

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591961
 研究課題名（和文） 難聴モデル動物における、内耳の変化と聴覚中枢の発達について
 研究課題名（英文） Development of central auditory system and plasticity of inner ear in congenital deaf model rat
 研究代表者
 伊藤 真人（ITO MAKOTO）
 金沢大学・医学系・准教授
 研究者番号：50283106

研究成果の概要（和文）：先天聾モデルラットを作成し、聴覚中枢の投射と蛋白発現の変化について検討した。下位中枢では下丘投射の減少がみられたが、上位中枢では大きな変化はみられなかった。カルシウム結合蛋白の発現に変化がみられ、Hearing onsetが起きないということが、聴覚中枢の発達に影響をおよぼす事が明らかとなった。また突発性難聴において、抗酸化ビタミンEとCを従来の治療に併用する事で、著明な治癒率の向上が得られた。これは虚血再灌流障害を予防する効果による可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Congenital deafness induced changes in the Calcium-binding proteins in the superior olivary complex in rat. This study may provide some implications regarding the neurochemistry in the auditory brainstem of deaf children. The administration of vitamin E and vitamin C to idiopathic sudden sensorineural hearing loss has beneficial effects by reducing the level of reactive oxygen metabolites produced by inner ear ischemia and reperfusion injury after treatment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：耳鼻咽喉科学、神経科学

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：先天聾モデル動物、聴覚中枢、カルシウム結合蛋白、虚血再灌流障害、ビタミンE

1. 研究開始当初の背景

ヒトでは先天聾の幼児における人工内耳の有用性が確立されており、適応年齢も若年化してきている。このことからヒトの先天聾の多くの症例では、中枢聴覚中継路の発達は正常に近いと推測されている。ところが従来研究に用いられてきた先天聾動物モデルは、ヒトの先天性内耳性難聴の病態と大きくかけ離れた高度障害モデルであり、人工内耳の

適応とされるラセン神経節細胞が生存しているような難聴のモデルではなかった。従来困難とされてきた、ヒトの先天聾に類似したラセン神経節細胞の破壊を伴わない状態での先天聾動物モデルを確立し、Hearing onsetが起らないということが、その後の聴覚中枢の発達に及ぼす影響について検討する事を着想に至った。

また後天性難聴である突発性難聴におい

ては、その原因が不明であるがために「虚血再灌流障害の予防」についてはほとんど顧みられてこなかった。急性感音性難聴の原因が何にせよ、その病態を悪化させる要因として、循環障害がある。そして虚血があるところには必ず虚血再灌流障害が起きることから、突発性難聴においても種々の治療によって血流が改善されると、逆に内耳障害を悪化させてしまう可能性が高い。血流改善治療とラジカルスカベンジャーの併用治療によって、高い治癒率を得られる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、ラセン神経節細胞の破壊を伴わないで難聴を来すような、ヒトの先天性内耳性難聴に類似した仔ラット先天聾モデルを確立し、聴覚中枢の生後発達を調べることにより、先天聾児の聴覚中枢の状態を知り、小児人工内耳手術の有用性とその限界を知ることができる。

突発性難聴は発症頻度の高い後天性の急性感音性難聴であるが、原因不明であるため多剤併用治療が行なわれている。しかし原因の如何に関わらず、その病態として、内耳における酸化物質の産生が内耳障害に関与することが知られている。また、二次的に励起される内耳の微小循環の障害が、病態形成に関与すると推測されている。さらに治療による虚血再灌流によって励起されるラジカル障害（虚血再灌流障害）を予防する事で、治癒率が改善するか否かを検討した。

3. 研究の方法

(1)ヒトの先天聾に類似した、先天聾動物モデルの作成

①新生児期半規管吸引モデル、②新生児期蝸牛吸引モデル、③新生児期蝸牛エタノール注入モデル、④薬剤性先天聾モデル（カナマイシン投与）などを作成して、ラセン神経節や蝸牛神経核の細胞消失のみられないモデルの確立を試みた。

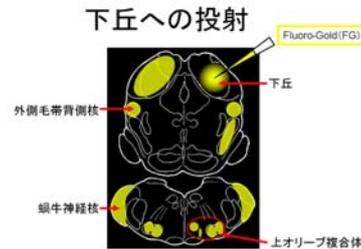
ラットの Hearing onset は生後 12~13 日目なので、①は生後 3 日目 (P3) に外切開にて側頭骨を露出し、ピンポイントで骨を除去して半規管を開窓したうえ、半規管内を吸引した。②は P3 に中耳骨包を開窓し、アブミ骨を除去した上で蝸牛内を吸引した。③は機械的な侵襲を加える事なく、P0~P12 にかけて新生児にカナマイシンを連日腹腔内投与する事で、両側先天聾モデルを作成した。

動物の成長を待ち、ラセン神経節、蝸牛神経核をはじめとした聴覚中枢神経核を検討した。

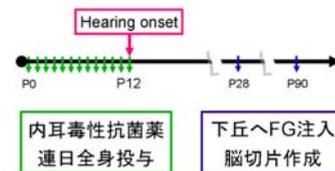
(2)先天聾モデル動物を用いて、ラセン神経節の変性を伴わない難聴（「Hearing onset がない」ということ）が、聴覚中枢の正常発達に何らかの影響を及ぼすか否かについて

検討した。このためには上記③の薬剤性先天聾モデルを使用した。

下丘への上行性投射と、Hearing onset 時に一過性に発現のみられるカルシウム関連蛋白について、Fluoro-Gold を用いた逆行性トレーサー法と免疫染色を用いて検討した。



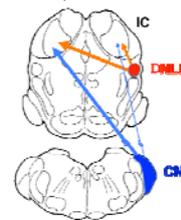
③の薬剤性先天聾モデルにおいて、生後 3 週間目と生後 3 か月経過後とを比較し、下丘投射の経時的変化の有無について検討した。



(3) 片側の難聴モデルと両側の聾モデルにおいて、聴覚中枢の発達に違いが生じるか否かについて検討した。

片側難聴モデルとしては、②の蝸牛内機械的破壊モデルを用いた。同モデルにおいて下丘への上行性の投射 (DNLL-IC, CN-IC 投射) と、Hearing onset 時に一過性に発現のみられるカルシウム関連蛋白について検討した。

(下図：DNLL-IC, CN-IC の正常投射)



(4) 突発性難聴症例 102 例について、抗酸化ビタミンであるビタミン E と C を従来のステロイド治療に併用投与した群 (43 例) と非投与群 (59 例) について、聴力改善度 (hearing gain, recovery rate) を検討した。

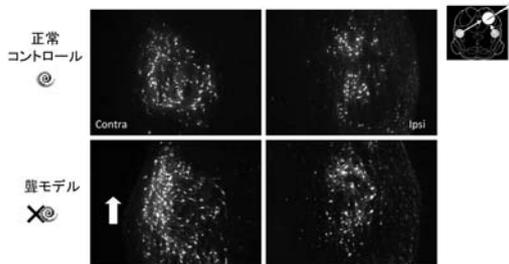
4. 研究成果

(1) 片側聾モデルとしては、ラセン神経節細胞の障害程度が比較的軽度な、②新生児期蝸牛吸引モデルを使用した。しかし P3 において両側蝸牛を吸引した場合、手術死亡率が極めて高い事が判明したため、両側難聴モデルの作成は P12 の Hearing onset 直前に行なった。今回作成した機械的蝸牛障害モデルでは、

過去の報告に比べれば程度は低い、ラセン神経節細胞が一次的に障害されるため、さらにラセン神経節細胞の障害がないモデルとして、③薬剤性先天聾モデルの作成に成功した。

(2) 新生児期 (P12) 蝸牛破壊による両側先天聾モデルラットを作成したところ、蝸牛神経核腹側核の縮小をみとめたものの、蝸牛神経核-下丘への投射に変化はみられなかった。ところが、DNLL-下丘の投射では交叉性投射ニューロン数が増加している所見が得られた。これは実はニューロン数が増加したのではなく、聴覚入力がないことにより、正常発生過程で見られるニューロンの「プログラム細胞死の自殺スイッチ」が入らず、本来淘汰されるべき細胞が残存したのではないかと考えられた。

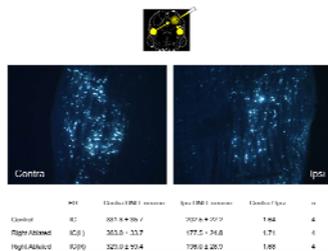
外側毛帯背側核 (DNLL) から下丘への投射



また、③の薬剤性両側性先天聾モデルにおいて、生後3週間目と生後3か月経過後とを比較したところ、生後3週間目に比べて3か月目には蝸牛神経核細胞数の減少がみられた。先天聾では初期に廃用性萎縮などの機序によって、蝸牛神経核では神経細胞数が減少する可能性が示唆された。同様な神経細胞減少は更に上位の中継核ではみられなかった。

(3) 片側先天聾モデルラットを作成し、その聴覚中枢発生 (神経核間の投射) の変化について検討したところ、蝸牛神経核 (CN)-下丘 (IC) への投射には変化がみられたが、外側毛帯核外側核 (DNLL)-IC の投射には明らかな変化はみられなかった。これは、中枢聴覚路は多重性の交叉性投射があるために、健聴側からの入力刺激によって、上位になるほど一側聾の影響が薄まるためであると考えられた。

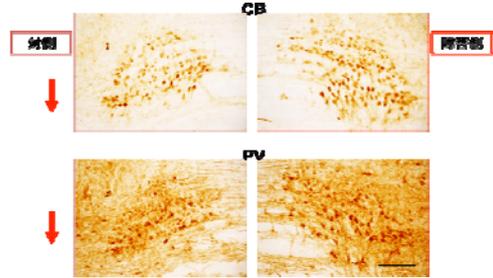
(下図: DNLL-IC 投射に変化はみられなかった)



また、対側の上オリーブ複合体 (SOC) でのカ

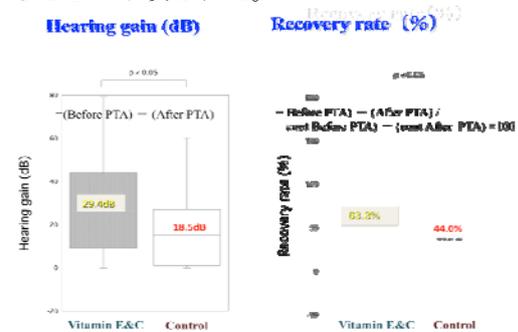
ルシウム結合タンパクの減少をみとめた。カルシウム結合タンパクは神経伝達物質との関連が深く、片側先天聾では台形体核 (MNTB) から外側オリーブ核 (LSO) への入力が増加すると考えられた。

(下図: SOC 内の台形体核 MNTB での CB: カルバイン D、PV: パルブアルブミンの変化)



今後は①中枢神経の正常発達期におこるプログラム細胞死に対する影響と、②聴覚中枢神経核における周波数特異性 (トノトピシティー) の変化に焦点をあてる予定である。

(4) 突発性難聴症例のうち、ビタミン E と C 併用投与群と非投与群では初診時治療前の聴力レベル (70.1dB, 71.2dB)、年齢等に群間の有為差は無かったが、治療効果の判定では Hearing gain (29.4dB, 18.5dB)、Recovery rate (63.3%, 44.0%) では有為にビタミン E と C 併用投与群で成績が良かった。ビタミン E&C は、病態としてみられる内耳の酸化ストレスの除去のみではなく、微小循環障害による内耳虚血後の再灌流障害を軽減する効果があることが示唆された。



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 19 件)

1. Miyako Hatano, Makoto Ito, Tomokazu Yoshizaki, Retrograde Mastoidectomy on Demand with Soft-Wall Reconstruction in Pediatric Cholesteatoma. Acta Otolaryngol 129 (2010), in press, 査読有
2. Jack B. Kelly, Brian A. van Adel, Makoto Ito, Anatomical projections of the

- nuclei of the lateral lemniscus in the albino rat (*Rattus norvegicus*). *J Comp neurol* 512 (2009), 573-593, 査読有
3. Shigeru Hoshida, Miyako Hatano, Mitsuru Furukawa, Makoto Ito, Neuroprotective Effects of Vitamin E on Adult Rat Motoneurons Following Facial Nerve Avulsion. *Acta Otolaryngol* 129 (2009), 330-336, 査読有
 4. Miyako Hatano, Mitsuru Furukawa, Makoto Ito, Changes in Calbindin-D28k and Parvalbumin Expression in Auditory Brainstem Nuclei following Unilateral Cochlear Ablation in Neonatal Rat. *Acta Otolaryngol* 129 (2009), 839-845, 査読有
 5. Ito M, Hatano M, Okoyama S, Kelly JB, Anatomical plasticity in brainstem auditory nuclei following unilateral ablation of the inferior colliculus in neonatal rats. 239 (2008), 92-98, 査読有
 6. Miyako Hatano, Naoki Uramoto, Yozo Okabe, Mitsuru Furukawa, Makoto Ito, Vitamin E and Vitamin C in Treatment of Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. *Acta Otolaryngol* 128 (2008), 116-121, 査読有
 7. M Ito, M Ohbayashi, M Furukawa, S Okoyama, Neuroprotective Effects of TJ-23 on Adult Rat Motoneurons Following Peripheral Facial Nerve Axotomy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 136 (2007), 225-230, 査読有

[学会発表] (計 48 件)

1. Eriko Shima, Miyako Hatano, Kazuya Kurita, Tomokazu Yoshizaki and Makoto Ito, Anatomical plasticity in brainstem auditory nuclei to inferior colliculus following Unilateral Cochlear Ablation in Neonatal Rat. 33rd ARO midwinter meeting 2010 年 2 月 6~10 日 Disneyland Hotel Anaheim (USA)
2. Kazuya Kurita, Eriko Shima, Tomokazu Yoshizaki and Makoto Ito, Clonal spread of beta lactamase producing, amoxicillin clavulanate resistant Strains of Non typeable *Haemophilus influenzae* (BLPACR) among Young Children Attending a Day Care Center in Japan. 33rd ARO midwinter meeting 2010 年 2 月 6~10 日 Disneyland Hotel Anaheim (USA)
3. Hisashi Sugimoto, Makoto Ito, Tomokazu Yoshizaki Analysis of Mechanism of Malignancy Enhanced by Epithelial Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma of the Temporal Bone. 33rd ARO

- midwinter meeting 2010 年 2 月 6~10 日 Disneyland Hotel Anaheim (USA)
4. 伊藤真人, 耳鼻咽喉科領域感染症 中耳炎についての最近の話題第 57 回西日本化学療法学会 第 52 回中日本感染症学会合同学会ワークショップ、2009 年 11 月 26~27 日 名古屋国際会館 (愛知県)
 5. 伊藤真人, 上気道感染症と咽頭細菌叢 保育園児の上咽頭細菌叢の変遷 第 22 回日本口腔咽頭科学会シンポジウム 2009 年 9 月 10~12 日 ホテルアパローム紀国 (和歌山県)
 6. Miyako Hatano, Makoto Ito, Inner ear fistula in cholesteatoma surgery. 8th International conference on Cholesteatoma and ear surgery. 2008 年 6 月 15~20 日 アンタルヤ (Turkey)
 7. Makoto Ito, M Hatano, Treatment of temporal bone squamous cell carcinoma. 8th International conference on Cholesteatoma and ear surgery. 2008 年 6 月 15~20 日 アンタルヤ (Turkey)
 8. Makoto Ito, Yozo Okabe, Mitsuru Furukawa, Miyako Hatano, Vitamin E and Vitamin C in the Treatment of Idiopathic Sudden Sensorineural Hearing Loss. The 12th Japan-Korea Joint Meeting of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery 2008 年 4 月 3~5 日 奈良市公会堂 (奈良県)
 9. Miyako Hatano, Makoto Ito, Changes in Calbindin-D28k and Parvalbumin Expression in Auditory Brainstem Nuclei following Unilateral Cochlear Ablation in Neonatal Rat. AAO-HNSF Annual Meeting. (American Association of Otolaryngology) 2007 年 9 月 16~19 日 Washington DC (USA)
 10. Makoto Ito, Miyako Hatano Protective Effects of Vitamin E After Facial Nerve Injury. AAO-HNSF Annual Meeting 2007 (American Association of Otolaryngology) 2007 年 9 月 16~19 日 Washington DC (USA)

[図書] (計 3 件)

1. 伊藤真人, 日本医事新報社 よくわかる病態生理 14 耳鼻咽喉科疾患, 2009 年, 71-74 頁, 90-93 頁
2. 伊藤真人, 金原出版 急性中耳炎治療入門, 2009 年, 109-113 頁, 135-138 頁
3. 伊藤真人, 医学書院 今日の耳鼻咽喉科・頭頸部外科治療指針 第 3 版, 2008 年, 524-526 頁

[その他]

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med31/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 真人 (ITO MAKOTO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：50283106

(2) 研究分担者

塚谷 才明 (TUKATANI TOSIAKI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：20303307