

研究概要報告書

(/)

研究題目	騒音下における活性酸素発生の蝸牛内ライブイメージング	報告書作成者	吉川 弥生
研究従事者	吉川 弥生、松本 有		
研究目的	<p>多くの内耳組織障害で、酸化ストレスによる細胞障害、細胞死 になっている。突発性難聴や騒音難聴など活性酸素が関与すると言 にもミトコンドリア脳筋症など、エネルギー産生場であるミト 起因する疾患の中には難聴を呈するものが多い(70-80%が進行性 がって、蝸牛内の活性酸素発生メカニズムの解析は、さまざま 法を明らかにする上での手がかりとなると思われる。</p> <p>しかしこれまで、生きた動物の内耳にフリーラジカルを直接発生させて観察する研究は行われておらず、また、内耳での活性 酸素そのものの測定が短い寿命(10⁻⁶秒程度)と高い反応性のためにきわめて困難であったことから、内耳の活性酸素障害に関 しては基礎研究的・病理学的にいくつかの未解明の点が残されていた。</p> <p>本研究は、生体蝸牛でフリーラジカルを直接発生させ観察することで、活性酸素の発生ポイントを時間的空間的に明らかにし、 最終的には騒音難聴などの感音難聴の予防手段をダイレクトに評価するユニバーサルなシステムを構築するものである。</p>		

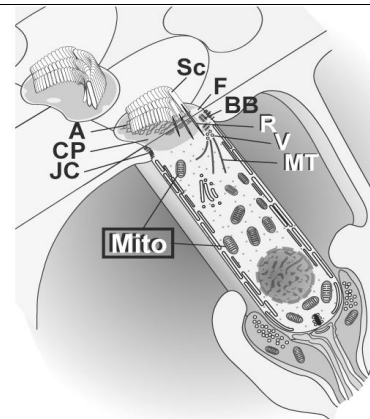


図1 蝸牛有毛細胞内のミトコ
 ンドリア(Mito)。Kikkawa 2008、
著者不明

誘導が共通のメカニズムと
 われる疾患は数多く、その他
 コンドリアの遺伝子異常に
 の感音難聴を合併)。した
 内耳疾患の病態および治療

研究概要報告書

(/)

研究内容	<p>本研究では、モルモット蝸牛での騒音下 in vivo 活性酸素イメージング法の確立 抗酸化剤の聴力保護能測定 を行う。</p> <p>まず、生きたモルモットの蝸牛に騒音曝露によりフリーラジカル（活性酸素）を直接発生させ、これを最近日本で開発された蛍光試薬 Aminophenyl fluorescein (APF)および hydroxyphenyl fluorescein (HPF)を用いて検出する。蝸牛を露出したモルモットを顕微鏡で観察しながら、外耳道に挿入したイヤホンから騒音曝露を行う。検出には高速撮影が可能なコンフォーカル顕微鏡 Nikon A1R を用い、リアルタイムに撮影したデータを3次元再構築する（図1、図2）。</p> <p>検出法が確立すれば、ひき続いて、さまざまな抗酸化剤を投与したモルモットを用い、騒音曝露後のHPFの蛍光発生量を測定して抗酸化剤の騒音難聴予防効果を計測する。具体的には、最近われわれが抗酸化能を培養蝸牛細胞で証明した「水素飽和水」を2週間モルモットに投与し、その後騒音曝露実験を行い結果を純水投与群と比較する。</p> <p>結果、モルモットの蝸牛にミトコンドリア電子伝達系酵素阻害剤であるアンチマイシンAを滴下したところ、フリーラジカルの組織内での発生の可視化（インビボイメージング）が可能であった。また、モルモット音響外傷モデルを用いて、水素ガス含有水の難聴予防効果を測定した。具体的には12匹のモルモットに115 dB SPLの4 kHzバンドノイズを3時間聴取させて音響外傷を作成し、水素飽和水を飲用させた群と純水を飲用させた群とで経時的に蝸牛機能評価（ABRおよびDPOAE検査）を行って比較した。結果から、水素飽和水は測定対象の2 kHz, 4 kHz, 8kHz, 16 kHzのいずれにおいても蝸牛障害の予防に有効であることが明らかになった。</p>
------	--

研究概要報告書

(/)

<p>研究のポイント</p>	<p>近年の研究で、内耳障害のあらゆる面に活性酸素が様々な形で関わっていることが明らかになってきた。したがって、活性酸素の内耳障害メカニズムを詳細に解明することは、感音難聴や耳鳴制圧のための大きなブレークスルーをもたらす可能性がある。具体的には、本研究により活性酸素が騒音曝露の何分後に発生するかが分かれば、工場労働者など騒音下で働く人々やヘッドホンを常用する人々に作業環境改善や適切な休憩のアドバイスを与えることが可能になり、また、このライブイメージングシステムにより抗酸化剤の聴力保護能の評価が簡便に行えるようになれば、新たな老人性難聴や耳鳴の予防剤の開発も期待できる。</p>
<p>研究結果</p>	<p>1．内耳活性酸素発生量可視化システムの確立</p> <p>蛍光試薬 Aminophenyl fluorescein (APF)および hydroxyphenyl fluorescein (HPF)を用い、フリーラジカルの蝸牛内での発生を可視化する方法（インビボイメージング）を開発した。撮影には高速コンフォーカル顕微鏡 Nikon A1R を用い、得られたデータに3次元再構成を行った。また、同じシステムを用いて騒音時の蝸牛内での活性酸素の発生を計測した。</p> <p>2．水素分子（ガス）の内耳での抗酸化作用・感音難聴効果の検証</p> <p>モルモット音響外傷モデルを用いて、水素ガス含有水の難聴予防効果を測定した。12匹のモルモットに115 dB SPLの4 kHzバンドノイズを3時間聴取させて音響外傷を作成し、水素飽和水を飲用させた群と純水を飲用させた群とで経時的に蝸牛機能評価（ABRおよびDPOAE検査）を行って比較した。結果から、水素飽和水は測定対象の2 kHz, 4 kHz, 8kHz, 16 kHzのいずれにおいても蝸牛障害の予防に有効であることが明らかになった。</p>
<p>今後の課題</p>	<p>騒音難聴により発生する活性酸素は極微量で半減期も短いため、今回開発したインビボイメージングシステムでは、活性酸素の発生量および発生位置の詳細測定には至らなかった。今後はシステムを改良し、騒音曝露の何分後に蝸牛内活性酸素が発生してくるのか、および蝸牛内のどこで発生しているかを詳細に測定することが必要である。</p>

モルモットに薬剤(アンチマイシンA:ミトコンドリア電子伝達系阻害剤)を投与し、蝸牛感覚上皮にフリーラジカルを発生させ撮影した(図1、2)。モルモットに活性酸素除去作用を持つ水素飽和水を投与し、騒音による内耳障害を軽減する効果があることを確認した(図3)。



図1 Nikon A1R 高速共焦点顕微鏡

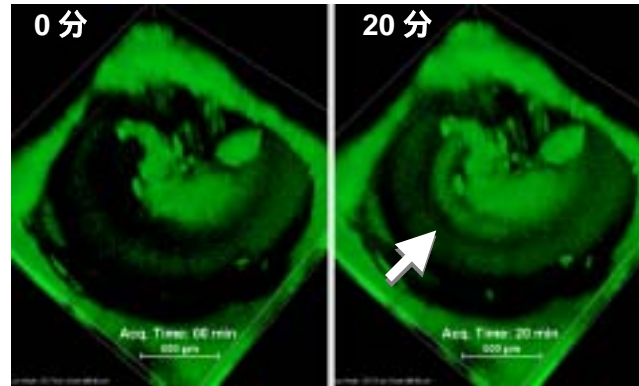


図2 活性酸素発生の実タイムイメージング。アンチマイシンA滴下後20分後に、蝸牛らせん神経節(矢印)にHPFの呈色を確認

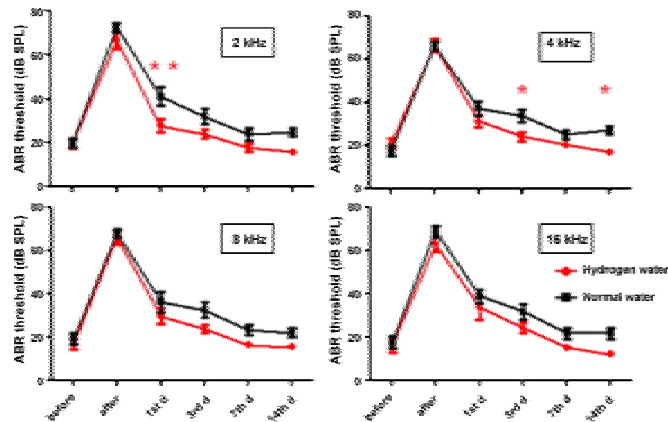


図3 モルモットの騒音曝露前～2週間後のABR(聴性脳幹反応)の測定値。水素飽和水投与群(赤)と純水投与群(黒)で統計学的有為差が認められた。