

### C. 研究結果

3-NP(500mM)をラット中耳正円窓窩に 2 $\mu$ l 投与し、80dB 程度の聴力閾値の上昇を認める永久的な難聴モデルを作成した。ATP 測定時期は投与 1 日後と 7 日後とした。生食(saline)を投与したコントロール群と比べて、3NP 投与群では 50%程度蝸牛内 ATP 濃度を 1 日(D1)、7 日(D7)後共に減少させる傾向を確認した(下図参照)。各グループの数は 8 である。

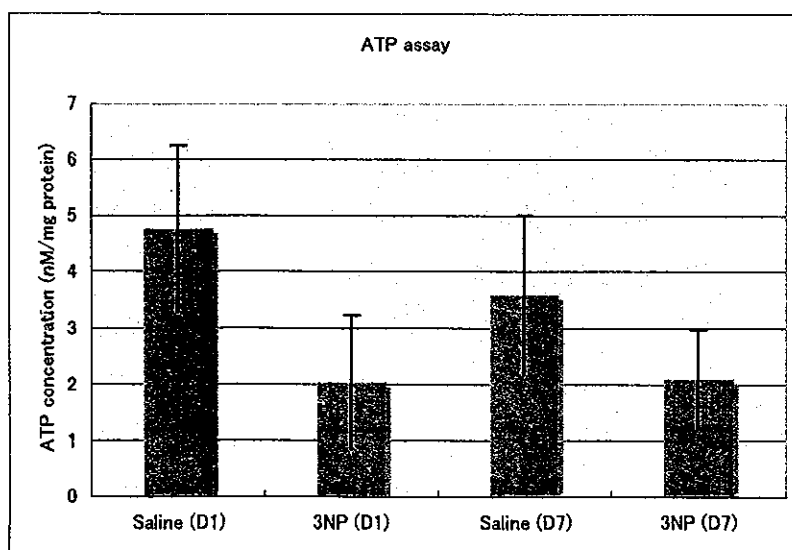
### D. 考察

我々は本研究において 3-NP 投与で蝸牛内の ATP 濃度が低下する傾向と 80dB 程度の難聴を認めたことより、蝸牛内エネルギー欠乏と難聴の関係が更に明らかになったと考えられる。今回残念ながら、有意な差に

達しなかったが、その原因としてルシフェリンを用いた ATP 測定方法の感度が十分ではなかった可能性と、3-NP によるミトコンドリア障害が蝸牛全体ではなく一部に限られている可能性が考えられる。ミトコンドリア遺伝性難聴だけでなく、高齢者の約 30%が苦しんでいる老人性難聴などにおいても、蝸牛内のミトコンドリア障害が難聴の発生において重要であると報告されている。ミトコンドリアの障害と難聴の関係を明らかにする事は新しい難聴の治療、予防を発見するにあたり大変意義があると思われる。

### E. 結論

ミトコンドリアを障害する 3NP を局所的に投与し、蝸牛内の ATP 濃度



が7日後まで50%程度に減少させる傾向を確認した。この結果よりミトコンドリア障害性難聴において蝸牛内エネルギー欠乏が重要な役割を示しているのではないかと考えられた

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Minami SB, Sha SH, Schacht J. Antioxidant protection in a new animal model of cisplatin-induced ototoxicity. *Hear Res.* 2004 Dec;198(1-2):137-43.

Yamashita D, Miller JM, Jiang HY, Minami SB, Schacht J. AIF and EndoG in noise-induced hearing loss. *Neuroreport.* 2004 Dec 22;15(18):2719-22.

Minami SB, Yamashita D, Schacht J, Miller JM. Calcineurin activation contributes to noise-induced hearing loss. *J Neurosci Res.* 2004 Nov 1;78(3):383-92.

##### 2. 学会発表

Minami SB, Yamashita D, Ogawa K, Schacht J, Miller JM. 2005 Creatine Attenuates Noise-Induced Hearing

Loss. *Abstr Midwinter Meeting Assoc for Res Otolaryngol.* New Orleans, LA.

南 修司郎、山下 大介、小川 郁  
2005 音響外傷難聴における calcineurin の役割 第14回日本耳科学会総会学術講演会 京都

Minami SB, Yamashita D, Schacht J, Miller JM. 2004 FK506 Reduces Noise-Induced Hearing Loss. *Abstr Midwinter Meeting Assoc for Res Otolaryngol.* Daytona Beach, FL.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

急性ミトコンドリア障害による突発性難聴モデルの急性期・慢性期の聴覚と  
組織像の解析による病態解明

研究協力者	岡本康秀	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長
研究協力者	水足邦雄	国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科
分担研究者	藤井正人	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚・平衡覚研究部長
分担研究者	小川 郁	慶應義塾大学医学部耳鼻咽喉科教授

研究要旨

ミトコンドリアは、細胞内エネルギーを作り出す重要な器官であり、生体におけるミトコンドリア障害は難聴を含めて様々な病態を呈する。内耳ミトコンドリア障害は、近年感音難聴の重要な原因の一つと考えられており、本研究では蝸牛における急性ミトコンドリア障害の病態を解明することを目的とした。我々はミトコンドリアトキシンである 3-nitropropionic acid (3-NP) をラット蝸牛へ局所投与を行い、急性の蝸牛ミトコンドリア障害の難聴モデルを作成した。作成したモデルラットは聴性脳幹反応 (ABR) 上、不可逆性域値上昇 (PTS) もしくは可逆性域値上昇 (TTS) の結果が得られた。さらにこのモデルにおいて蝸牛の障害部位や障害の進行過程を光学顕微鏡・透過型電子顕微鏡で組織学的に検討した。ABR の結果は、3NP 0.5mM で不可逆性域値上昇を、0.3mM で可逆性域値上昇を認め、濃度により難聴の程度に差が認められた。ミトコンドリア障害のみられる部分は、特に蝸牛外側壁に強く、次にラセン神経節にみられ、外有毛細胞、内有毛細胞には変化が乏しかった。この結果は蝸牛外側壁が蝸牛ミトコンドリア障害に対して脆弱であり、その障害が急性の蝸牛ミトコンドリア障害による難聴の主たる病態であることを示している。さらに外側壁の障害は経過により改善する事も分かった。今後このモデルラットを用いること

で、内耳におけるミトコンドリア障害の分子レベルでの病態解明と、実験的治療の検討が可能となった。

#### A. 研究目的

MELAS、MERRF、Kearns-Sayre Syndromeのいわゆる3大ミトコンドリア病では高率に難聴を合併することが知られている。またMELASと同じミトコンドリアDNA3243点変異で糖尿病と感音難聴を来す疾患概念(MIDD)も提唱されている。それ以外にも難聴を伴うミトコンドリア病は多い。これらの感音難聴は内耳性であり、ミトコンドリアが内耳では非常に重要な働きをもっていることを意味している。一方実験的には、虚血や強大音などによる障害でアポトーシスが観察され、また内耳障害の病態に酸化ストレスが関与していることが示されている。このことからミトコンドリア病以外の内耳性難聴の発症メカニズムにおいてもミトコンドリアが寄与している可能性がある。

我々は今回ミトコンドリアトキシンとしてミトコンドリア呼吸鎖の複合体II、コハク酸デヒドロゲナーゼ(SDH)を非可逆的に阻害し、神経細胞内のATP産生を抑制し細胞障害を引き起こすとされる、3-ニトロプロピオン酸(3-NP)を正円窓膜経由で外リンパ液に浸透させることにより、急

性内耳ミトコンドリア障害によるPTSおよびTTSの難聴モデルを作成することに成功した。

そこで急性ミトコンドリア障害による蝸牛障害の病態を解明するために、PTSモデルを用いて超微形態を中心に経時的に形態学的観察を行った。

これらの結果より急性内耳ミトコンドリア障害による難聴、つまり急性内耳エネルギー不全(突発性難聴)による難聴の病態解明と、さらには急性エネルギー不全に対する治療戦略を検討していくことを目標とした。

#### B. 研究方法

ミトコンドリアを障害するミトコンドリアトキシンには3-nitropropionic acid(3-NPA)を用いた。3-NPAは分子量119 M.W, サトウキビやピーナッツに繁殖するカビによって作られるnatural toxinで、作用機序はミトコンドリア電子伝達系の複合体IIの酵素であるコハク酸脱水素酵素を不可逆的に阻害することにより酸化的リン酸化を障害する。

対象には体重180~210gのSprague-Dawley Ratを用いた。

3-NPAは正円窓を經由して投与を

行った。3-NPAの濃度別に500mM群、300mM群、50mM群の3群に分け、生理食塩水を投与したものをコントロールとした。

ネンブタール40mg/kg腹腔内注射による麻酔下に、まずABR測定において対側耳からの反応を除外するため、右蝸牛を機械的に破壊し、さらに左中耳骨胞を開放し、Becton-Dickinson社製ポリエチレンチューブPE10を直径150 $\mu$ mまで細く加工したものをmicromanipulatorを用いて正円窓窩に留置し、シリンジポンプで1.5 $\mu$ l/minの速さで2分間薬剤の滴下を行い、ゼラチン小片で正円窓窩をパッキングした後、閉創した。ABR測定は投与前、1時間、3時間、1日、3日、7日後、14日後、21日後、90日後に行った。

500mM群のABR域値上、スケールアウトとなったモデルを検体とした。生食投与後3時間・1日・14日・90日のコントロール群と3-NP局所投与後3時間・14日・90日の群それぞれ2耳で検討した。

内耳は、駆血液(Sucrose加0.01MP.B.)さらに、固定液(Sucrose加0.1MP.B.、2.5%グルタルアルデヒド、2%パラフォルム)にて十分に灌流固定を行なった後、断頭し摘出した。摘出した内耳に蝸牛頂と卵円窓、正円

窓にマイクロ針でピンホールをあけ、更に一昼夜4 $^{\circ}$ Cの同一固定液にて再固定した。翌日より脱灰液(EDTA $\cdot$ 2Na、5%Sucrose)に浸し6日間脱灰を行った。その後、Sucrose加0.1MP.B.にて1日洗浄し、後固定(1%オスミウム)を2時間30分行った。脱水は50%から100%エタノール系列を用い、エポキシ樹脂(EPON812)による包埋をおこなった。

試料は、蝸牛軸に平行に、ガラスナイフで厚切り切片を作り、トロイジンブルーで染色して光学顕微鏡用とした。更に蝸牛の第二回転部位を観察対象として、ダイヤモンドナイフにて超薄切片を作り、ウラン・鉛による二重染色を行った。電子顕微鏡はHITACHI H600型を用いた。

観察部位は、蝸牛外側壁、コルチ器、ラセン神経節を中心に、コントロール群とミトコンドリアトキシシン投与群とを比較検討を行なった。

### C. 研究結果

ABR変化：500mM群は20kHz、16kHz、12kHz、8kHzで投与後3時間でスケールアウトととなり、それより28日までスケールアウトのままであった。しかし、90日の長期では閾値は20kHzで55dB、8kHzで30dBと不完全な閾値の改善が認められPTS

となった。

一方 300mM 群では、上記 4 周波数において、投与後 3 時間で 60dB から 70dB の域値上昇を認めた後、投与後 1 日でスケールアウトとなった。しかし、3 日以降難聴は改善し約 14 日目においてほぼ正常に改善し TTS となった。(表 1)

50mM 群・生食投与群においては、投与後 90 日までの経過中域値上昇を認めなかった。

形態学的変化：観察部位それぞれの経時的変化（コントロール 3 時間、3 時間後、14 日後、90 日後）を提示する。

#### 1. 外側壁

a. 血管条：投与 3 時間後には辺縁細胞、中間細胞の細胞間隙が広がり、細胞の萎縮像を認めた。1 日後、14 日後でも改善は認められず、細胞の萎縮像のままであった。また、3 時間後の辺縁細胞の核は正常所見に近いが、1 日後、2 週間後では核の変性が進行する経過が見られた。90 日後の長期モデルでは、細胞の萎縮像は改善し細胞間隙の拡大はあるものの、ミトコンドリアの増加が認められた。(図 1-a：コントロール 3 時間、図 1-b：3 時間後、図 1-c：14 日後、図 1-d：90 日後)

b. ラセン靭帯：3 時間後で I・III 型線維細胞の萎縮像を認め、細胞間隙

の拡大所見・ミトコンドリアの空胞化を認めた。更に 1 日後、2 週間後には細胞破壊が進むが、90 日経過すると細胞間隙の改善を認めるようになった。(図 2-a：コントロール 3 時間、図 2-b：3 時間後、図 2-c：14 日後、図 2-d：90 日後)

c. ラセン隆起：3 時間後には II 型線維細胞の萎縮所見と細胞間隙の拡大が認められ、14 日後には著明になった。しかし 90 日後には II 型細胞の細胞間隙はあるものの、核を認めるようになった。(図 3-a：コントロール 3 時間、図 3-b：3 時間後、図 3-c：14 日後、図 3-d：90 日後)

#### 2. コルチ器

a. 内有毛細胞：経時的に内有毛細胞の変性、ミトコンドリアの形態的变化を認めなかった。内有毛細胞神経終末も変化に乏しかった。(図 4-a：コントロール 3 時間、図 4-b：3 時間後、図 4-c：14 日後、図 4-d：90 日後)

b. 外有毛細胞：投与 1 日後まではミトコンドリアは細胞周囲に存在する正常所見であった。しかし 2 週間後にはミトコンドリアの増殖と不正配列（細胞周囲に配置されるミトコンドリアが、細胞の中心に集族される所見）を認めた。一方 90 日後にはミトコンドリアの不整配列は改善し正常所見を認めた。(図 5-a：コントロール

3 時間、図 5-b : 3 時間後、図 5-c : 14 日後、図 5-d : 90 日後)

### 3. ラセン神経節

3 時間後には神経節内のミトコンドリアの著明な膨化像を呈した。1 日後では神経節細胞の細胞変性と、ミトコンドリアの膨化所見が改善している細胞が混在する。2 週間以降では残存神経節細胞はほぼ正常に改善していた。(図 6-a : コントロール 3 時間、図 6-b : 3 時間後、図 6-c : 14 日後、図 6-d : 90 日後)

### D. 考察

難聴実験動物において急性感音難聴のメカニズムを検討するために用いられているモデルとして、内耳ウイルスモデル・音響障害モデル・内耳虚血モデル等があり、これらを用いて難聴の検討がなされているが、直接ミトコンドリアを障害し細胞内エネルギー不全を起こし急性感音難聴を引き起こすモデルでの検討は十分にはされていない。本研究ではミトコンドリアトキシンを内耳に直接投与することにより内耳エネルギー障害を与え、500mM では PTS、300mM では TTS の二つのモデルを作ることに成功した。PTS モデルは 3 時間で聾となり以後 21 日経っても難聴は回復しないが、90 日の長期には難聴の程度が軽減す

る。これはヒトで見られる突発性難聴の回復不良例の聴力変化に非常に似ている。一方 300mM 投与の TTS モデルは投与 1 日をピークに聴力は改善し 14 日後にはほぼ正常に回復した。これは突発性難聴の回復良好例の聴力変化に似ている。このことから今回作成が成功した PTS・TTS モデルはヒトの突発性難聴の臨床経過に類似点があり、このモデルの病態究明することによってヒト難聴の病態解明、治療戦略にむすびつく可能性がある。

そこで本研究では、500mM 投与の PTS モデルについて形態学的に検討を行なった。

蝸牛各部位のうち、ミトコンドリア障害の程度は、蝸牛外側壁に最も強く、次にラセン神経節にみられ、外有毛細胞、内有毛細胞には変化が乏しかった。このことから聴覚閾値上昇をもたらしたメカニズムにつき考察する。

蝸牛外側壁は、血管条とラセン靭帯からなり、蝸牛のリンパ液恒常性維持に重要な役割を果たしているといわれている。つまり、ラセン靭帯線維細胞と血管条の各細胞は Na-K ATPase やイオンチャンネル、イオンポンプにより内外リンパ液の電解質濃度勾配を作り出し、蝸牛内電位 (EP) を保っている。蝸牛内電位は、有毛細胞の興奮のための起電力となっており、蝸

牛内電位の低下は直ちに聴覚閾値上昇をもたらす。故に本結果に見られる外側壁の著明な障害は単独でも聴覚閾値上昇の原因となりうると考えられ、観察されたラセン靭帯線維細胞と血管条の著明な萎縮像は外側壁での機能障害を現し、蝸牛内電位の低下が聴覚閾値上昇をもたらす病態である可能性が考えられた。一方長期経過をみると、外側壁中の血管条でミトコンドリアの改善を、ラセン靭帯では I、II 型線維細胞の改善を認め、外側壁の形態的改善が内外リンパ液の電解質濃度勾配・EP 等の機能的改善をもたらしたために聴覚閾値の低下を認めたと考えられる。

ラセン神経節は、有毛細胞と脳幹の蝸牛神経核とを結ぶ神経細胞の集まりである。このため、ラセン神経節の高度な障害は神経伝達障害となって聴覚閾値の著明な上昇の原因となりうる。本結果では、3 時間後の電顕像ではほぼ全細胞にミトコンドリアの膨化像を認め、聴覚閾値上昇の原因となりうると考えられる。しかし 1 日後ではミトコンドリアの膨化所見が改善している細胞が散見され、2 週間では残存神経節細胞はほぼ正常に回復していた。このことから本モデルにおけるラセン神経節の変化、急性期での難聴の原因とはなっても不可逆性閾

値上昇の単独の原因とは考えにくいと考察された。ラセン神経節細胞は、外側壁と同様に急性の障害を呈しやす部位だといえるが、障害後速やかにその機能を回復出来る特性を持っている細胞であると考えられた。

内有毛細胞は、音響刺激を電氣的信号に変換し中枢へ伝達する機能を有していると考えられている。このため、不可逆性閾値上昇を単独でも起こしうる。しかし本結果では電顕で内有毛細胞の障害の所見は乏しく、本モデルの内有毛細胞は聴覚閾値上昇の原因となっている可能性は低いと考えられた。

外有毛細胞は、能動的運動能を有し内有毛細胞の感度を調節していると考えられている。そのためミトコンドリアは、外有毛細胞の細胞膜下周囲に配列し能動的運動にエネルギーを供給する重要な役割を果たしている。外有毛細胞が傷害されると運動障害から内有毛細胞の感度が低下し、聴覚閾値上昇をおこす可能性があると考えられる。本結果では 3 時間後にはミトコンドリアとその配列には変化がなく、1 日後にはミトコンドリアの増加、2 週間後には細胞中心へのミトコンドリア集族像を認め、この経過は外有毛細胞障害の進行過程と考えられた。すなわち、1 日後にはミトコンドリア機



能低下に対する反応性のミトコンドリア増加を来したが、14 日後には外側壁障害による蝸牛内電位の低下・消失からくる細胞環境の悪化によって細胞機能が低下しミトコンドリアが細胞中心に集まった状態を呈したと推察された。しかし 90 日経過では外有毛細胞の変化は認められず、長期の経過でミトコンドリアや細胞環境の改善によって細胞死を免れた可能性が考えられる。

以上のことから、聴覚閾値上昇をもたらした主たる原因は蝸牛外側壁の障害である可能性が示唆され、また外側壁は障害に対して稀弱であり感音難聴を引き起こすが、一方障害された外側壁は細胞再生が行われ、特に線維細胞、血管条の辺縁細胞・中間細胞のミトコンドリアの再生により機能回復がされる可能性が示唆された。

今後はこのモデルラットを用いることによって、内耳ミトコンドリア障害の酵素組織化学的、免疫組織学的手法を用いて、聴力障害の分子レベルの病態メカニズム解明と実験的治療法の検討を行なう予定である。

## E. 結論

ラット内耳にミトコンドリアトキシンを局所投与し、可逆性閾値上昇 (TTS)・不可逆性閾値上昇 (PTS)

を伴ったモデルを投与濃度により作り分けることが可能となった。

これらのうち PTS モデルに対して急性期・長期の経過を、透過型電子顕微鏡を用いて形態学的に検討を行なった。

蝸牛各部位のうち、ミトコンドリア障害の程度は、蝸牛外側壁に最も強く、次にラセン神経節にみられ、外有毛細胞、内有毛細胞には変化が乏しかった。長期経過ではラセン靭帯における線維細胞と血管条の改善所見を認めた。

このことから本モデルにおける不可逆性閾値上昇は蝸牛外側壁の機能障害が主たる原因で、長期に外側壁の形態学的改善を伴う聴力改善も認めたことより、外側壁の障害が一つの急性感音難聴の病態として非常に重要であると考察された。

本モデルラットは、今後分子レベルでの難聴の病態解明や実験的治療法の開発に有効であると考えられた。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Hoya N, Okamoto Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T: A novel animal model of acute cochlear

mitochondrial dysfunction.  
Neuroreport 2004;15:1597-1600.

Okamoto Y, Hoya N, Kamiya K, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T: Permanent Threshold Shift Caused by Acute Cochlear Mitochondrial Dysfunction Is Primarily Mediated by Degeneration of the Lateral Wall of the Cochlea. 2004

## 2. 学会発表

Hoya N, Okamoto Y, Kamiya K, Fujii M, Matsunaga T: Local application of a mitochondrial toxin, 3-Nitropropionic Acid causes dose-dependent ABR threshold shift on rat cochlea: a model for sudden deafness. 2003. Spain.

Okamoto Y, Hoya N, Kamiya K, Fujii M, Ogawa K, Matsunaga T: Degeneration of the fibrocytes in the spiral ligament primarily mediates hearing loss caused by acute cochlear mitochondrial dysfunction. ARO. Feb 21, 2004. Florida.

保谷則之、岡本康秀、神谷一作、藤井正人、松永達雄：ミトコンドリアトキシン投与によるラット内耳障害：突発

性難聴モデルの作成、第13回日本耳科学会、2003.10.16、幕張

岡本康秀、保谷則之、神谷一作、藤井正人、小川郁、松永達雄：ミトコンドリアトキシン投与による内耳障害：突発性難聴モデルの組織学的検討、第13回日本耳科学会、2003.10.16、幕張

岡本康秀、小川郁、松永達雄：内耳急性エネルギー不全による不可逆性域値上昇(PTS)モデルの長期経過（組織学的変化を中心に）、第14回日本耳科学会、2004.10.21、大坂

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし



图1-a control

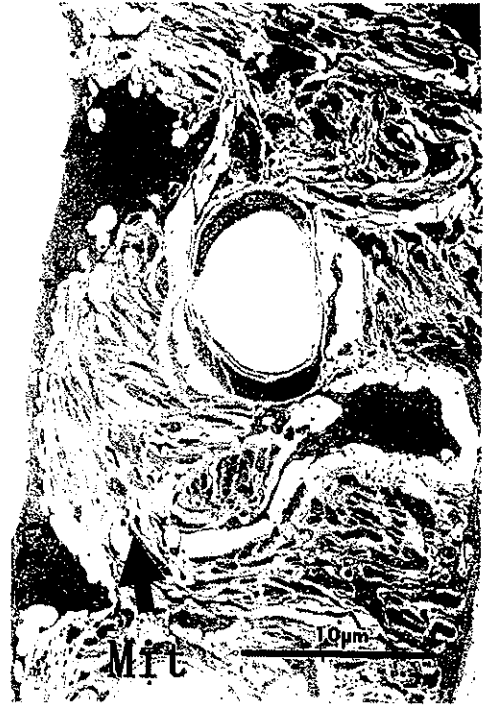


图1-b 3h



图1-c 14d

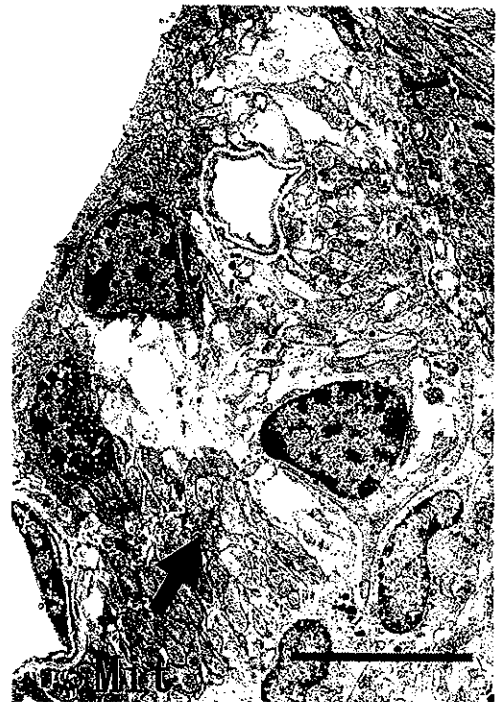


图1-d 90d

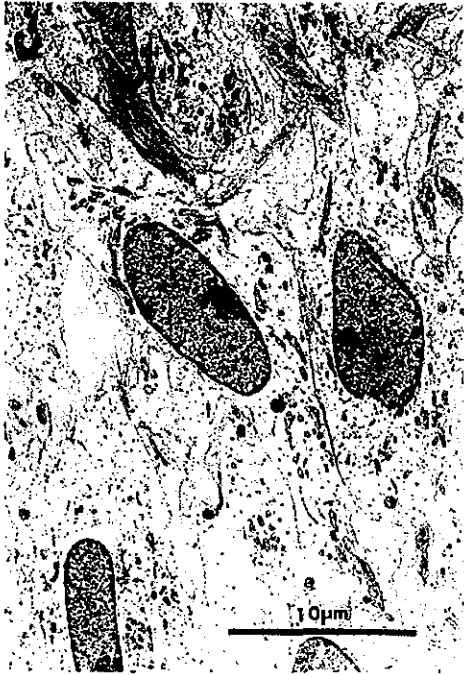


图2-a control

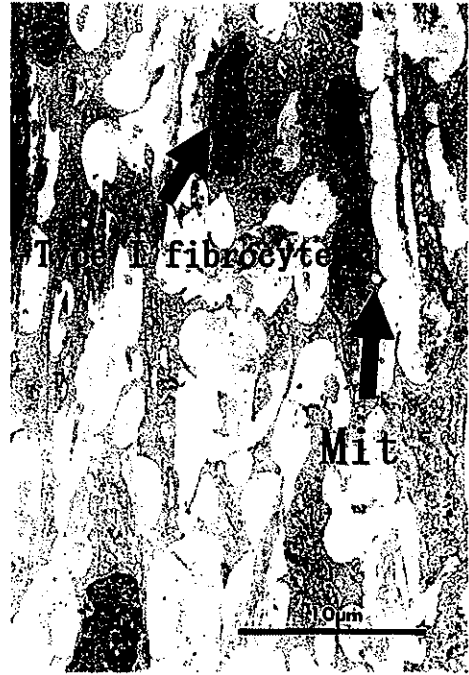


图2-b 3h

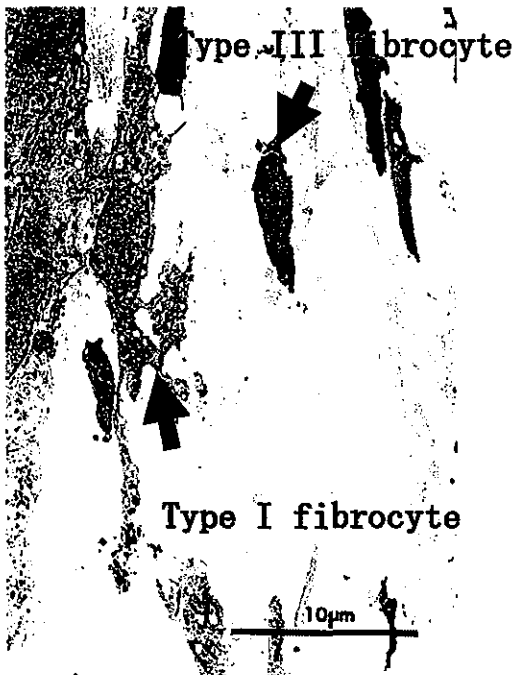


图2-c 14d

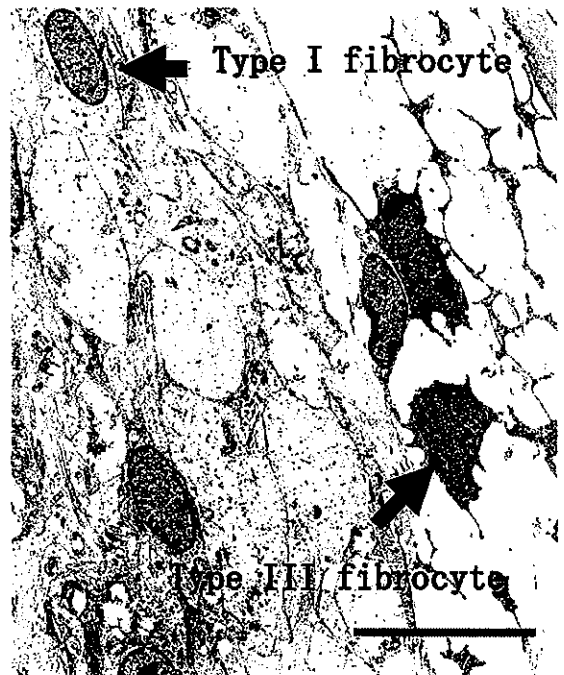


图2-d 90d



图3-a control



图3-b 3h



图3-c 14d



图3-d 90d

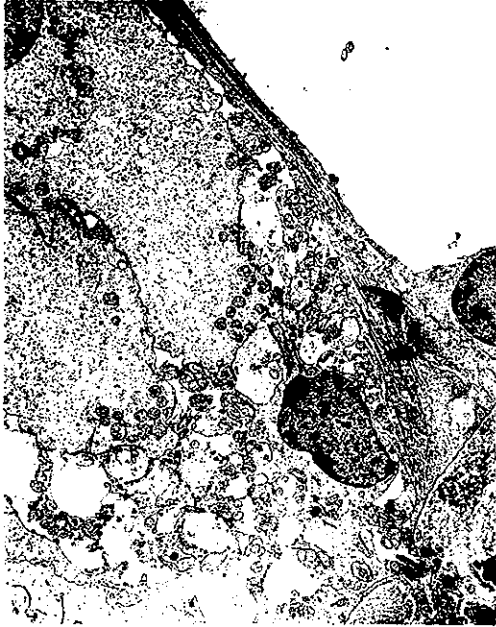


图4-a control

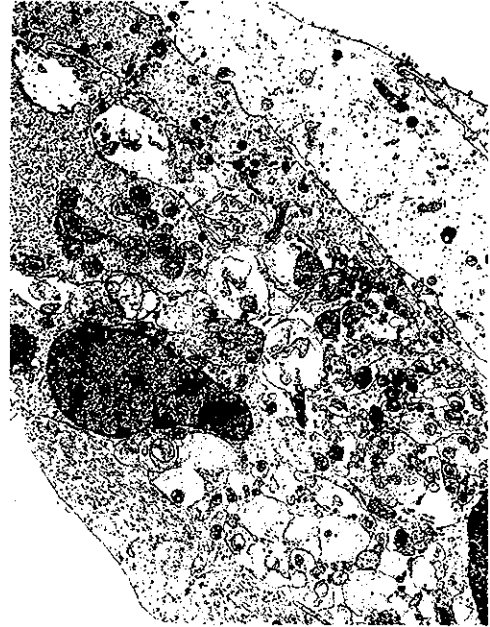


图4-b 3h



图4-c 14d

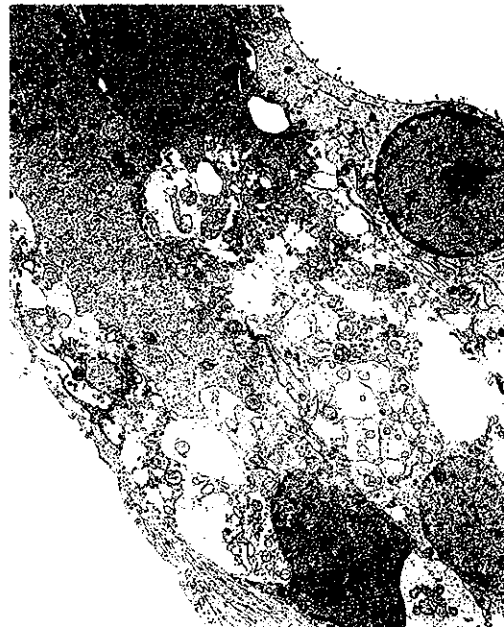


图4-d 90d



图5-a control



图5-b 3h

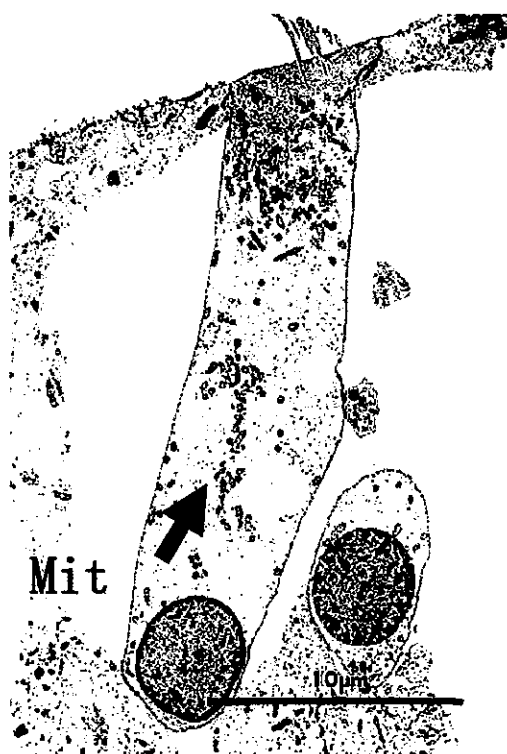


图5-c 14d



图5-d 90d

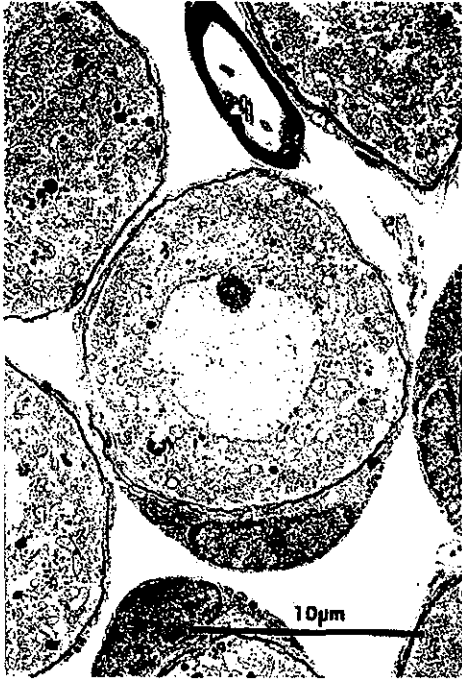


图6-a control



图6-b 3h



图6-c 14d

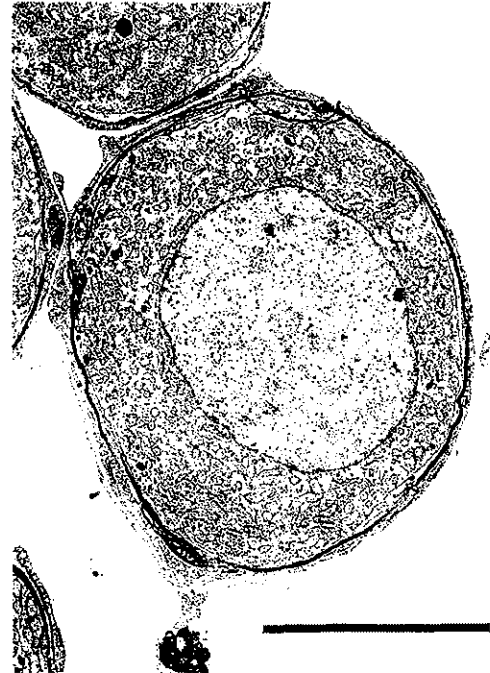
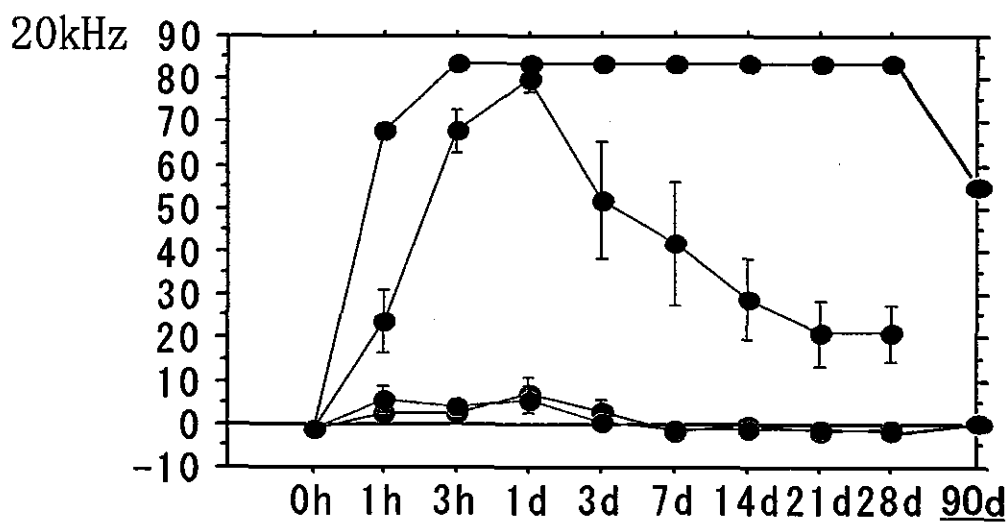
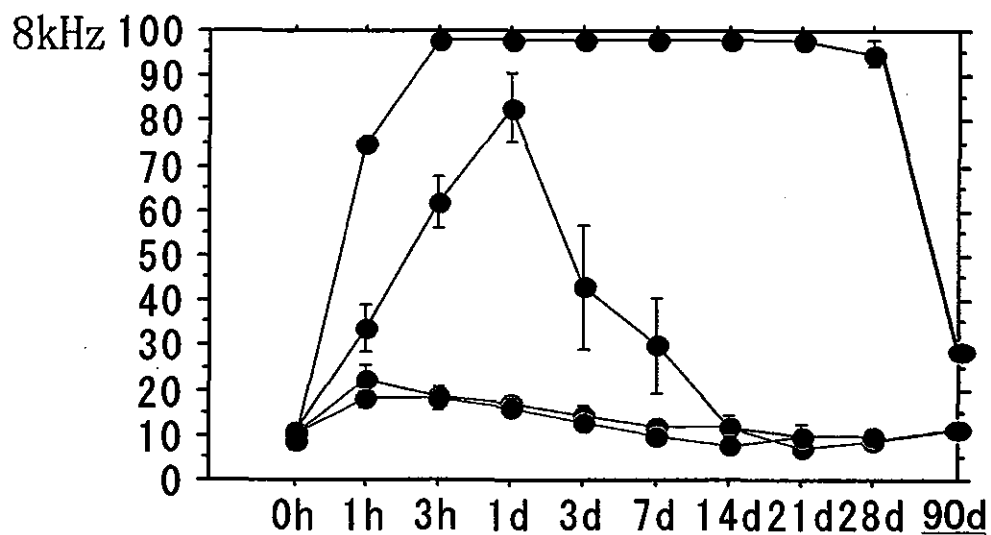


图6-d 90d





● 3NPA 500 ● 3NPA 300 ● 3NPA 50 ● NaCl

表1

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）

分担研究報告書

内耳エネルギー不全による難聴発症 1 日後の蝸牛外側壁における網羅的遺伝子  
発現解析

研究協力者	藤波義明	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	濱崎裕子	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	神谷和作	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター研究員
研究協力者	水足邦雄	国立病院機構東京医療センター耳鼻咽喉科
主任研究者	松永達雄	国立病院機構東京医療センター 臨床研究センター聴覚障害研究室長

研究要旨

当研究室で作成した内耳エネルギー不全モデル動物を用いた結果より、急性内耳エネルギー不全により起こる高度難聴での主な傷害部位は蝸牛外側壁線維細胞であることが判明している。これまでの当研究室の研究結果から蝸牛外側壁線維細胞の細胞死はアポトーシスであることが明らかとなっている。にもかかわらず、一過性難聴モデルでは聴力の回復が起きている。このモデルでは細胞傷害因子および保護・再生因子が関与していると考えられる。そこで、蝸牛外側壁における遺伝子発現動態をマイクロアレイにより解析した。難聴発症 24 時間後の一過性難聴モデルラットより蝸牛外側壁を採取し、total RNA を抽出した。その後、逆転写反応により cDNA にし、これを鋳型として in vitro transcription によってビオチン標識 cRNA を合成した。ビオチン標識 cRNA を GeneChip® Rat Expression Array にハイブリダイズし、蛍光イメージの測定を行った。その結果、複数のアポトーシス関連因子およびトランスポーター、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素系等の遺伝子発現に動きが見られた。

## A. 研究目的

当研究室で作成した内耳エネルギー不全モデルによるこれまでの結果より、急性内耳エネルギー不全により起こる高度難聴では大部分の有毛細胞や神経細胞は生存しているにもかかわらず、蝸牛外側壁線維細胞が重度に傷害されていることが判明した。この蝸牛外側壁線維細胞傷害は劇的なアポトーシスにより引き起こされているものであることが明らかにされている。しかしながら、一過性難聴モデルでは聴力の回復が起きている。聴力低下時には細胞傷害因子および保護因子が、聴力の回復期には再生因子が発現・活性化されていると考えられる。本研究では、一過性難聴モデルの傷害発症後早期（24 時間後）において蝸牛外側壁に発現している遺伝子のスクリーニングをマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析にて行い、主としてアポトーシスに関与していると考えられる候補分子を選択的に阻害することによる治療法の開発に貢献することを目的とした。

## B. 研究方法

6 - 7 週齢雄性 SD ラットの左側内耳蝸牛正円窓窩にミトコンドリア電子伝達系サブユニット II 阻害剤である 3-nitropropionic acid (3-NP) を 0.9  $\mu$ moles 投与し、一過性難聴モデル

を作成した。また、同一個体の右側正円窓窩に生理食塩水を同容量投与し Control とした。作成したモデルラットについて経時的な聴力閾値の推移を ABR（聴性脳幹反応）により測定した。24 時間経過後に左右内耳よりそれぞれ蝸牛外側壁を採取し、Trizol を用いた方法により total RNA を抽出した。得られた RNA について精製度および収量を測定し、逆転写反応により cDNA を作成した。これらの cDNA を鋳型とし、in vitro transcription によってビオチン標識 cRNA を合成した。ビオチン標識 cRNA を GeneChip® Rat Expression Array 230A および同 230B (Affymetrix, Inc.) にハイブリダイゼーションし、専用スキャナーにより蛍光イメージの測定を行った。得られたデータについて画像処理ソフトウェアおよび解析用ソフトウェアを用いて蛍光強度を数値化し、解析を行った。

なお、本研究では動物実験を行うにあたり、倫理面に配慮し「大学等における動物実験について（昭和 62 年 5 月 25 日 文部省国際学術局長通知 文学情第 141 号）」および「国立病院機構東京医療センター動物実験指針」を遵守して進めた。

## C. 研究結果

現在、本結果は未発表データである

ため詳細を記すことはできないが、内耳エネルギー不全一過性難聴モデルの蝸牛外側壁において、複数のアポトーシス関連因子およびトランスポーター、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素系等の遺伝子発現に動きが見られた。

#### D. 考察

内耳エネルギー不全一過性難聴モデルの蝸牛外側壁におけるアポトーシスには、本結果より得られたアポトーシス関連因子の増減が少なくとも一部関与していると考えられる。さらに、このアポトーシスに向かう経路にはトランスポーター、タンパク質分解酵素、酸化還元酵素系等の動態が影響している可能性がある。

#### E. 結論

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により、内耳エネルギー不全後極めて早期（24 時間後）の蝸牛外側壁において特徴ある発現動態をしている遺伝子を絞り込むことができた。この中には傷害に関与している可能性のある分子、あるいは保護に作用している可能性のある分子が含まれており、そのバランスが崩れることにより蝸牛外側壁線維細胞がアポトーシスに向かうと考えられる。今後、特定の分子を刺激あるいは阻害する

などして機能的意義を解析する必要がある。それにより得られる結果から内耳エネルギー不全を起因とする突発性難聴の新規治療薬につながる候補分子を絞り込んでいく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし