

題 目

音響外傷に対する低出力レーザー照射による  
内耳保護効果の検討

田村 敦

(耳鼻いんこう科学専攻)

防衛医科大学校

平成 27 年度

## 目 次

1 緒言	3-7 頁
1.1 生体における音の伝達機構について	
1.2 研究の背景と目的	
2 実験方法	8-15頁
2.1 動物	
2.2 強大音負荷	
2.3 低出力レーザー照射	
2.4 聴性脳幹反応による聴力閾値測定	
2.5 外有毛細胞消失率の評価	
2.6 Surface preparationにおけるiNOSおよびcleaved caspase-3の免疫組織化学的検討	
2.7 薄切切片におけるiNOSおよびcleaved caspase-3の免疫組織化学的検討	
2.8 統計学的検討	

3	結果	16-19頁
	3.1 聴力閾値変化	
	3.2 外有毛細胞消失率	
	3.3 抗iNOS抗体を用いた免疫組織化学的検討	
	3.4 cleaved caspase-3抗体を用いた免疫組織化学的検討	
4	考察	20-24頁
5	結語	25頁
6	謝辞	27頁
	付記	28頁
	引用文献	29-34頁
	図表	35-53頁

# 1 緒言

## 1.1 生体における音の伝達機構について

音は音源となる物体の振動によって、空気等の周囲の物質中に発生し伝播する疎密波である。この振動が鼓膜を振動させ、耳小骨に伝わり、さらに卵円窓膜を経て蝸牛のリンパ液に伝わる。ヒトの蝸牛は2回転半で、基底回転、中回転、頂回転から成り、それぞれ外リンパ液を満たしている前庭階、鼓室階、および内リンパ液を満たしている蝸牛管（中央階）から成る（図1）。中央階は基板とライスネル膜に囲まれた、断面が三角形の空間で、基板上に感覚細胞である有毛細胞と支持細胞から構成されるコルチ器が配置されている。リンパ液に伝わった振動が基板を振動させると、基板の機械的振動により有毛細胞が振動を感知し、機械的な振動を電気的な振動に変換させて、蝸牛軸に存在するラセン神経節細胞からの神経線維を経て、脳幹の橋に存在する蝸牛神経核に入力する。さらには中脳の下丘へ上行し、最終的には側頭葉の一次聴覚野と聴覚連合野、感覚性言語野を中心とした大脳皮質で音として認知、理解される（図2）。

コルチ器には1列の内毛細胞と3列の外毛細胞が存在する（図1）。

有毛細胞は特殊かつ高度に発達した細胞ではあるが、非常に脆弱でわずかな負荷にても障害を受けやすい。

蝸牛を含む内耳は、椎骨動脈から分かれた前下小脳動脈の分枝である迷路動脈の血管支配を受けていて（図3）、迷路動脈は、総蝸牛動脈、固有蝸牛動脈を経てラセン蝸牛軸動脈となり、コルチ器、ラセン神経節細胞、血管条に枝を出してこれらを栄養している。

## 1.2 研究の背景と目的

音響外傷は、大きく慢性と急性のものに分けられる。騒音性難聴と呼ばれる慢性の音響外傷は、騒音に長年暴露されることにより生じる慢性の聴覚障害で、発症の原因としては、工場の機械音や航空機の騒音などが挙げられる。

一方で、急性の音響外傷は予期しない突発的な強大音によって起こる急性の聴覚障害で、銃火器の暴発、機械の爆発や破裂、タイヤの破裂、落雷によるものなどで発生する音が原因となり得る。一例を挙げると、耳元で銃器が暴発するような場合である。またその音の特徴は、いずれも瞬間的な音、または短時間内に大きな強さになる音である。音が強大であるとともに、発生が

急であることも特徴の一つである。防衛省・自衛隊においても、今後これらが原因による音響外傷の患者に遭遇する可能性は、決して低くはないものと思われる。

このような強大音暴露は内耳蝸牛の退行性変化をもたらすことが知られている<sup>1,2)</sup>。この中には、低灌流や虚血といった微小循環の変化が含まれている。またこのような微小循環変化が契機となる酸化ストレスにより様々な活性酸素種および活性窒素種が産生され、その結果として細胞内の恒常性を破壊させる<sup>3,4)</sup>。これにより組織の血流不全、そして最終的にcaspase-3の活性によるアポトーシスを生じ、蝸牛障害、つまり強大音暴露による急性音響外傷を来すことが報告されている<sup>5,6)</sup>。

急性音響外傷の治療は、突発性難聴に準じて発症早期に行う。すなわち、静かな環境で安静にさせ、副腎皮質ステロイドを始め、循環改善薬、ビタミン剤などの投与を行うことが多い。しかしながら、副腎皮質ステロイドの治療効果が不十分な症例も存在する<sup>7)</sup>。加えて副腎皮質ステロイドには血糖値や血圧の上昇、胃潰瘍、骨粗鬆症などの様々な副作用があるため、患者の年齢や病歴を踏まえた上で、投与に際して慎重な判断が必要となる場合もある。そのため、ステロイド剤以外の有効な治療の選択肢が望まれる。

近年、低出力レーザー治療（low-level laser therapy : LLLT）と呼ばれ

る、レーザーによる光治療が、細胞の再生および修復を促進させる非侵襲的治療として一部の領域で使用されてきている<sup>8,9)</sup>。この治療法は、米国においては米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration : FDA) により認可されており、創傷治癒や慢性疼痛、筋骨格系の損傷に対する治療等に用いられている<sup>10,11)</sup>。

「低出力」レーザーの具体的な出力 (出力密度) については、連続照射モードで10から1000 mW/cm<sup>2</sup> 程の範囲内とされ、レーザー光の波長については400 nmの可視光から1000 nm程の近赤外光が用いられる。特に近赤外光は深達性が高いことが特徴であり、脳虚血の動物モデルに対して経頭蓋的に低出力の近赤外光を照射した研究では、頭皮に照射したレーザー光は経頭蓋的に大脳皮質への到達し脳梗塞を制御した報告も出ている<sup>12)</sup>。

LLLTの作用機序については不明な点が多いが、近年、過剰な活性酸素種および活性窒素種の産生に深く関与する、誘導性一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase : iNOS) の誘導を、LLLTが脳虚血や末梢神経障害で抑制したとの報告が散見されている<sup>13,14)</sup>。

音響外傷の発症メカニズムの一端としては、iNOSの誘導および細胞内でのアポトーシスが生じ、最終的に蝸牛障害、つまり音響外傷を来すことが以前より知られている<sup>5,6)</sup> (図4)。

以上を踏まえて、本研究では、LLLTを音響外傷の治療に応用し、か

つiNOS発現およびcaspase-3活性を低下させることで音響外傷の抑制が可能かどうかを検討した。



## 2 実験方法

### 2.1 動物

実験動物として、正常な鼓膜を有し、プライエル反射正常な、全52匹のSprague-Dawley系ラット雄（体重150–200 g）を使用した。動物は強大音負荷後、（1）無治療群（n=5）、（2）低LLLT群（出力密度110 mW/cm<sup>2</sup>、n=6）、（3）高LLLT群（出力密度165 mW/cm<sup>2</sup>、n=5）と無作為に3つの群に分け、聴力閾値変化および蝸牛コルチ器の外有毛細胞の消失状況についての評価を行った。

また、iNOSに対する免疫組織化学的検討のため、（1）無処置群（n=6）、（2）強大音負荷+無治療群（n=6）、（3）強大音負荷+高LLLT群（出力密度165 mW/cm<sup>2</sup>、n=6）、およびcleaved caspase-3に対する免疫組織化学的検討のため、（1）無処置群（n=6）、（2）強大音負荷+無治療群（n=6）、（3）強大音負荷+高LLLT群（出力密度165 mW/cm<sup>2</sup>、n=6）とそれぞれ3つの群に分けた。

全ての実験は、防衛医科大学校実験動物倫理委員会の承認（承認番号:13088）を得て、防衛医科大学校動物実験規則に則り実施した。動物に対する各種処置および飼育は防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座第3研究室で行った。

またLLLTTは、防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門の生体信号計測実験室で実施した。

## 2.2 強大音負荷

動物は、過去の当科の報告<sup>15)</sup>に準じて、塩酸ケタミン (50 mg/kg) および塩酸メデトミジン (1.0 mg/kg) の混合麻酔を腹腔内投与した後に騒音暴露チャンバーに収容し、4 kHz を中心とした 121dB SPL の強大音負荷を 5 時間行い、音響外傷モデル動物を作成した。騒音暴露チャンバー内にはスピーカー (Model 2380A、JBL、Northridge、CA、USA) を設置し、ノイズジェネレーター (DANAC-31、Danajapan、東京) およびパワーアンプ (D-45、Crown International、Elkhart、IN、USA) を用いて強大音を発生させた。チャンバー内の音圧は音圧測定器 (Type 6224 Precision Sound Level Meter、Aco Instruments、東京) を用いて計測した。

## 2.3 低出力レーザー照射

LLLT は、強大音負荷終了 1 時間以内に、塩酸ケタミン (50 mg/kg) および塩酸メデトミジン (1.0 mg/kg) の混合麻酔を腹腔内投与した後に開始した。レーザーは波長 808 nm のダイオードレーザー (B&W Tek、Newark、DE、USA) を使用した。ラットを左側臥位に固定した後、レーザー照射用のファイバーを右外耳道へ挿入した (図 5)。レーザーの拡散光が内耳に到達可能となるよう、鼓膜から 6mm 離れた部位にファイバー先端が位置するよう設定し、1 日 30 分、5 日間連続でレーザー照射を実施した (図 6)。レーザー照射前は毎回、前述した混合麻酔を腹腔内投与した。尚、レーザー照射時および後述の聴力閾値測定時以外、ラットは動物用餌および水の自由摂取とした環境下で飼育した。レーザーの出力密度は、2.1 で述べたように、110 mW/cm<sup>2</sup> または 165 mW/cm<sup>2</sup> とした。レーザー光の出力は、レーザー照射開始前および終了後にパワーメーター (PD300; Ophir Optonics Ltd., Jerusalem, Israel) を使用して、設定した出力のレーザー光が照射されているかを確認した。

#### 2.4 聴性脳幹反応による聴力閾値測定

聴力閾値測定は、過去の当科の報告<sup>15)</sup> に準じて、聴性脳幹反応 (Auditory brainstem responses : ABR) (Synax 1200、NEC、東京) を用いて、

強大音負荷直前、負荷終了直後、負荷後 2 日目、4 日目、7 日目、14 日目、28 日目の閾値変化を計測した（図 6）。ABR の刺激音には、4、8、12、16 および 20kHz の周波数のトーンバースト音を用い、刺激音圧は 100dB SPL から 5dB ステップで変化させ、ABR 波形が観測されなくなるまで記録した。ABR 閾値は、III 波または IV 波を生じた最小刺激閾値と定義した。強大音負荷による聴力閾値変化を推定するための基準として、強大音負荷直前に得られた聴力閾値を用いた。尚、ABR 開始前に、塩酸ケタミン（50 mg/kg）および塩酸メドミジン（1.0 mg/kg）の混合麻酔を腹腔内投与して聴力閾値測定を実施した。

## 2.5 外有毛細胞消失率の評価

騒音負荷終了28日目に、ペントバルビタール(100 mg/kg)を用いた深麻酔後に断頭し、右側の蝸牛を摘出した。蝸牛頂回転付近の骨を除去し、4%パラホルムアルデヒドを用いて、1mlを2回、蝸牛の正円窓および卵円窓を開放した後、これらの部位から緩やかに局所灌流を行い、一晩蝸牛を4%パラホルムアルデヒドの中で固定した。翌日、蝸牛の外側壁の骨および蓋膜を除去し、蝸牛全体を抽出した。リン酸緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline : PBS）で数回洗浄した後、蝸牛を0.3 % Triton X-100に5分間浸漬した。さらにPBSで3回洗浄

した後、コルチ器の有毛細胞の定量的評価目的で、1% rhodamine-phalloidin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて60分間染色した。PBSで3回洗浄した後、surface preparation法を用いてコルチ器を慎重に摘出し、anti-fade medium (VECTASHIELD; Vector laboratories、Burlingame、CA、USA)を用いてマウントした。コルチ器は、LSM 510 Meta 共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH、Jena、Germany)を用いて観察した。コルチ器は、過去の報告<sup>16)</sup> に準じて、頂回転 (蝸牛頂上からの距離: 0.0%~33.3%)、中回転 (蝸牛頂上からの距離: 33.3%~66.6%)、基底回転 (蝸牛頂上からの距離: 66.6%~100.0%) と3つに分割した後に、各回転での外有毛細胞消失数を数え、各回転の全外有毛細胞数に対する消失率を算出した<sup>17)</sup>。

## 2.6 Surface preparationにおけるiNOSおよびcleaved caspase-3の免疫組織化学的検討

コルチ器内の外有毛細胞におけるiNOSおよびcleaved caspase-3の発現状況を確認し、LLLTの作用機序の一端を検証する目的で、surface preparationにおける免疫組織化学的染色を実施した。具体的には、強大音負荷終了1時間後にiNOSの評価を、強大音負荷終了8時間後にcleaved caspase-3の評価を実施した

(図7、8)。LLLТは、2.3と同様に、強大音負荷終了1時間以内に実施した。LLLТの作用機序検証目的であるため、出力密度は165 mW/cm<sup>2</sup>の高LLLТのみとし、照射回数は1回のみレーザー照射を実施した(図7、8)。iNOS発現の評価目的のラットは強大音負荷終了1時間後に、caspase-3発現の評価目的のラットは強大音負荷終了8時間後に、ペントバルビタール(100 mg/kg)を用いた深麻酔後に断頭し、レーザー照射を行った右側の蝸牛を摘出した。蝸牛頂回転付近の骨を除去し、4%パラホルムアルデヒドを用いて、1mlを2回、蝸牛の正円窓および卵円窓を開放した後にこれらの部位から緩やかに局所灌流を行い、一晩蝸牛を4%パラホルムアルデヒドの中で固定した。翌日、蝸牛の外側壁の骨および蓋膜を除去し、蝸牛全体を摘出した。PBSで数回洗浄した後、蝸牛を0.3 % Triton X-100に5分間浸漬した後に、非特異的反応をブロックするために、ブロッキング液(Dako、Glostrup、Denmark)に浸した。1次抗体として、rabbit polyclonal iNOS 抗体(1:1000; BML-SA200、Enzo Life Sciences、Farmingdale、NY、USA) または rabbit polyclonal cleaved caspase-3 抗体(1:100; #9661、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA)を用いて、4°Cで一晩静置した。PBSで洗浄した後に、2次抗体(1:200; Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit、Invitrogen、Eugene、OR、USA)での反応を1時間室温で実施した。さらにPBSで3回洗浄した後、1% rhodamine-phalloidin を用いて60分間、Fアクチンを染色した。PBSで3回洗浄し

た後、surface preparation法を用いてコルチ器を摘出し、anti-fade medium (VECTASHIELD with DAPI; Vector laboratories、Burlingame、CA、USA)を用いてマウントした。外有毛細胞におけるiNOSおよびcleaved caspase-3の発現は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

## 2.7 薄切切片における iNOS および cleaved caspase-3 の免疫組織化学的検討

2.6と同様の強大音負荷条件およびレーザー照射条件のもと、蝸牛内の iNOS および cleaved caspase-3 の発現状況を確認し、LLLT の作用機序の一端を検証する目的で、薄切切片における免疫組織化学的染色を実施した。iNOS 発現の評価目的のラットは強大音負荷終了 1 時間後に、caspase-3 発現の評価目的のラットは強大音負荷終了 8 時間後に、ペントバルビタール(100 mg/kg)で深麻酔後に断頭した後に、レーザー照射を行った右側の蝸牛を迅速に摘出した(図 7、8)。蝸牛頂回転付近の骨を除去し、4%パラホルムアルデヒドを用いて、1ml を 2 回、蝸牛の正円窓および卵円窓を開放した後にこれらの部位から緩やかに局所灌流を行い、一晚蝸牛を 4%パラホルムアルデヒドの中で固定した。続いて、蝸牛を 4°Cに保った 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA、pH 7.2)を用いて 14 日間脱灰処理し、15%ショ糖液に 36 時間浸した後、厚さ 8  $\mu\text{m}$  の凍結切片を

作成した。切片は、PBS で3回洗浄し 0.3% Triton X-100 に15分浸した後に、非特異的反応をブロックするために、ブロッキング液に浸した。1次抗体として、rabbit polyclonal iNOS 抗体 (1:1000) または rabbit polyclonal cleaved caspase-3 抗体 (1:100) を用いて、4°Cで一晩静置した。PBS で洗浄した後に、2次抗体 (1:200) での反応を1時間室温で実施した。さらに PBS で3回洗浄した後、1% rhodamine-phalloidin を用いて60分間、Fアクチンを染色した。3回洗浄後、anti-fade medium (VECTASHIELD with DAPI) を用いてマウントした。標本は共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

## 2.8 統計学的検討

聴力閾値変化と外有毛細胞の消失率の割合は、one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey–Kramer multiple comparison tests を用いて比較検討した。全てのデータは平均値±標準偏差で示した。P値が0.05以下を統計学的有意差ありとした。



### 3 結果

#### 3.1 聴力閾値変化

強大音負荷終了直後 (day0)、聴力の閾値変化が 3 群共に観察された (図 9)。強大音負荷後 2 日目 (day2) では、低 LLLT 群は、8、12、16、20kHz において無治療群に比べて聴力閾値変化が有意に低下した。強大音負荷後 4 日目 (day4) および 7 日目 (day7) では、両 LLLT 群は、12、16、20kHz において無治療群に比べて聴力閾値変化が有意に低下した。強大音負荷後 14 日目 (day14) では、高 LLLT 群は、8、16、20kHz において無治療群に比べて聴力閾値変化が有意に低下した。強大音負荷後 28 日目 (day28) では、無治療群との間に統計学的な有意差は認められなかったものの ( $p < 0.10$ )、高 LLLT 群では 12、16、20kHz においてやや聴力閾値変化が低下する傾向を認めた。以上の結果から、LLLT は聴力機能回復を促進させたことが示唆された。

#### 3.2 外有毛細胞消失率

外有毛細胞の消失率は、Fアクチンを染色したsurface preparationを用

いて算出した（図10）。内有毛細胞は、無治療群および両LLLT群共に強大音負荷後も消失せずに残存していた（非提示データ）が、強大音負荷後28日目で、基底回転の外有毛細胞の平均消失率は、無治療群と両LLLT群においてそれぞれ20.0%、2.0% および 2.2%、中回転ではそれぞれ30.2%、2.8% および 2.2%、頂回転ではそれぞれ32.7%、4.6%および8.3%の結果であり（図11）、基底回転、中回転、頂回転の外有毛細胞の平均消失率はいずれも、両LLLT群で無治療群より有意に低くなっていた（ $p < 0.01$ ）。この結果から、LLLTが強大音負荷終了28日目における外有毛細胞消失を抑制したことが示された。

### 3.3 抗 iNOS 抗体を用いた免疫組織化学的検討

強大音負荷終了後の iNOS 発現について評価した。聴力検査結果を踏まえて、免疫組織化学的評価では、出力を  $165 \text{ mW/cm}^2$  とした高 LLLT を実施した。先行実験において、強大音負荷終了 1 時間後、8 時間後、および 19 時間後の時点での iNOS 発現をそれぞれ観察したところ、強大音負荷終了 1 時間後の時点で最も強く iNOS が発現していたため（図 12）、強大音負荷終了 1 時間後の時点での iNOS 発現について、無処置群、強大音負荷＋無治療群、強大音負荷＋高 LLLT 群の間で比較検討した。

iNOS は無治療群の外有毛細胞（図 13）、コルチ器（図 14）および外側壁の線維細胞（図 15）に強く発現した。その一方で、高 LLLT 群では、外有毛細胞、コルチ器および外側壁いずれも減弱した（図 13、14 および 15）。これらの結果から、LLLT が強大音負荷後 1 時間の時点の iNOS 誘導を抑制したことが示唆された。

#### 3.4 cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫組織化学的検討

iNOS と同様に、強大音負荷後の caspase-3 発現について評価を行った。先行実験において、強大音負荷終了 1 時間後、8 時間後、および 19 時間後の時点での cleaved caspase-3 の発現をそれぞれ観察したところ、強大音負荷終了 8 時間後の時点で最も強く cleaved caspase-3 が発現していたため（図 16）、強大音負荷終了 8 時間後の時点での cleaved caspase-3 の発現について、無処置群、強大音負荷＋無治療群、強大音負荷＋高 LLLT 群の間で比較検討した。

強大音負荷終了 8 時間後において、cleaved caspase-3 が無治療群の外有毛細胞（図 17）、コルチ器（図 18）および外側壁の線維細胞（図 19）に強く発現した。その一方で、高 LLLT 群では、外有毛細胞、コルチ器および外側壁

いずれも減弱した（図 17、18 および 19）。これらの結果から、LLLT が強大音  
負荷後 8 時間の時点でのアポトーシスを抑制したことが示唆された。

## 4 考 察

音響外傷モデル動物に対するLLLTの治療効果に関する検討は過去にも報告されているが<sup>16)</sup>、聴力閾値の評価と蝸牛コルチ器の有毛細胞の消失状況に関する評価のみに留まっており、酸化ストレスの制御や光感受性物質など、LLLTの作用機序に関する検討は成されていない。本実験は、音響外傷モデル動物に対するLLLTの聴力閾値改善効果や有毛細胞の形態学的変化の評価のみならず、免疫組織化学染色を行いLLLTの作用機序に関して検討した最初の報告である。

近年、LLLTの作用機序として、iNOSの誘導をLLLTが抑制した結果、酸化ストレスによる脳虚血や末梢神経障害を可及的に制御したとの報告が散見されている<sup>13,14)</sup>。一酸化窒素 (Nitric Oxide : NO) は一酸化窒素合成酵素 (Nitric Oxide Synthase : NOS) により合成され、内耳における生理機能において重要な役割を果たしている。しかしながら、過剰なNOが産生された場合、これらが聴覚障害を引き起こすこと<sup>18-22)</sup>、さらには、iNOSがNOの過剰産生に深く関与していること<sup>23,24)</sup>が、近年明らかになって来ている。音響外傷の発症メカニズムにおいても、iNOSの誘導を契機とした酸化ストレスの後に、細胞内でのcaspase-3の発現によるアポトーシスが生じ、音響外傷を来すことが知られてい

る<sup>5,6)</sup> (図4)。以上を踏まえて、本実験では、iNOSおよびcaspase-3に焦点を置き、免疫組織化学染色によりLLLTの作用機序に関して検討した。

免疫組織化学的検討結果から、LLLTはiNOS誘導の抑制を介して、音響外傷から内耳を保護したと考えられた。同様に、LLLTにより、外有毛細胞におけるcaspase-3の活性が著明に減少した。この一連の結果から、LLLTにより酸化ストレスが減少し、caspase-3活性によるアポトーシスが抑制されたと考えられた。

iNOSおよびcaspase-3の強い発現は、強大音負荷後の外有毛細胞のみならず、有毛細胞の構造維持に対して重要な役割を果たしているコルチ器の支持細胞<sup>18)</sup>、および蝸牛内の電解質バランスの恒常性を保つために重要な蝸牛外側壁の線維細胞<sup>19)</sup>においても観察された。支持細胞におけるiNOSおよびcaspase-3の強い発現は、コルチ器の破綻および有毛細胞死の開始<sup>5,6)</sup>、線維細胞におけるiNOSおよびcaspase-3の強い発現は、蝸牛全体への酸化ストレスの負荷<sup>5)</sup>および蝸牛内の電解質バランスの恒常性の破綻を示唆している<sup>25, 26)</sup>。その結果として、これら蝸牛内の変化が音響外傷による急性感音難聴の発症に繋がっているものと考えられる<sup>6, 25)</sup>。本実験においては、LLLTによりこれらの発現は劇的に抑制されており、この実験結果から、LLLTが蝸牛内の細胞を保護し、外有毛細胞の消失を減少させ、蝸牛内の電解質バランスの破綻を防いだものと考え

られた。

本研究では、Rheeらの報告<sup>16)</sup>に準じ、ラットの強大音負荷モデルに対して、出力密度が165 mW/cm<sup>2</sup> およびその約3分の2に相当する110 mW/cm<sup>2</sup> のいずれかのLLLTを実施した。ABRを用いて聴力閾値測定を実施した結果、2種類の出力密度のLLLT群における聴力閾値変化は、強大音負荷終了4日目、7日目、そして14日目において、無治療群と比較して有意に小さくなった。強大音負荷終了28日目の時点では、両LLLT群および無治療群との間に有意差は認められなかったものの、組織学的検討結果では、図10および11で示したように、両LLLT群で外有毛細胞の消失を著明に低下させた。これらの結果から、LLLTが強大音負荷後の聴力回復を加速させたと考えられた。

近年、LLLTをメニエール病や慢性耳鳴といった内耳障害に対する治療に応用したところ、薬物治療と同等のめまい発作の頻度減少効果や、半数以上患者において耳鳴の軽減効果を認めたとしているほか、明らかな副作用や副損傷は生じなかったと報告されている<sup>27, 28)</sup>。また過去の報告<sup>16)</sup>と同様に、本実験においてもLLLTによる鼓膜穿孔等の明らかな副損傷は認められなかった。

LLLTを音響外傷に対する治療法として臨床応用するためには更なる検討が必要である。その一つとして、LLLTをいつ開始すべきか、という点が挙げられる。過去の報告<sup>29, 30)</sup>では、強大音負荷後、コルチ器で活性酸素種

の産生が 7~10 日間持続し、抗酸化作用を有する薬剤投与を強大音負荷後 1~3 日以内に実施したところ、その後の活性酸素種の産生が抑制されたとしている。この点を踏まえると、iNOS の誘導を抑制し、抗酸化作用を有すると考えられる LLLT も同様に、強大音負荷後、可及的早期の開始が望ましいと考えられる。

その他の検討事項として、LLLT の出力が挙げられる。本実験では、Rhee らの報告<sup>16)</sup> に準じてレーザー光の出力を設定したものの、げっ歯類とヒトでは内耳の大きさや骨の厚さも異なるため、本実験で用いた出力をそのままヒトに応用した場合、ヒトでの音響外傷に対する治療として、効果が不十分な可能性がある<sup>16)</sup>。よって、ヒトへの臨床応用の際には、十分な臨床効果が得られる出力についての更なる検討が必要と考えられる。

また、作用機序に関する更なる検討も必要と考えられる。近年、LLLT の作用機序として、シグナル伝達上、iNOS の上流の転写因子である Nuclear Factor-kappa B (NF-κB) の活性を抑制した結果、下流の iNOS 誘導およびアポトーシスを抑制し、様々な臨床効果を得たとする報告が散見されている<sup>31,32)</sup>。音響外傷を含めた蝸牛障害の機序の一端も、ストレス応答した NF-κB の活性化に基づき、iNOS 誘導による大量の NO 産生、その後の caspase-3 の活性化に伴うアポトーシスが誘導された結果、蝸牛内の細胞死が生じ、聴覚障害を発症すると考えられていることを踏まえると<sup>5,33-35)</sup> (図 4)、本研究における作用機序にお



いても、ストレス応答した NF- $\kappa$ B の活性を LLLT によって調節した結果、下流の iNOS の誘導およびアポトーシスが抑制されている可能性も否定できない。LLLT 実施による NF- $\kappa$ B 活性の変化に関して、例えば免疫組織化学的検討やウェスタンブロット法を用いた解析を行うなど、LLLT の更なる詳細な作用機序の解明については、今後の検討課題としたい。

以上の我々の実験結果から、LLLT が強大音暴露にて生じる酸化ストレスを低下させ、内耳組織内のアポトーシス誘導を抑制した結果、聴力機能および内耳組織を可及的に保護したことが示唆された。今後、更なる検討が必要ではあるが、非侵襲的な LLLT は音響外傷に対する新しい治療方法の一つとなり得ることが示された。

## 5 結 語

- (1) LLLT を音響外傷の治療に応用して聴力閾値改善効果を調べるとともに、iNOS 発現および caspase-3 活性を低下させることで音響外傷の抑制が可能かどうかを検討した。
- (2) ABR による聴力閾値測定の結果、LLLT 実施群では、無治療群に比べて聴力閾値の回復が促進された。
- (3) 外有毛細胞の生存率は、無治療群に比べて、LLLT 群において有意に高かった。
- (4) iNOS に対する免疫組織化学的検討にて、LLLT 群では、無治療群に比べて、発現が著明に減弱した。この結果から、LLLT は iNOS 誘導の抑制を介して、組織障害性を有する過剰な NO 産生を抑制し、音響外傷から蝸牛を保護したと考えられた。
- (5) cleaved caspase-3 に対する免疫組織化学的検討にて、LLLT 群では、無治療群に比べて、発現が著明に減弱した。この一連の結果から、LLLT により酸化ストレスが減少し、caspase-3 によるアポトーシスが抑制され、音響外傷から蝸牛を保護したと考えられた。

(6) 非侵襲的で明らかな副作用がなく聴力閾値回復を促進させる LLLT は、音響外傷に対する新しい治療方法の一つとなり得ることが示唆された。

## 6 謝 辞

御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座塩谷彰浩教授および細部にわたり直接研究のご指導を頂きました防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 松延毅前准教授に衷心より感謝申し上げます。

また、本研究の遂行に際し、貴重な御助言、御協力を賜りました防衛医科大学校防衛医学研究センター情報システム研究部門 佐藤俊一准教授および川内聡子助教、防衛医科大学校臨床検査医学講座 廣井禎之指定講師、防衛医科大学校麻酔科学講座 佐藤泰司講師、そして防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座教室員諸先生に深く感謝の意を表します。

## 付 記

本研究の一部は、

- ・ 第 22 回日本耳科学会総会・学術講演会（2012 年 10 月、名古屋市）
- ・ 第 58 回日本聴覚医学会総会・学術講演会（2013 年 10 月、松本市）
- ・ Association for Research in Otolaryngology The 37st Annual MidWinter Meeting  
（2014 年 2 月、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国）

において発表した。

本研究は、Neuroscience Letters 595 （2015） 81-86 に掲載された。

## 引用文献

- [1] Hultcrantz E, Angelborg C, Beausang-Linder M. Noise and cochlear blood flow. *Arch Otorhinolaryngol.* 1979 ; 224 : 103–6.
- [2] Axelsson A, Dengerink H. The effects of noise on histological measures of the cochlear vasculature and red blood cells. *Hear Res.* 1987 ; 31 : 183–91.
- [3] Ohlemiller K.K, Wright J.S, Dugan L.L. Early elevation of cochlear reactive oxygen species following noise exposure. *Audiol Neurootol.* 1999 ; 4 : 229–36.
- [4] Ohinata Y, Miller J.M, Altschuler R.A, Schacht J. Intense noise induces formation of vasoactive lipid peroxidation products in the cochlea. *Brain Res.* 2000 ; 878 : 163–73.
- [5] Masuda M, Nagashima R, Kanzaki S, Fujioka M, Ogita K, Ogawa K. Nuclear factor-kappa B nuclear translocation in the cochlea of mice following acoustic overstimulation. *Brain Res.* 2006 ; 1068 : 237–47.
- [6] Nicotera T, Hu B.H, Henderson D. The caspase pathway in noise-induced apoptosis of the chinchilla cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003 ; 4 : 466–77.
- [7] Takahashi K, Kimura S, Wada T, Ase Y, Hara A, Kusakari J. Effect of methylprednisolone on the treatment of acoustic trauma. *Audiol Jpn.* 1995 ; 38 : 291-97.

- [8] Huang Y.Y, Chen A.C, Carroll J.D, Hamblin M.R. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose Response*. 2009 ; 7 : 358–83.
- [9] Tata D.B, Waynant R.W. Laser therapy: A review of its mechanism of action and potential medical application. *Laser & Photonics Rev*. 2011 ; 5 : 1–12.
- [10] Streeter J, Taboada L. D, Oron U. Mechanisms of action of light therapy for stroke and acute myocardial infarction. *Mitochondrion*. 2004 ; 4 : 569–76.
- [11] Conlan M.J, Rapley J.W, Cobb C.M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation, A review. *J Clin Periodontol*. 1996 ; 23 : 492–6.
- [12] Uozumi Y, Nawashiro H, Sato S, Kawauchi S, Shima K, Kikuchi M. Targeted increase in cerebral blood flow by transcranial near-infrared laser irradiation. *Lasers Surg Med*. 2010 ; 42 : 566–76.
- [13] Leung M.C.P, Lo S.C.L, Siu F.K.W, So K.F. Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy laser inhibits nitric oxide synthase activity and up-regulates the expression of transforming growth factor-beta 1. *Lasers Surg Med*. 2002 ; 31 : 283–8.
- [14] Gomes L.E, Dalmarco E.M, Andre E.S. The brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3, and induced nitric oxide synthase expressions after

low-level laser therapy in an axonotmesis experimental model. *Photomed Laser Surg.*

2012 ; 30 : 642–7.

[15] Kurioka T, Matsunobu T, Satoh Y, Niwa K, Shiotani A. Inhaled hydrogen gas therapy for prevention of noise-induced hearing loss through reducing reactive oxygen species. *Neurosci Res.* 2014 ; 89 : 69-74.

[16] Rhee C.K, Bahk C.W, Kim S.H, Ahn J.C, Jung J.Y, Chung P.S, *et al.* Effect of low-level laser treatment on cochlea hair-cell recovery after acute acoustic trauma. *J Biomed Opt.* 2012 ; 17 : e068002.

[17] Tanaka K, Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Mikuriya T, Takeno, *et al.* Post-exposure administration of edaravone attenuates noise-induced hearing loss. *Eur J Pharmacol.* 2005 ; 522 : 116–21.

[18] Inai S, Watanabe K, Okubo K. Inducible nitric oxide synthase participates in cochlear damage after acoustic stimulation in Guinea pigs. *J Nippon Med Sch.* 2012 ; 79 : 121–8.

[19] Hsu W.C, Wang J.D, Hsu C.J, Lee S.Y, Yeh T.H. Expression of connexin 26 in the lateral wall of the rat cochlea after acoustic trauma. *Acta Otolaryngol.* 2004 ; 124 : 459–63.



[20] Shi X, Ren T, Nuttall A.L. The electrochemical and fluorescence detection of nitric oxide in the cochlea and its increase following loud sound. *Hear Res.* 2002 ; 164 : 49-58.

[21] Shi X, Nuttall A.L. Upregulated iNOS and oxidative damage to the cochlear stria vascularis due to noise stress. *Brain Res.* 2003 ; 967 : 1-10.

[22] Shi X, Dai C, Nuttall A.L. Altered expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the cochlea. *Hear Res.* 2003 ; 177 : 43-52.

[23] Takumida M, Anniko M, Zhang D.M. Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide. *Acta Otolaryngol.* 2001 ; 121 : 16–20.

[24] Takumida M, Anniko M. Nitric oxide in the inner ear. *Curr Opin Neurol.* 2002 ; 15 : 11–5.

[25] Hirose K, Liberman M.C. Lateral wall histopathology and endocochlear potential in the noise-damaged mouse cochlea. *J Assoc Res Otolaryngol.* 2003 ; 4 : 339–52.

[26] Mizutani K, Matsunaga T, Kamiya T, Fujinami Y, Fujii M, Ogawa K. Caspase inhibitor facilitates recovery of hearing by protecting the cochlear lateral wall from acute cochlear mitochondrial dysfunction. *J Neurosci Res.* 2008 ; 86 : 215-22.

[27] Teggi R, Bellini C, Fabiano B, Bussi M. Efficacy of low-level laser therapy in Ménière's disease: a pilot study of 10 patients. *Photomed Laser Surg.* 2008 ; 26 : 349–53.

[28] Salahaldin A.H, Abdulhadi K, Najjar N, Bener A. Low-level laser therapy in patients with complaints of tinnitus: A clinical study. *ISRN Otolaryngol.* 2012 ; 2012 : e132060.

[29] Yamashita D, Jiang H.Y, Schacht J, Miller J.M. Delayed production of free radicals following noise exposure. *Brain Res.* 2004 ; 1019 : 201–9.

[30] Yamashita D, Jiang H.Y, Le Prell C.G, Schacht J, Miller J.M. Post-exposure treatment attenuates noise-induced hearing loss. *Neuroscience.* 2005 ; 134 : 633–42.

[31] Assis L, Moretti A.I.S, Abrahão T.B, Cury V, Souza H.P, Hamblin M.R, *et al.*

Low-level laser therapy (808nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg Med.* 2012 ; 44 : 726-35.

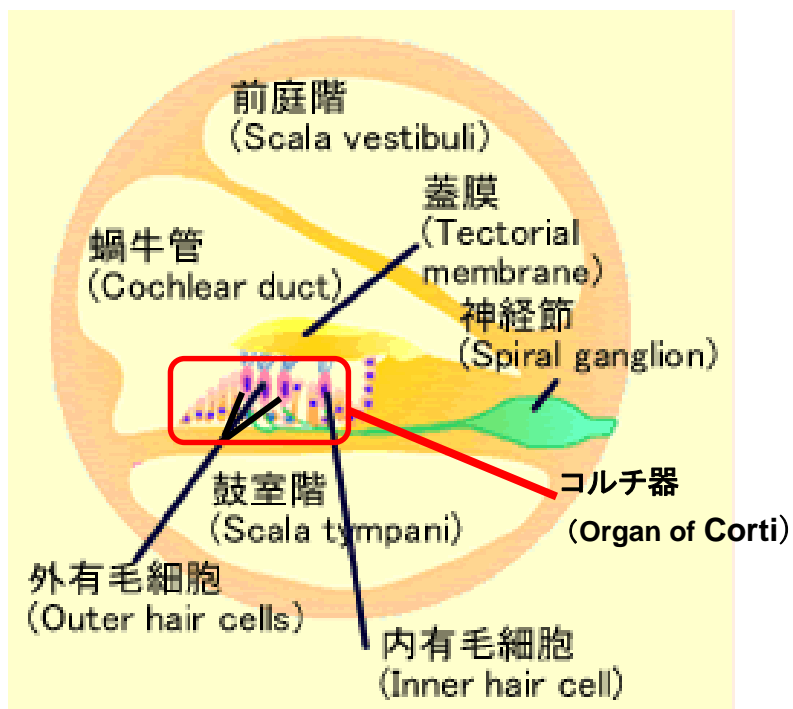
[32] Rizzi C.F, Mauriz J.L, Freitas Correa D.S, Moreira A.J, Zettler C.G, Filippin L.I, *et al.* Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- $\kappa$ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg Med.* 2006 ; 38 : 704-13.

[33] Watanabe K, Inai S, Jinnouchi K, Bada S, Hess A, Michel O, *et al.* Nuclear-factor kappa B (NF- $\kappa$ B)-inducible nitric oxide synthase (iNOS/NOS II) pathway damages the stria vascularis in cisplatin-treated mice. *Anticancer Res.* 2002 ; 22 : 4081-6.

[34] Yamamoto H, Omelchenko I, Shi X, Nuttall A.L. The influence of NF- $\kappa$ B signal-transduction pathways on the murine inner ear by acoustic overstimulation. *J Neurosci Res.* 2009 ; 87 : 1832-40.

[35] Kim S.J, Lee J.H, Kim B.S, So H.S, Park R, Myung N.Y, *et al.* (-)-Epigallocatechin-3-Gallate Protects against NO-Induced Ototoxicity through the Regulation of Caspase-1, Caspase-3, and NF- $\kappa$ B Activation. *PLoS ONE.* 2012 ; 7 : e43967.

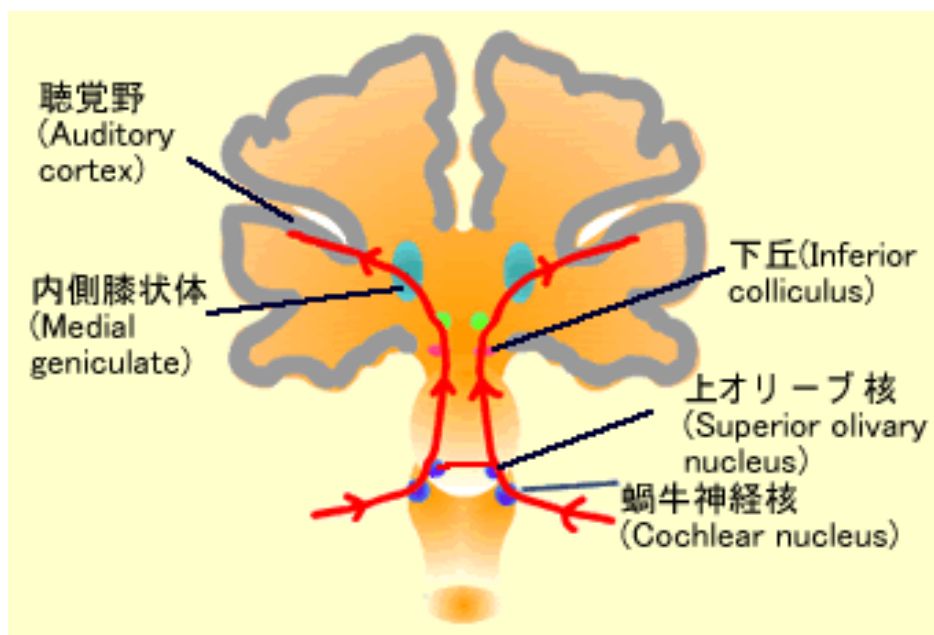
図 1



蝸牛の断面の模式図。

外リンパ液を満たしている前庭階、鼓室階、および内リンパ液を満たしている蝸牛管（中央階）から成る。中央階の基板上には、感覚細胞である1列の内有毛細胞と3列の外有毛細胞および支持細胞から構成されるコルチ器が配置されている。

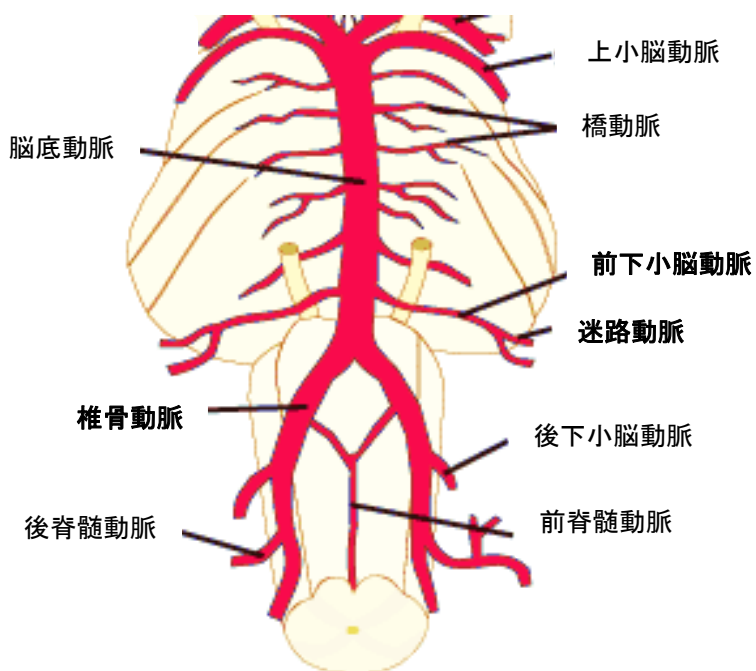
図 2



聴覚伝導路の模式図。

音は、蝸牛の神経節細胞からの神経線維を経て、脳幹の橋に存在する蝸牛神経核に入力する。中脳の下丘へ上行した後、最終的には側頭葉の一次聴覚野と聴覚連合野、感覚性言語野を中心とした大脳皮質で認知される。

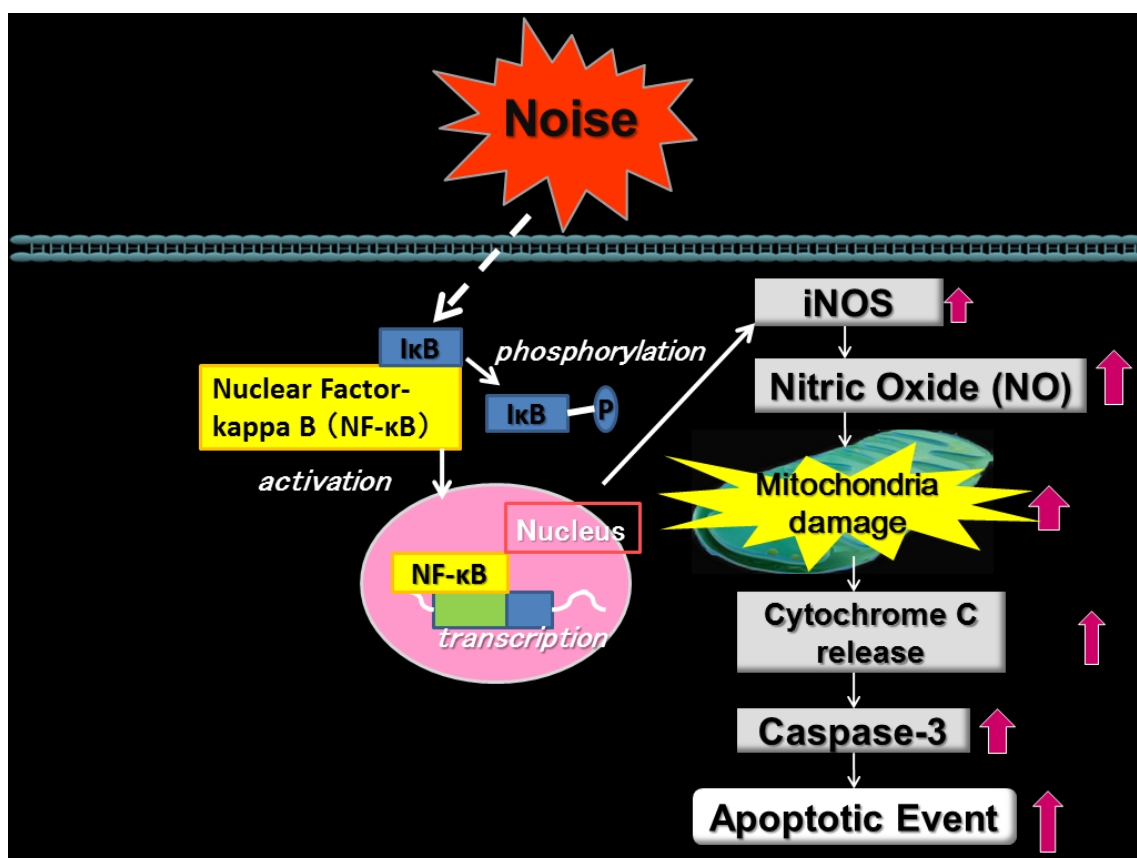
図 3



中枢の主要な動脈の模式図。

蝸牛を含む内耳は、椎骨動脈から分かれた前下小脳動脈の分枝である迷路動脈の血管支配を受ける。迷路動脈は、蝸牛内に枝を出した後に蝸牛を栄養している。

図 4



音響外傷の発症メカニズムの一例。

強大音負荷後、ストレス応答した NF-κB の活性化に基づき、iNOS 誘導による大量の NO 産生、その後の caspase-3 活性化に伴うアポトーシスが誘導された結果、内耳蝸牛内の細胞死が生じ、聴覚障害を発症すると考えられている。

図 5

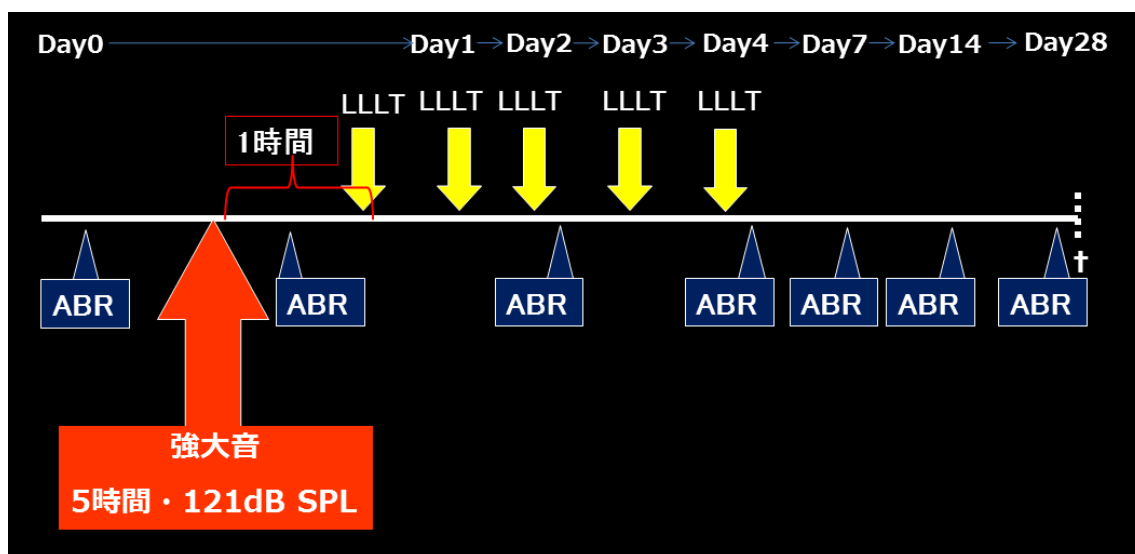


LLLT の実施状況。

ラットを塩酸ケタミンおよび塩酸メドミジンの混合麻酔を腹腔内投与し、左側臥位に固定した後に、レーザー照射用のファイバーを右外耳道へ挿入した。



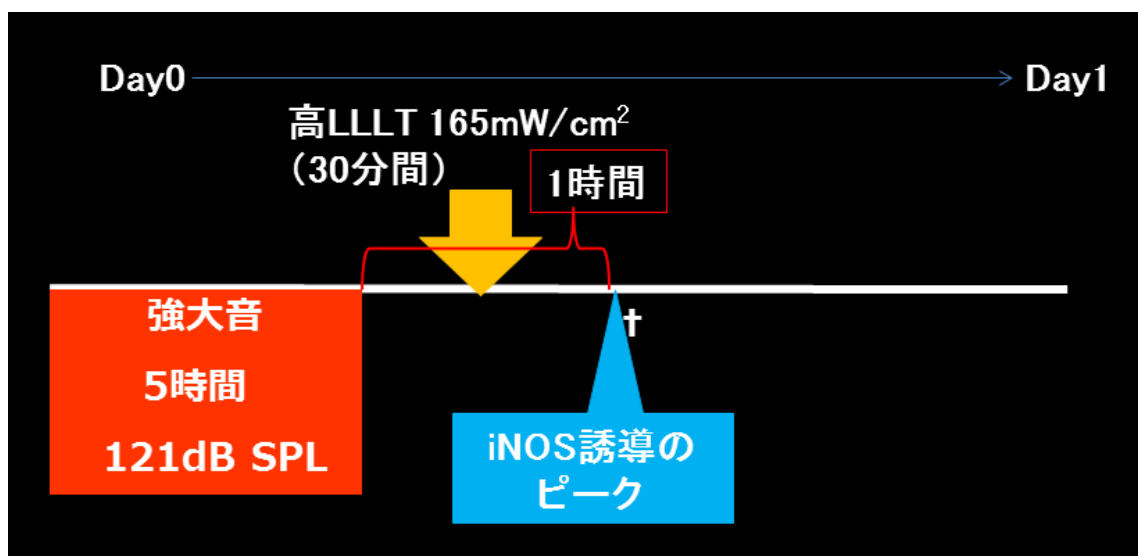
図 6



強大音負荷、聴力閾値評価、LLLLT 実施、および断頭までの実験の流れ。

LLLLT は 1 日 30 分、5 日間連続で実施した。出力密度は  $110 \text{ mW/cm}^2$  または  $165 \text{ mW/cm}^2$  のいずれかとした。初回の LLLT は強大音負荷終了 1 時間以内に開始した。聴力閾値は ABR を用いて計 7 回測定した。強大音負荷終了後 28 日目に断頭し、右蝸牛を摘出した。

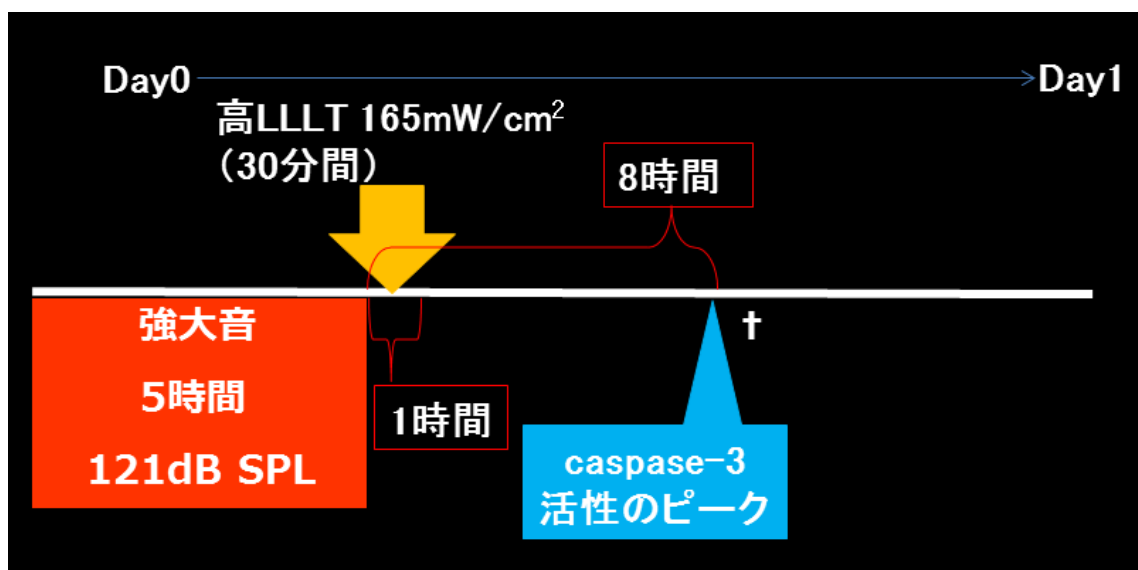
図 7



iNOS の免疫組織化学的検討に関する実験の流れ。

出力密度は  $165\text{ mW}/\text{cm}^2$  の高 LLLT のみとし、照射回数は 30 分間 1 回のみのレーザー照射を強大会音終了 1 時間以内に実施した。強大会音終了 1 時間後に断頭し、右側の蝸牛を摘出した。

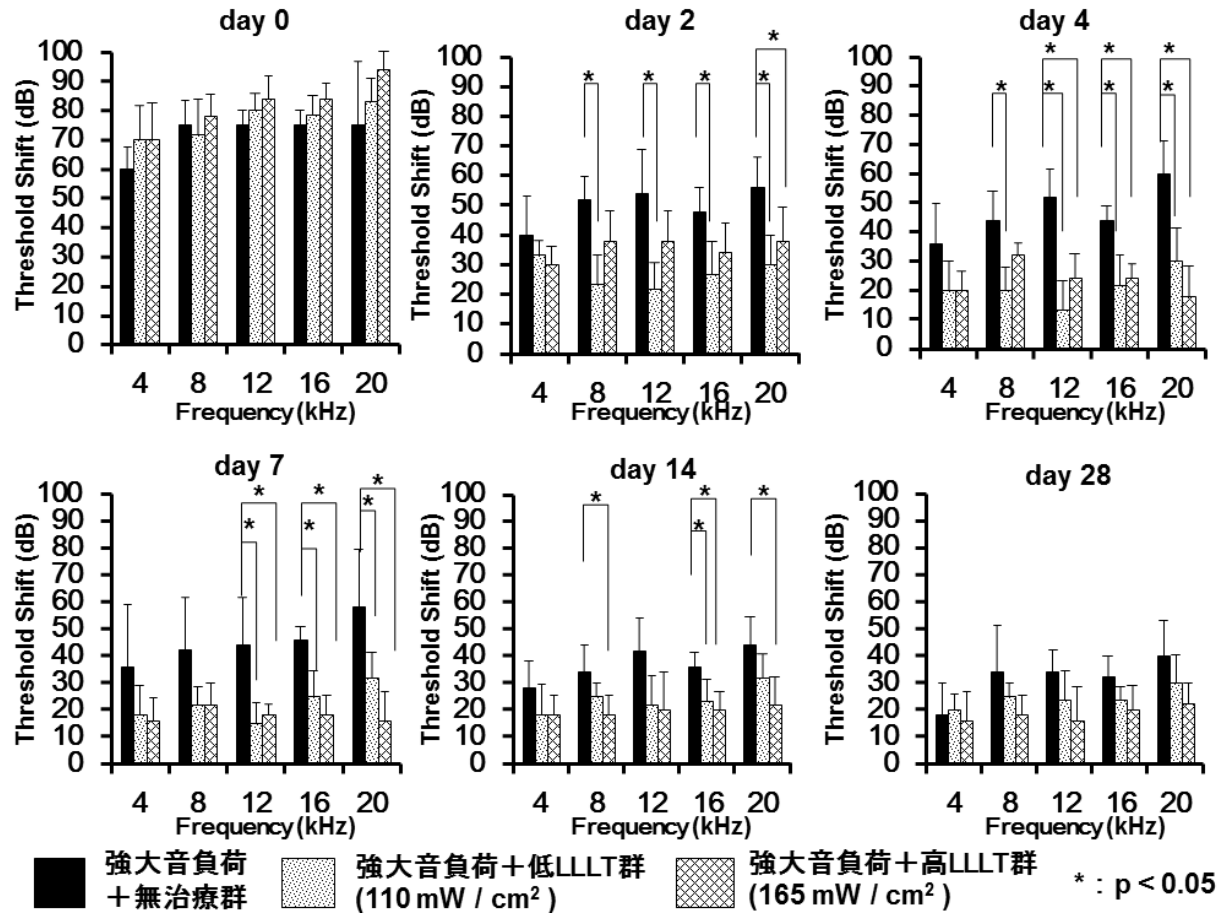
図 8



caspase-3 の免疫組織化学的検討に関する実験の流れ。

出力密度は 165 mW/cm<sup>2</sup> の高 LLLT のみとし、照射回数は 30 分間 1 回のみのレーザー照射を強大音負荷終了 1 時間以内に実施した。強大音負荷終了 8 時間後に断頭し、右側の蝸牛を摘出した。

図 9



ABR による聴力閾値変化の結果。

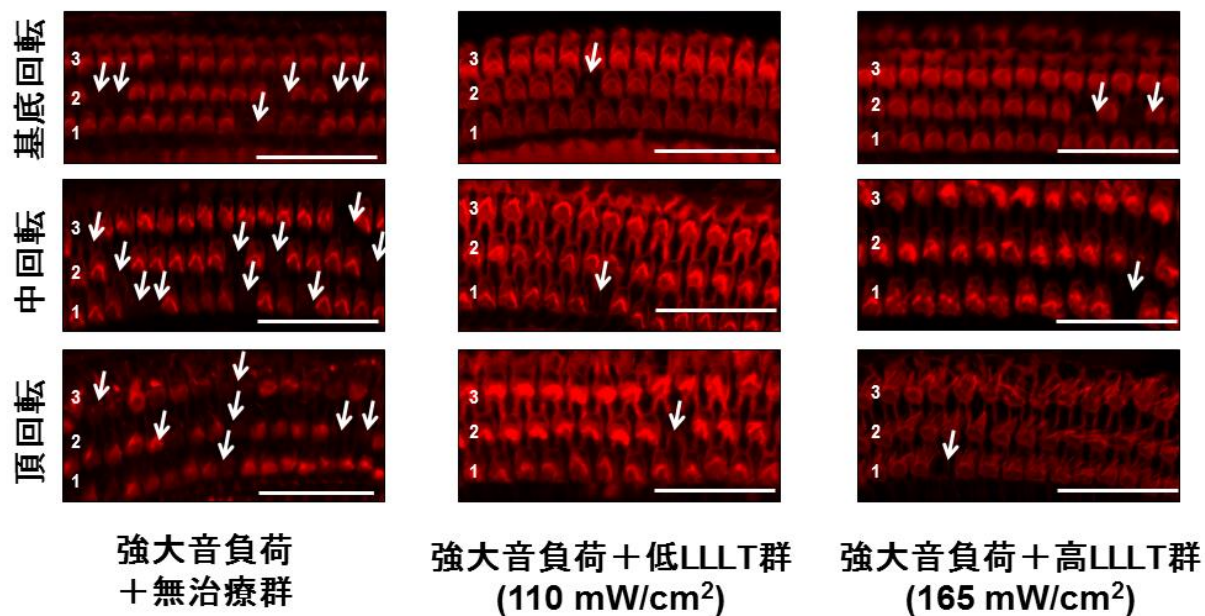
両 LLLT 群では、強大音負荷による聴力閾値変化を減弱させた。強大音負荷 +

高 LLLT 群では、LLLT は強大音負荷終了後 14 日目の時点で、強大音負荷 + 無

治療群に比べて 8、16、20kHz での聴力閾値変化を有意に減弱させた (p < 0.05)。

Error bar : ± SD

図 10



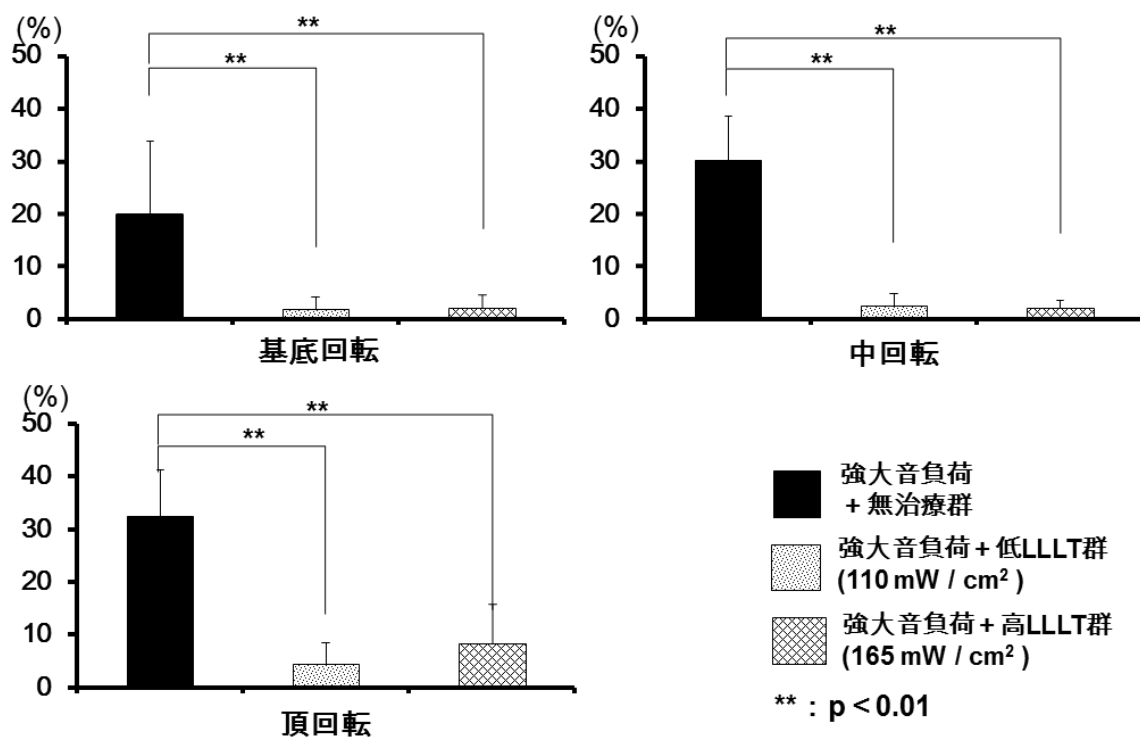
強大音負荷終了後 28 日目での、rhodamine-phalloidin 染色を行った強大音負荷 + 無治療群および強大音負荷 + 両 LLLT 群の外有毛細胞の代表例。

数字 1-3 は外有毛細胞の列を表示している。

矢印は消失した外有毛細胞を示しており、強大音負荷 + 両 LLLT 群では外有毛細胞の消失が著しく抑制された。

Scale bar = 50  $\mu\text{m}$

図 11

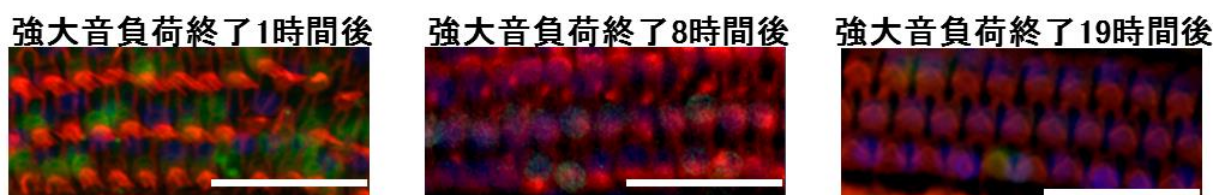


強大音負荷終了後 28 日目での、基底回転、中回転、頂回転における外有毛細胞の平均消失率。

基底回転の外有毛細胞の平均消失率は、強大音負荷 + 無治療群、強大音負荷 + 低 LLLT 群、強大音負荷 + 高 LLLT 群においてそれぞれ 20.0%、2.0% および 2.2%、中回転ではそれぞれ 30.2%、2.8% および 2.2%、頂回転ではそれぞれ 32.7%、4.6% および 8.3% の結果であった。基底回転、中回転、頂回転の外有毛細胞いずれの平均消失率に関して、両 LLLT 群では無治療群に比べて有意に低くなった ( $p < 0.01$ )。

Error bar :  $\pm$  SD

図 12



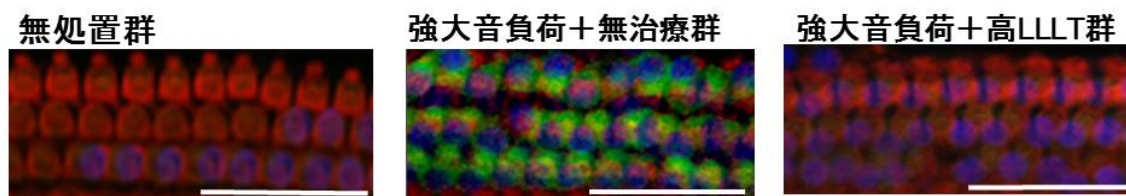
Surface preparation における強大音負荷終了 1、8、19 時間後の iNOS 発現の観察。

核（青色）、iNOS（緑色）、F アクチン（赤色）

外有毛細胞において強い iNOS 発現が強大音負荷終了 1 時間後に認められた。

Scale bar = 50  $\mu$ m

図 13



Surface preparation における強大音負荷終了 1 時間後の iNOS 発現の観察。

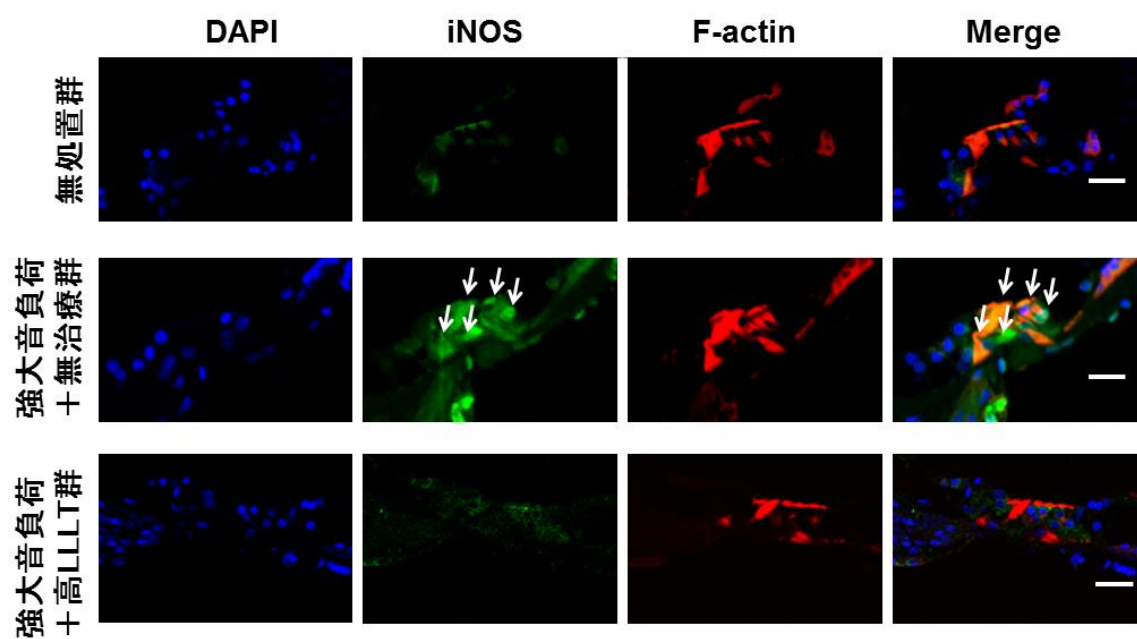
核（青色）、iNOS（緑色）、F アクチン（赤色）

外有毛細胞において強い iNOS 発現が強大音負荷+無治療群に認められた。対照的に、強大音負荷+高 LLLT 群では iNOS 発現が著しく抑制された。

Scale bar = 50  $\mu$ m



図 14



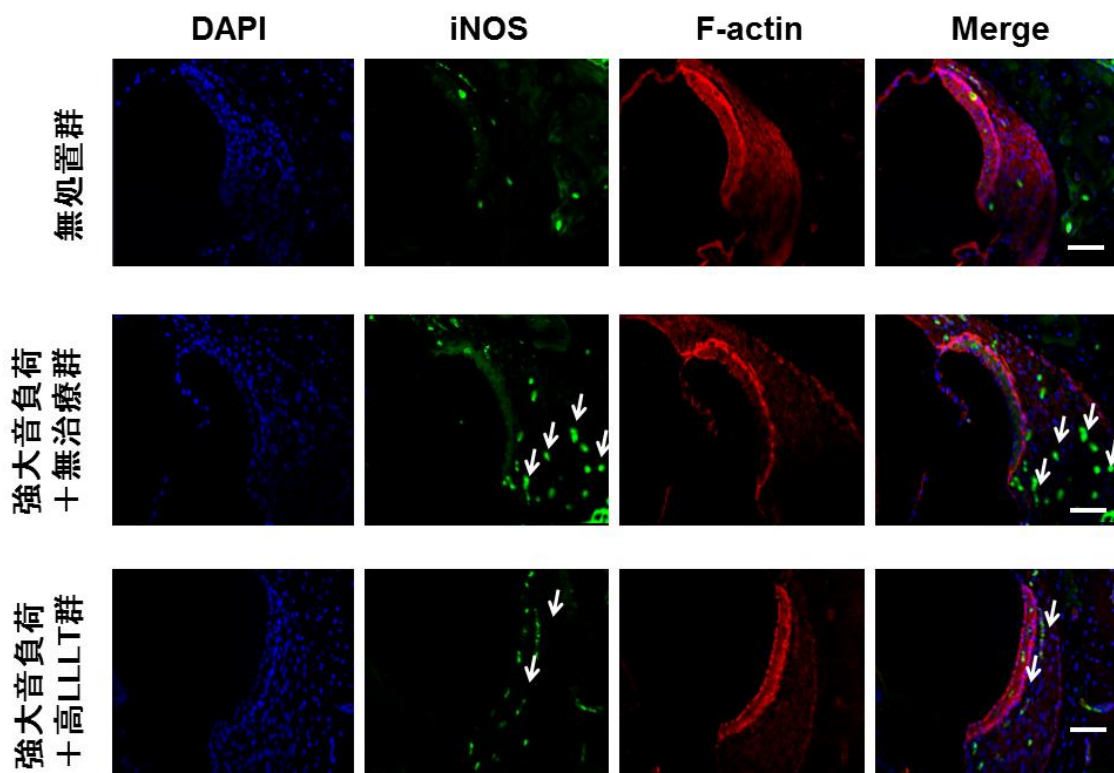
コルチ器（有毛細胞および支持細胞）における強大音負荷終了 1 時間後の iNOS 発現の観察。

核（青色）、iNOS（緑色）、F アクチン（赤色）

コルチ器では、強い iNOS 発現が強大音負荷 + 無治療群の外有毛細胞および支持細胞（矢印）に認められた。対照的に、強大音負荷 + 高 LLLT 群では iNOS 発現が抑制された。

Scale bar = 20  $\mu\text{m}$

図 15



蝸牛外側壁における強大音負荷終了 1 時間後の iNOS 発現の観察。

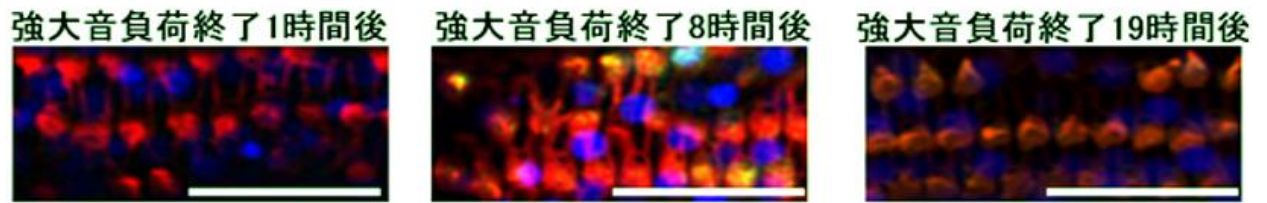
核（青色）、iNOS（緑色）、F アクチン（赤色）

蝸牛外側壁では、強い iNOS 発現が強大音負荷 + 無治療群での線維細胞（矢印）

に認められた。対照的に、強大音負荷 + 高 LLLT 群では iNOS 発現が抑制された。

Scale bar = 50  $\mu$ m

図 16



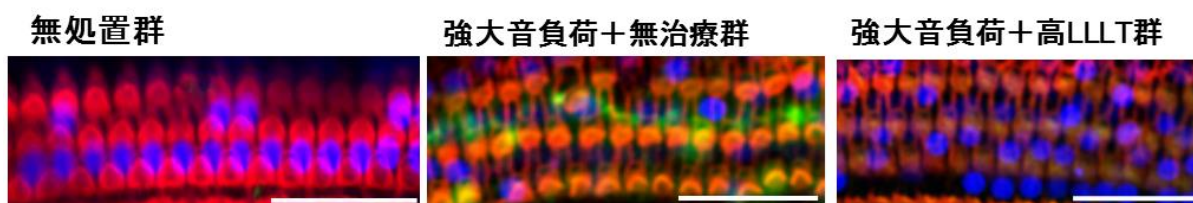
Surface preparation における強大音負荷終了 1、8、19 時間後の cleaved caspase-3 発現の観察。

核（青色）、Cleaved caspase-3（緑色）、F アクチン（赤色）

外有毛細胞において強い cleaved caspase-3 発現が強大音負荷終了 8 時間後に認められた。

Scale bar = 50  $\mu$ m

図 17



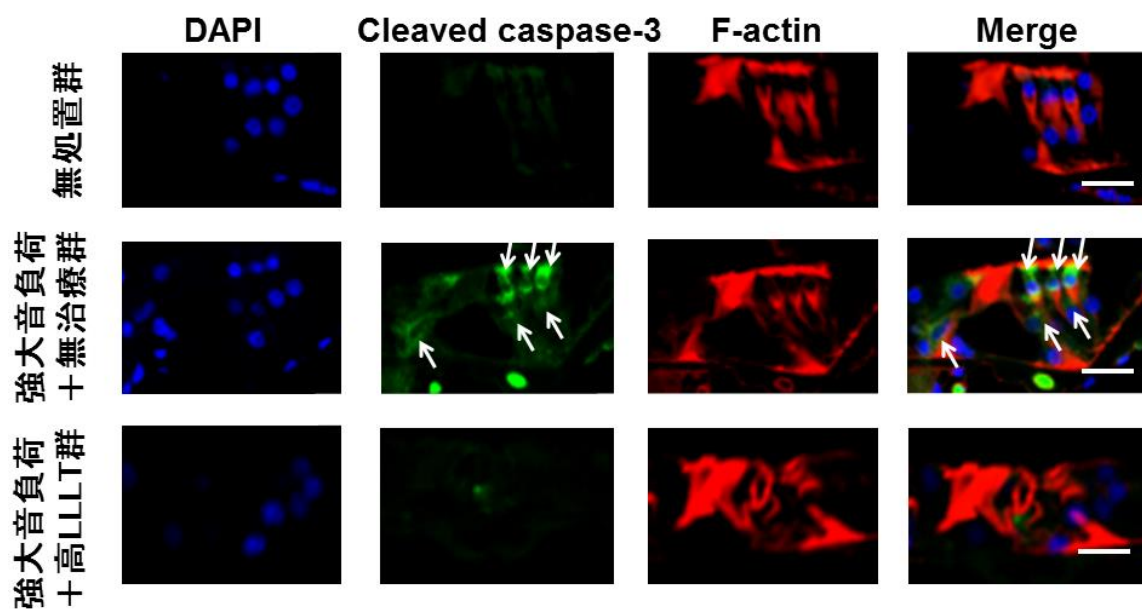
Surface preparation における強大音負荷終了 8 時間後の cleaved caspase-3 発現の観察。

核（青色）、Cleaved caspase-3（緑色）、F アクチン（赤色）

外有毛細胞において強い cleaved caspase-3 発現が強大音負荷+無治療群に認められた。対照的に、強大音負荷+高 LLLT 群では cleaved caspase-3 発現が著しく抑制された。

Scale bar = 50  $\mu$ m

図 18



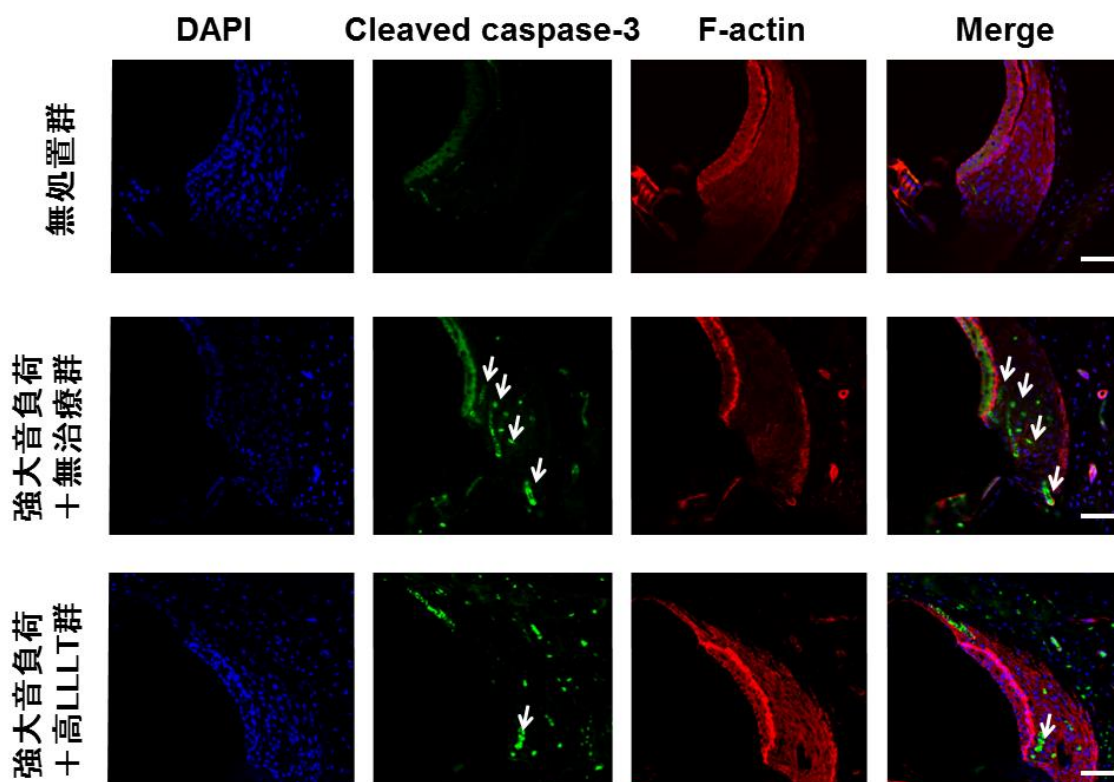
コルチ器 (有毛細胞および支持細胞) における強大音負荷終了 8 時間後の cleaved caspase-3 発現の観察。

核 (青色)、Cleaved caspase-3 (緑色)、F アクチン (赤色)

コルチ器では、強い cleaved caspase-3 発現が強大音負荷 + 無治療群の外有毛細胞に認められた (矢印)。対照的に、強大音負荷 + 高 LLLT 群では cleaved caspase-3 発現が抑制された。

Scale bar = 20  $\mu\text{m}$

図 19



蝸牛外側壁における強大音負荷終了 8 時間後の cleaved caspase-3 発現の観察。

核（青色）、Cleaved caspase-3（緑色）、F アクチン（赤色）

蝸牛外側壁では、強い cleaved caspase-3 発現が強大音負荷 + 無治療群での線維細胞(矢印)に認められた。対照的に、強大音負荷 + 高 LLLT 群では cleaved caspase-3 発現が抑制された。

Scale bar = 50  $\mu$ m