糖尿病患者における聴覚障害の有病率は、糖尿病でない患者よりも有意に高いことが分かっている[2]。

我々は以前、2 型糖尿病を有するメタボリックシンドロームモデルマウスが早期に難聴を呈し、病理組織学的に、蝸牛軸の血管壁の肥厚、血管条の毛細血管の狭窄、蝸牛の慢性的な血流低下からなる所見を示したこと[3]、2 種の漢方薬の内服により糖尿病モデルマウスの聴覚障害を予防できることを報告した[4]。

エイコサペンタエン酸（EPA）の投与は、抗肥満作用を発揮すること[5]、インスリン分泌および感受性を改善すること[6]、抗動脈血栓作用があること[7]が報告されており、糖尿病マウスの早期難聴予防効果が期待される。

EPA の経口投与は、肥満ラットの視床下部における脳由来神経栄養因子（BDNF）の発現低下を回復させることが報告されており[8]、糖尿病網膜症における網膜の BDNF 減少や網膜神経細胞機能障害を改善させることも報告されている[9]。また、聴覚障害者の耳に外因性 BDNF を投与すると、らせん神経節細胞の生存と神経突起のリモデリングが有意に促進されることが報告されている[10]。加齢性難聴では、一般的に基底回転のらせん神経節細胞の変性と減少が

見られ [11] [12]、EPA の経口投与には加齢性難聴の予防効果も期待される。

3. 目的

本研究では、EPA の投与による糖尿病マウスの早期難聴予防効果について検討した。また、マウスの加齢性難聴に対する EPA 投与の効果についても検討した。

4. 方法

実験動物

ddY 系統の肥満オスマウスを選択的に繁殖させ、体重の重さと尿中グルコースの出現を指標として、肥満と尿中グルコースを持つ系統 (Tsumura, Suzuki, Obese Diabetes: TSOD) と持たない系統 (Tsumura, Suzuki, Non Obesity: TSNO) が作成された。TSOD マウスは、多食、高度肥満、高血糖、高インスリン血症、高脂血症など、ヒトの肥満型糖尿病の特徴を示す[13]。

本研究では、TSOD マウスを自然発症の 2 型糖尿病モデルとして用い、TSNO マウスをコントロールとして用いた。マウスはすべて動物飼育研究所 (日本、茨城) より入手した。

マウスを①TSNO 群 (TSNO マウスにヒマワリ油 (5%) を添加した魚粉抜き標準飼料 (CE-2; 日本クレア株式会社) を投与)、②TSOD (EPA-) 群 (TSOD マウスに TSNO 群と同様の飼料を投与)、③TSOD (EPA+) 群 (TSOD マウスに、EPA の高純度かつ安定なエチルエステルである EPA エチルエステル (EPA-E) (澤井薬品株式会社) 5% を添加した魚粉抜き標準飼料を投与) の 3 群に分けた。各群には 10 匹ずつマウスを用意した。

体重および血糖値の測定

マウスの体重と血糖値を 4 週間ごとに測定した。血糖値は、グルコースパイロットグルコメーター (Syntron Bioresearch, Inc. Carlsbad, CA. USA) を用いて測定した。

聴性脳幹反応 (ABR) の評価

マウスの聴覚機能を評価するため、電気生理学的聴覚検査を用いて聴性脳幹反応 (ABR) を測定した。塩酸メデトミジン (0.3 mg/kg、日本全薬工業、福島県)、ミダゾラム (4 mg/kg、アステラス製薬、東京都)、酒石酸ブトルファノール (5 mg/kg、明治製菓、東京都) を腹腔内投与して全身麻酔を行い、ABR を記録した。聴覚刺激のため、イヤホンを外耳道に挿入した。聴覚刺激は、4, 8, 16, 32 kHz のトーンバースト (立ち上がり・立ち下がり時間 2 ms, 持続時間 4 ms) で構成された。白金針電極を用い、右側頭部の皮下に正電極、左側頭部の皮下に負電極、体幹に GND 電極を挿入し、反応を記録した。刺激数は 256 回、応答は高周波聴覚信号処理装置 (RZ6、Tucker-Davis Technologies, Gainesville, Florida, USA) を用いて記録した。刺激速度は 21/sec、周期は 47.619/ms、時間窓は 10ms であった。すべて 100Hz のハイパス、5kHz のローパス、60Hz のノッチフィルターで処理した。ABR 波形の wave1 が確認できる最も低い刺激を ABR 閾値とした。測定終了後、マウスに塩酸アチパメゾール (3mg/kg ; 日本全

薬工業、福島県) を腹腔内投与し、覚醒させた。

病理組織学的評価

TSNO マウス 3 匹は、実験開始時に難聴を呈していたため除外した。経過中、

TSOD (EPA-) 群のマウス 1 匹と TSOD (EPA+) 群のマウス 3 匹は死亡した。

16 ヶ月齢のマウスに、塩酸メデトミジン (0.6mg/kg、日本全薬工業、福島県)、

ミダゾラム (8mg/kg、アステラス製薬、東京都)、酒石酸ブトルファノール

(10mg/kg、明治製菓、東京都) の混合物を腹腔内投与して深麻酔を施した。

ヘマトキシリン・エオジン染色

TSNO 群 4 匹、TSOD (EPA-) 群 5 匹、TSOD (EPA+) 群 4 匹のマウスを

4%パラホルムアルデヒドで経心筋灌流により固定した。マウスを断頭し、側

頭骨を摘出した。側頭骨から蝸牛を摘出し、蝸牛への灌流固定のため、卵円窓

から前庭に 4%パラホルムアルデヒドを注入した。固定後、蝸牛を EDTA 脱灰

液 (同仁堂研究所, 日本, 熊本) に室温で 3 日間浸漬し、脱灰を行った。同じ

個体で、片方の蝸牛をヘマトキシリン・エオジン染色し、もう片方を免疫染色

して BDNF の発現を評価した。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄後、片側の蝸牛をプラスチックに包埋し、 $3\mu\text{m}$ の薄切片を水平に作成した。これらの切片をヘマトキシリン溶液に 15 分間浸漬して核染色を行い、流水で 5 分間洗浄して余分な染色剤を除去した。次にこの切片をエオシン溶液に 10 分間浸し、細胞質染色を行った。エタノールで脱水・脱色し、レモゾール A (富士フイルム和光純薬、大阪、日本) で洗浄し、乾燥後マウントした。ImageJ ソフトウェアを用い、蝸牛軸血管の狭窄率とらせん神経節細胞数を比較した。

免疫染色

脱灰後、蝸牛を 0.5 g ウシ血清アルブミン、 $200\ \mu\text{L}$ ヤギ血清、 $200\ \mu\text{L}$ ウマ血清、 $200\ \mu\text{L}$ TritonX-100 および $50\ \text{mL}$ の PBS からなるブロッキング溶液を用いて 4°C 下で一晩ブロッキングした。蝸牛をブロッキング液で調製した BDNF に対するウサギ抗体 (EPR1292, 1 : 200 ; Abcam) に浸し、真空デシケーターで 10 分間脱気し、 4°C で一晩静置した。ブロッキング液で 20 分間ずつ 4 回洗浄した。ブロッキング液で調製したウサギ IgG に対するヤギ抗体 (Alexa Fluor 594, 1:500; Thermo Fisher Scientific) に浸漬し、真空デシケーター中で 10 分間脱気した後、 4°C で一晩静置した。ブロッキング液で 20 分間ずつ 4 回洗浄した。プラスチックに包埋し、 $3\mu\text{m}$ の薄切片を水平に作成

し、マウントした。ImageJ ソフトウェアを用い、らせん神経節における BDNF 発現領域を比較した。

インクによる血管染色

残りのマウスをインク (Fount India; Pelikan, Feusisberg, Switzerland) で染色し、毛細血管内腔を解析した[14]。インクをマウスの左心室に注入し、その後心臓灌流を行った。マウスを断頭し、側頭骨を摘出した。側頭骨から蝸牛を取り出し、蝸牛への灌流固定のため、卵円窓から前庭に 4%パラフォルムアルデヒドを注入した。固定後、蝸牛を EDTA 脱灰液 (DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan) に室温で 3 日間浸漬し、脱灰した。PBS で洗浄後、70%グリセリンに 2 日間、側頭骨が透明になるまで浸漬した。試料はサーフェスプレパレーション法を用いて検査用に準備した。ImageJ ソフトウェアを用い、血管条毛細血管の血管面積を比較した。標本は蛍光デジタル顕微鏡システム (BZ-X810; Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察した。

統計解析

すべてのデータは、平均値±標準誤差で示した。すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィ

カルユーザーインターフェースである **EZR** (埼玉医療センター、自治医科大学、日本) を用いて実施した。正確には、生物統計学で頻繁に使用される統計関数を追加するために設計された **R** コマンダーの修正版である [15]。3 群間の比較には、**Kruskal-Wallis** 順位和検定と **Steel** または **Steel-Dwass** 検定が用いられた。統計的有意性は $P < 0.05$ とした。四分位範囲の 1.5 倍以上の値は外れ値として扱った。効果量を示すために、**Cliff's delta** を用いた。

5. 結果

体重と血糖値

すべての月齢で、TSNO マウスの体重は TSOD マウスより有意に少なかった (図 1A)。TSOD マウスは 2-3 ヶ月齢で顕著に体重が増加した。TSOD (EPA-) 群では 7-14 ヶ月齢で 60g を超える重度の肥満を示したが、TSOD (EPA+) 群では 8-14 ヶ月齢で重度の肥満を示した。TSOD (EPA+) 群は TSOD (EPA-) 群に比べ、生後 7、8、11 ヶ月の体重が有意に低かった (Cliff's delta = 0.8、0.63、0.71)。

TSNO マウスの血糖値は、比較的安定していた (図 1B)。全体として、TSOD マウスの血糖値は変動が大きく、10 ヶ月齢まで血糖値が徐々に上昇し、その後、徐々に低下した。一部の TSOD マウスは時折高血糖を示したが、平均すると軽度の高血糖に過ぎなかった。

ABR 評価

ABR 閾値は、ほとんどのマウス、周波数で漸増傾向を示した (図 2)。TSOD (EPA+) 群は TSOD (EPA-) 群に比べ、4、8、16 kHz で閾値の上昇傾向が低かった。32kHz の ABR 閾値は、TSOD (EPA-) 群と TSOD (EPA+) 群の間で傾向に差はなかった。TSOD マウスは 32 kHz で早期にスケールアウトしたた

め、32 kHz での ABR 測定は生後 11 ヶ月で終了した。

6 ヶ月連続で外れ値を示した TSOD (EPA-) 群のマウス 1 匹を除くと、TSOD (EPA+) 群は生後 11 ヶ月から 14 ヶ月まで 4kHz において TSOD (EPA-) 群より有意に低い閾値を示した (Cliff's delta=0.69、0.68、0.67、0.64)。4kHz では、TSNO 群は TSOD (EPA-) 群より生後 10~16 ヶ月の ABR 閾値が有意に低く、TSOD (EPA+) 群より生後 15~16 ヶ月の ABR 閾値が有意に低かった。8kHz では、TSNO 群は TSOD (EPA-) 群よりも生後 11-16 ヶ月の ABR 閾値が有意に低く、TSOD (EPA+) 群よりも生後 14-16 ヶ月の ABR 閾値が有意に低かった。16kHz では、生後 13-15 ヶ月で TSNO 群の方が TSOD (EPA-) 群よりも ABR 閾値が有意に低かった。32 kHz では、生後 9 ヶ月の時点で、TSNO 群の ABR 閾値は TSOD (EPA-) 群よりも有意に低かった。

病理組織学的評価

ヘマトキシリン・エオジン染色では、コルチ器、外膜、らせん靭帯に明らかな差は認められなかった。TSOD (EPA-) 群では、基部回転の血管条の毛細血管内腔の狭小化が観察された (図 3A-C)。TSNO 群と TSOD (EPA+) 群では、血管条の毛細血管内腔に明らかな差は見られなかった。また、頂回転の血管条にも差は認められなかった。TSOD (EPA-) 群では、TSOD (EPA+) 群に比べ血管

壁の肥厚が一部で見られた (図 3D-F)。TSNO 群と TSOD (EPA+) 群では、蝸牛軸内の血管壁に明らかな差は見られなかった。らせん神経節細胞の比較では、TSNO 群と TSOD (EPA-) 群で基底回転におけるらせん神経節細胞の著しい減少および変性が認められた (図 3G-I)。頂回転のらせん神経節細胞には差は認められなかった。

蝸牛のインクによる血管染色では、TSNO および TSOD (EPA-) 群では血管条の毛細血管密度が軽度低下していた (図 4A-C)。また、グラフィックソフト ImageJ で測定した TSOD (EPA-) 群の蝸牛側壁の血管面積は、TSOD (EPA+) 群に比べ有意に小さかった (Cliff's delta=0.6) (図 4D)。

蝸牛軸におけるヘマトキシリン・エオジン染色した血管の狭窄率に着目すると、TSOD (EPA-) 群は TSNO 群および TSOD (EPA+) 群と比較して有意に高い狭窄率が観察された (Cliff's delta=0.97) (図 4E)。

10,000 μm^2 あたりのらせん神経節細胞数を比較すると、頂回転では有意差は認められなかった (図 5)。基底回転では、TSOD (EPA+) 群は TSNO 群および TSOD (EPA-) 群よりも有意にらせん神経節細胞が多かった (Cliff's delta=0.92 および 0.98)。

BDNF の発現を評価するために免疫染色を行ったところ、コルチ器では有意差はなかったが、らせん板縁とらせん神経節細胞での BDNF 発現は TSNO 群

および TSOD (EPA-) 群に比べ TSOD (EPA+) 群で顕著に見られた (図 6A-F)。定量的な評価では、TSOD (EPA+) 群は TSNO 群および TSOD (EPA-) 群に比べて、らせん神経節細胞の BDNF 免疫標識シグナルが高い傾向にあったが、標本数が少なかったため、その差は統計学的に有意ではなかった (Kruskal-Wallis 検定 ; $P=0.0687$ 、Cliff's delta = 0.8 および 0.81) (図 6G)。

6. 考察

TSOD マウスは、ヒトの肥満型糖尿病の特徴を示す[13]。以前に報告と同様に、TSOD マウスは、すべての年齢で TSNO マウスよりも有意に高い体重を有していた[3]。一方、TSOD (EPA+) 群は、TSOD (EPA-) 群に比べ、7、8、11 ヶ月齢で有意に低い体重を示した。TSOD (EPA-) 群には魚粉抜きヒマワリ油を添加した標準飼料を与え、TSOD (EPA+) 群には魚粉抜きの EPA-E を添加した標準飼料を与えた。TSOD (EPA-) 群の飼料は 100g あたり 379.9kcal、TSOD (EPA+) 群の飼料は 100g あたり 376.9kcal であり、ほとんど差はなかった。両群の食物摂取量にも差はなく、両群の体重の差は、EPA 投与の効果によるものと思われた。EPA の投与は、G タンパク質共役型受容体 120 (GPR120) のダウンレギュレーションにより、脂質合成を抑制することが報告されている。また、EPA は GPR120 のシグナル伝達とは独立したメカニズムで抗肥満効果を発揮する[5]。

TSOD マウスの血糖値はばらつきが大きく、以前の報告よりも平均的に低かった。高齢になるほど血糖値が低くなる傾向があり、これはこれまでの報告でも認められた。EPA の作用として、G タンパク質受容体を介した腸内分泌 L 細胞からのグルカゴン様ペプチド 1 の放出の増加、アペリン経路のアップレギュレーション、他の制御経路のダウンレギュレーションがあり、膵臓 β 細胞によるイ

ンスリン分泌を促進する。アディポカインに対する炎症反応の抑制、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体 α の作用抑制、インスリン様成長因子 1 の分泌低下抑制とともに、末梢のインスリン反応を改善することも報告されている。しかしながら、TSOD (EPA-) 群と TSOD (EPA+) 群との間に差はなかった[6]。TSOD マウスは遺伝的に均質でないとされており、血糖値のばらつきが大きく、平均血糖値がこれまでの報告より低かったのは、個体差によるものであると考えられた。

糖尿病患者は健常者に比べて比較的早い時期に難聴になるとされる[16]。通常加齢性難聴は高音域から始まり進行することが知られているが、糖尿病患者では高音域だけでなく中低音域でも難聴が多く見られる[17]。我々は以前、2、4、8 kHz において、TSOD マウスは TSNO マウスと比較して早期加齢性難聴を示すことを報告した[3]。TSNO 群と TSOD (EPA-) 群を比較すると、本研究では 4 kHz と 8 kHz で同様の結果が得られ、さらに TSOD マウスでは 16 kHz と 32 kHz で早期聴力低下が観察されました。

TSOD マウスに EPA を投与すると、4 kHz で加齢に伴う早期難聴が有意に抑制され、8 kHz と 16 kHz で難聴が軽減する傾向が見られた。TSOD (EPA-) 群のマウス 1 匹を除いて初めて有意差が認められたが、その効果量は大きく、4kHz が中低周波数域であることを考慮すると、EPA が聴力維持に大きな影響を与え

たことが示唆された。我々は以前、TSOD マウスの難聴の進行に蝸牛血管の動脈硬化が影響していることを報告した[3]。今回、TSOD (EPA-) 群では、HE 染色において、蝸牛軸の血管壁の肥厚と血管条の毛細血管の狭窄の傾向がみられた。しかし、TSOD (EPA+) 群では、これらの所見は軽度であった。蝸牛の血管をインクで染色したところ、TSOD マウスに EPA を投与すると、蝸牛の側壁の血管密度の低下が有意に抑制されることがわかった。EPA には抗動脈血栓作用があり、これは脂質・糖代謝の改善、抗血小板作用、抗炎症作用、動脈硬化性プラークの安定化などによると考えられている[7]。TSOD マウスへの EPA 投与による蝸牛血管の動脈硬化の抑制は、加齢に伴う早期難聴を抑制することが示唆された。

TSOD マウスに EPA を投与すると、蝸牛の基部回転のらせん神経節細胞の減少と変性が有意に抑制された。注目すべきことに、TSNO 群と比較しても、TSOD (EPA+) 群ではらせん神経節細胞の減少と変性が有意に抑制されていた。通常に加齢性難聴では、一般的に基底回転にらせん神経節細胞の変性と減少が見られる[11][12]。このことから、EPA の投与は、糖尿病やメタボリックシンドロームの有無にかかわらず、通常に加齢性難聴を予防する可能性があることが示唆された。しかしながら、本研究では、高音域における ABR 閾値に TSOD(EPA-) 群と TSOD(EPA+)群との間で差は認められなかった。

免疫染色の結果、EPA 投与は内耳における BDNF の発現を促進することが示唆された。コルチ器では差がなかったが、TSOD (EPA+) 群ではらせん板縁とらせん神経節細胞で BDNF の発現が顕著にみられた。らせん板縁においてはモルモットの蝸牛を用いた研究でポリシアル酸の検出が報告されており[18]、ポリシアル酸は、BDNF を含むいくつかの神経栄養因子のリザーバーとして機能することが報告されている[19]。TSOD (EPA+) 群では、らせん神経節細胞の減少や変性が防止されることに加え、らせん神経節細胞における BDNF の発現が TSNO 群よりも顕著であった。BDNF は、発達中の蝸牛における SGN の生存と神経突起の伸長を制御している[20]。また、聴覚障害者の耳に外因性 BDNF を投与すると、らせん神経節細胞の生存と神経突起のリモデリングが有意に促進される[10]。EPA の投与によって誘導される BDNF の発現は、らせん神経節細胞の変性や減少の防止に寄与していることが示唆された。

我々は以前、TSOD マウスのらせん神経節細胞の障害が生後 13 ヶ月まで TSNO マウスと同程度であることを観察している[3]。本研究では、TSNO 群と TSOD (EPA-) 群の間で、らせん神経節細胞に有意な差は見られないが、両群の間で ABR 閾値に有意な差が見られた。この ABR 閾値の差は、らせん神経節細胞の減少とは関係なく、蝸牛血管の動脈硬化が原因であると考えられた。しかし、TSNO 群と TSOD (EPA+) 群では、TSOD (EPA+) 群の方がらせん神経節細胞

胞が多く、TSNO 群と TSOD (EPA+) 群では蝸牛の動脈硬化に有意差がないことから、両群の ABR 閾値の差はらせん神経節細胞の減少や蝸牛の動脈硬化以外の要因が関係している可能性がある。

我々は以前、TSOD マウスに漢方薬を経口投与すると ABR 閾値の上昇と蝸牛血管の狭窄が抑制されることを報告した[4]。TSOD マウスへの EPA 投与による早期難聴の予防は、蝸牛血管の狭窄の予防が影響していることが示唆され、らせん神経節細胞の変性、減少の予防の影響は不明であった。TSNO 群と TSOD (EPA+) 群との聴力の差の原因については、今後多角的に検討する必要があると思われた。

7. 結語

TSOD マウスにおける EPA 投与による蝸牛血管の動脈硬化抑制が早期加齢性難聴を抑制し、EPA 投与による BDNF 発現がらせん神経節細胞の変性防止に寄与していることが示唆された。本研究で TSOD マウスに認められた早期加齢性難聴の抑制は、EPA 投与による蝸牛血管の動脈硬化の抑制に起因すると考えられた。TSNO マウスと TSOD マウスの ABR 閾値の差の原因については、多角的な検討が必要である。

8. 研究資金

本研究は、文部科学省科学研究費補助金(20K09733)の支援を受けて行われた。

9. 謝辞

本研究を行うにあたり丁寧に御指導いただきました山口大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科学教授山下裕司先生に深謝いたします。

10. 参考文献

- [1] Sun H, Saeedi P, Karuranga S, et al. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* 2022;183:109119.
- [2] Horikawa C, Kodama S, Tanaka S, et al. Diabetes and Risk of Hearing Impairment in Adults: A Meta-Analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:51–58.
- [3] Tsuda J, Sugahara K, Hori T, et al. A study of hearing function and histopathologic changes in the cochlea of the type 2 diabetes model Tsumura Suzuki obese diabetes mouse. *Acta Oto-Laryngol.* 2016;136:1097–1106.
- [4] Hori T, Sugahara K, Tsuda J, et al. Oral administration of an herbal medicine to prevent progressive hearing loss in a mouse model of diabetes. *Auris Nasus Larynx.* 2019;46:703–708.
- [5] Wei W, Hu M, Huang J, et al. Anti-obesity effects of DHA and EPA in high fat-induced insulin resistant mice. *Food Funct.* 2021;12(4):1614–1625.
- [6] Bhaswant M, Poudyal H, Brown L. Mechanisms of enhanced insulin secretion and sensitivity with n-3 unsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem.* 2015;26:571–584.

- [7] Yanai H, Masui Y, Katsuyama H, et al. An Improvement of Cardiovascular Risk Factors by Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *J Clin Med Res.* 2018;10(4):281–289.
- [8] Abdel-Maksoud SM, Hassanein SI, Gohar NA, et al. Investigation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression in hypothalamus of obese rats: Modulation by omega-3 fatty acids. *Nutr Neurosci.* 2017;8:443–448.
- [9] Suzumura A, Kaneko H, Funahashi Y, et al. n-3 Fatty Acid and Its Metabolite 18-HEPE Ameliorate Retinal Neuronal Cell Dysfunction by Enhancing Muller BDNF in Diabetic Retinopathy. *Diabetes.* 2020;69:724–735.
- [10] McGuinness SL, Shepherd RK. Exogenous BDNF rescues rat spiral ganglion neurons in vivo. *Otol Neurotol.* 2005;26:1064-1072
- [11] Dazert S, Feldman ML, Keithley EM. Cochlear spiral ganglion cell degeneration in wild-caught mice as a function of age. *Hear Res.* 1996;100:101–106.
- [12] Knowles K, Blauch B, Leipold H, et al. Reduction of Spiral Ganglion Neurons in the Aging Canine with Hearing Loss. *Transbound Emerg Dis.*

1989;63:188–199.

[13] Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, et al. A new mouse model of spontaneous diabetes derived from ddY strain. *Exp Anim.* 1999;48(3):181–189.

[14] Iwagaki T, Suzuki T, Nakashima T. Development and regression of cochlear blood vessels in fetal and newborn mice. *Hear Res.* 2000;145:75–81.

[15] Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 2013;48:452–458.

[16] Uchida Y, Sugiura S, Ando F, et al. Diabetes reduces auditory sensitivity in middle-aged listeners more than in elderly listeners: A population-based study of age-related hearing loss. *Med Sci Monit.* 2010;16(7):63-68

[17] Bainbridge KE, Hoffman HJ, Cowie CC. Diabetes and Hearing Impairment in the United States: Audiometric Evidence from the National Health and Nutrition Examination Surveys, 1999–2004. 2008;149(1):1-10

[18] Torihara K, Morimitsu T, Suganuma T, et al. Immunohistochemical localization of polysialic acid in the guinea pig cochlea. *Otologia Fukuoka.* 1996;42:665–669.

[19] Ono S, Hane M, Kitajima K, et al. Novel Regulation of Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2)-mediated Cell Growth by Polysialic Acid. *J Biol Chem.*

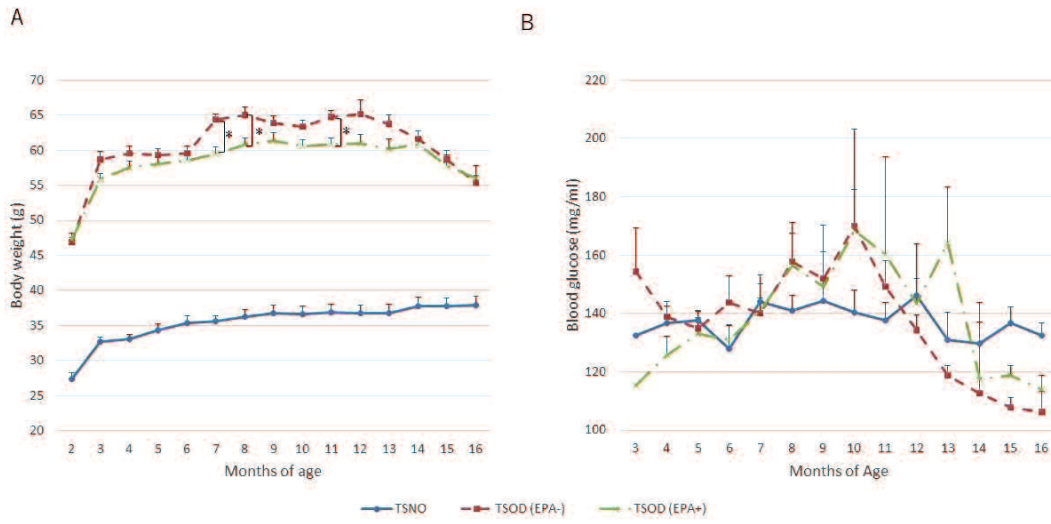
2012;287:3710–3722.

[20] Ernfors P, Water TVD, Loring J, et al. Complementary Roles of BDNF and NT-3 in Vestibular and Auditory Development. *Neuron*. 1995;14:1153–1164.

この論文は *Acta Oto-Laryngologica* に掲載予定の Prevention of progressive hearing loss in a mouse model of diabetes by oral intake of eicosapentaenoic acid ethyl ester から引用したものである。

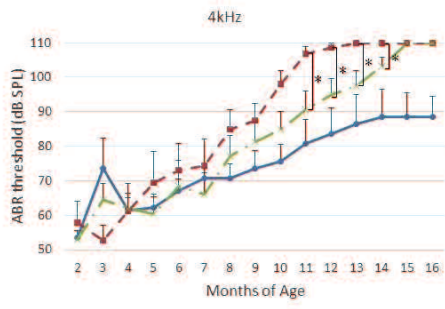
11. 図表

図1

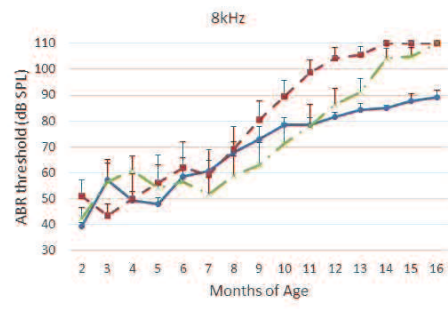


2

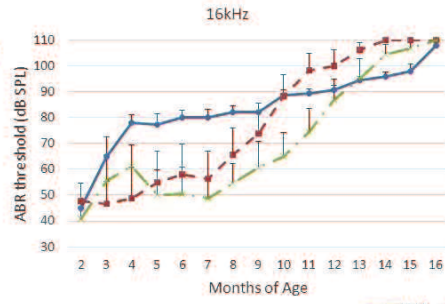
A



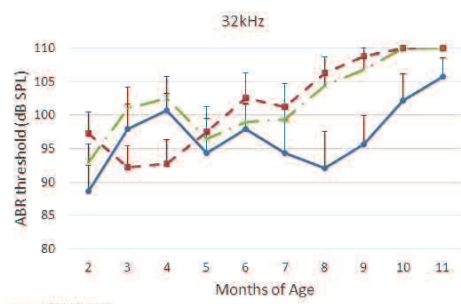
B



C

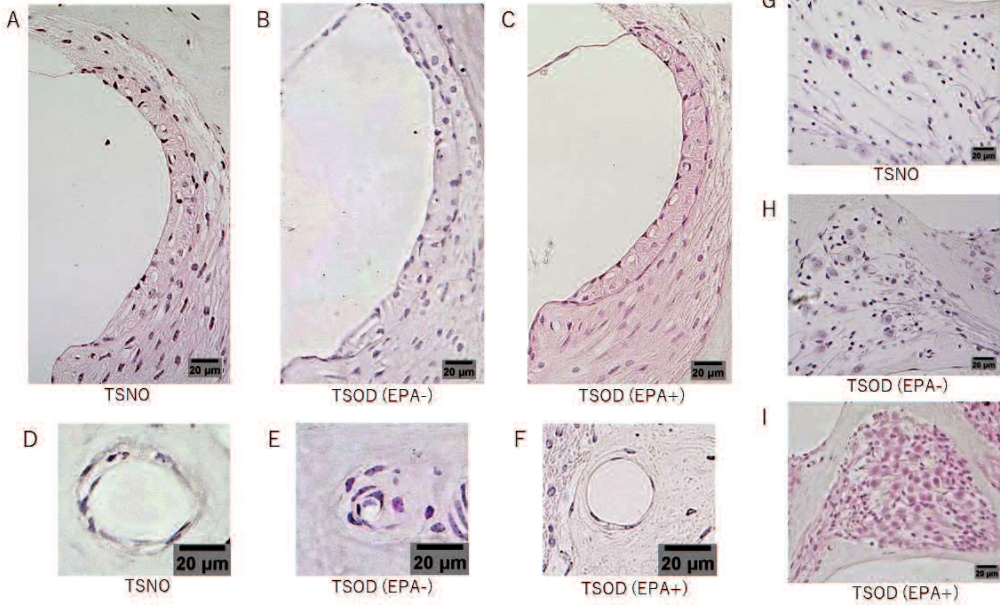


D

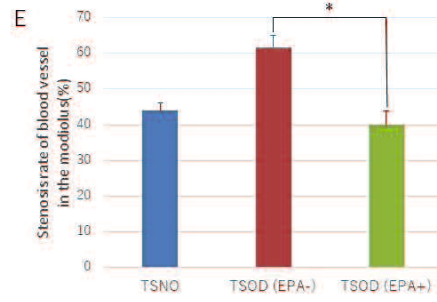
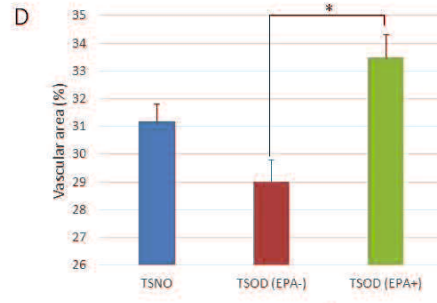
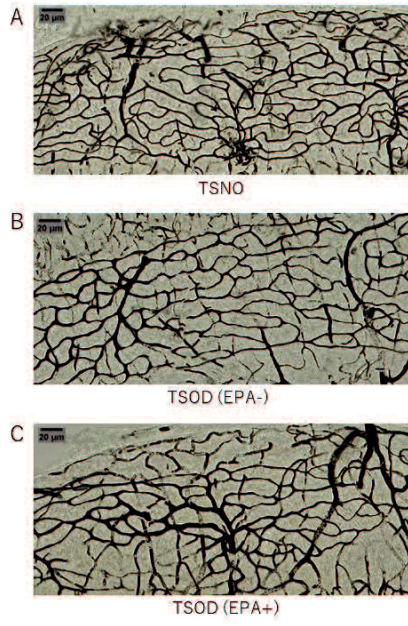


— TSNO — TSOD (EPA-) — TSOD (EPA+)

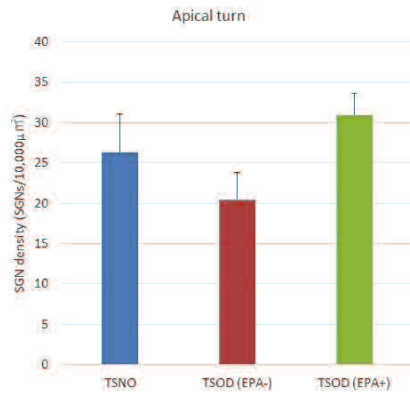
3



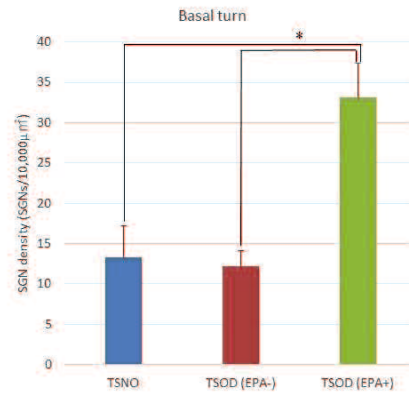
4



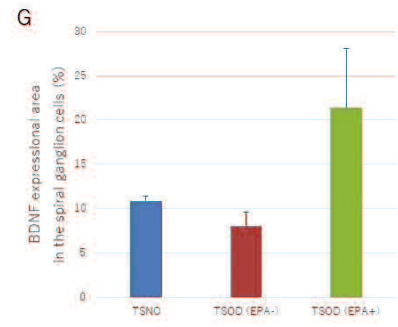
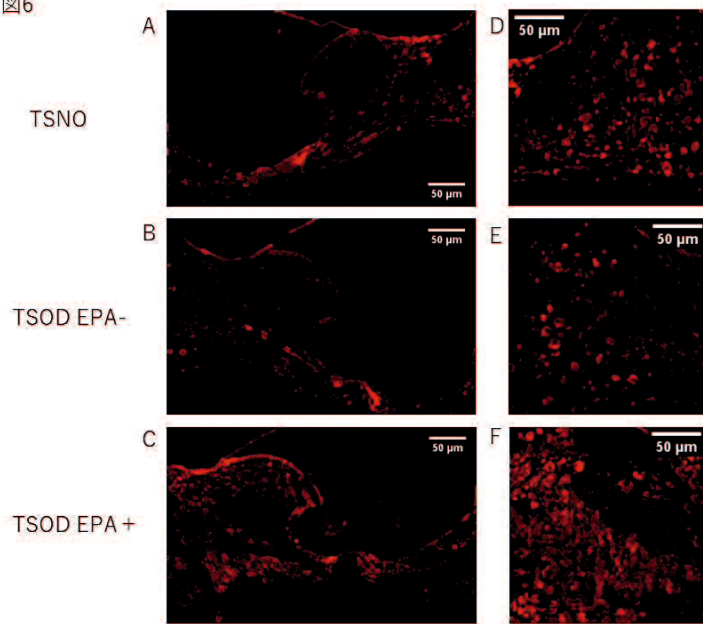
A



B



6



12. 図表の説明

図 1. 体重と血糖値。(A) 縦軸は体重、横軸は年齢を表す。TSOD (EPA+) 群は、TSOD (EPA-) 群に比べ、7、8、11 ヶ月齢の体重が有意に少なかった。すべての年齢で、TSNO マウスは TSOD マウスより有意に体重が少なかった。エラーバーは+1 の標準誤差を示す。*P < 0.05。(B) 縦軸は血糖値、横軸は月齢を表す。TSNO マウスの血糖値は比較的安定していた。TSOD マウスの血糖値は全体的に変動が大きく、10 ヶ月までは血糖値が徐々に上昇し、その後、徐々に低下した。エラーバーは+1 の標準誤差を示す。

図 2. ABR 閾値の変化。縦軸は ABR 閾値 (dB) を表し、横軸は月齢を表している。TSOD (EPA+) 群は、TSOD (EPA-) 群に比べ、4、8、16 kHz での閾値の上昇傾向が低かった。6 ヶ月連続で外れ値を示した TSOD (EPA-) 群のマウス 1 匹を除くと、TSOD (EPA+) 群は生後 11 ヶ月から 14 ヶ月まで TSOD (EPA-) 群よりも 4 kHz で有意に低い閾値を示していた。エラーバーは+1 の標準誤差を示す。*P < 0.05。

図 3.16 ヶ月齢のヘマトキシリン・エオジン染色された蝸牛。(A-C) TSOD (EPA-) 群では基底回転の血管条の毛細血管内腔の狭小化が観察される。TSNO 群と TSOD (EPA+) 群の間で血管条の毛細血管内腔に明らかな差はなかった。(D-F) 蝸牛軸の血管壁には、TSNO 群と TSOD (EPA+) 群との間に明らかな差はなかった。TSOD (EPA-) 群では、TSOD (EPA+) 群の血管壁と比較して、一部の血管壁で壁の肥厚が見られた。(G-I) ラセン神経節細胞の比較では、TSNO および TSOD (EPA-) 群では基底回転におけるラセン神経節細胞の減少および変性が見られた。

図 4. 蝸牛側壁の血管密度および蝸牛軸における血管の狭窄率。(A-C) 蝸牛のインクによる血管染色において、TSNO 群および TSOD (EPA-) 群で血管条の毛細血管密度の減少が認められた。(D) TSOD (EPA-) 群の蝸牛側壁の血管面積は、TSOD (EPA+) 群に比べ有意に小さかった。(E) 蝸牛軸の血管の狭窄率に着目すると、TSOD (EPA-) 群では TSNO 群および TSOD (EPA+) 群と比較して有意に高い狭窄率が観察された。

図 5. らせん神経節細胞密度の比較。10,000 μ m² あたりのらせん神経節細胞数をカウントして比較したところ、頂回転では有意差は認められなかったが、基底回転では TSOD (EPA+) 群において TSNO 群および TSOD (EPA-) 群に比べ有意にらせん神経節細胞数が多かった。

図 6. 蝸牛における BDNF の発現。(A-C) BDNF の発現は、TSNO 群および TSOD (EPA-) 群よりも TSOD (EPA+) 群の方がらせん板縁で多く認められた。コルチ器では有意差はなかった。(D-F) らせん神経節における BDNF の発現は、TSNO 群および TSOD (EPA-) 群よりも TSOD (EPA+) 群で顕著であった。(G) BDNF の発現を定量的に評価すると、TSOD (EPA+) 群は TSNO 群および TSOD (EPA-) 群に比べ、らせん神経節細胞における BDNF の発現量が多い傾向が認められた。