

論文の要旨

申請者 丹羽 克樹

研究論文題目

爆傷による耳鳴と難聴の機序の解明

背景

近代戦争において最も多い外傷の原因は、爆発によって生じる衝撃波と言われている。特に軽症の頭部外傷にもかかわらず様々な症状 (耳鳴・難聴・不眠・不安・鬱など)を呈する患者が多数報告されており問題となっているが、そのほとんどは原因不明である。そこで、爆傷による難聴・耳鳴の発生メカニズムの解明を目的に、簡便かつ安全に衝撃波を作成可能なレーザー誘起衝撃波を用いたラット片側内耳爆傷モデルを作製し、爆傷による難聴の発症メカニズムを検討した。続いて耳鳴評価の行動実験に適した条件を決定し、新しいラット耳鳴モデルを開発した。同モデルを用い内耳の詳細な解析を行い、さらに抗 Arc 抗体という神経可塑性マーカーを用い、耳鳴の有無による聴覚中枢や辺縁系における神経活動性の違いについて検討した。

方法

7-9 週齢の SD ラット (雄)に、YAG Laser を 2.0, 2.25, 2.5 J/cm²の出力、4mm スポット径で右側頭骨内耳方向に照射した。聴力評価として聴性脳幹誘発反応 (ABR)を衝撃波暴露前、暴露後 1、7、28 日後に行い、28 日目に組織評価を行った。内耳においては、有毛細胞を抗 Myosin7a 抗体、有毛細胞とラセン神経節細胞間のシナプス前に存在するシナプスリボンを抗 CtBP2 抗体で免疫染色し定量した。ラセン神経節細胞数は 10 μm の内耳凍結切片を作製し、HE 染色で細胞密度を比較した。また、外有毛細胞の聴毛形態を評価するため走査型電子顕微鏡による観察を実施した。

耳鳴の中核解析のため行動実験により耳鳴のある個体と無い個体に分別後、それぞれ脳の冠状断 40 μm の凍結切片を作成した。コントロール群、難聴あり耳鳴なし群 (難聴群)、難聴あり耳鳴あり群 (耳鳴群)で比較し、抗 Arc 抗体で免疫染色を行った。また、隣接切片の Nissl 染色で細胞構築区分を確認した。

結果

ABR で測定した聴力閾値は、2.0 J/cm²群では一過性に上昇し、28 日後には完全回復した。2.25, 2.5 J/cm²群では 28 日後に患側の聴力閾値上昇が残存した。内耳の検討では外・内有毛細胞数に変化を認めなかったものの、シナプスリボンがエネルギー依存性に減少し、ラセン神経節細胞数も高エネルギー群で有意に減少していた。電子顕微鏡による外有毛細胞の聴毛評

価では、高エネルギー群において、ABR 閾値が上昇している周波数領域に一致して聴毛配列の乱れを認めた。

中枢組織像ではコントロール群に対して難聴群で蝸牛神経核・下丘において難聴周波数領域に一致して Arc 陽性細胞数が増加を認め、海馬 CA1 においても Arc 陽性細胞数が増加していた。難聴群に対して耳鳴群では、蝸牛神経核と扁桃体基底外側核群において Arc 陽性細胞が増加していた。一次聴覚野においては、難聴群・耳鳴群ともにコントロール群に比べて Arc 陽性細胞数は少なかった。

考察

衝撃波を発生するモデルは通常圧縮空気などを用いた大掛かりな装置で行われるが、全身に影響が及ぶため動物実験によって得られる結果の解釈が極めて複雑になる傾向にある。今回作成したレーザー誘起衝撃波による爆傷モデルは、内耳局所にしか影響が無く、鼓膜穿孔や耳小骨離断も無いため爆傷による純粋な感音難聴の評価が可能である。

文献的にシナプスリボンやラセン神経節細胞が半減しても数 dB の閾値上昇しか来さないことがわかっており、本モデルの高エネルギー群で見られた約 30 dB の聴力域値上昇の主たる原因は、外有毛細胞の聴毛障害であると考えられた。また内有毛細胞とラセン神経節細胞の間のシナプスの減少やラセン神経節細胞数の減少は耳鳴を含む聴覚障害の原因と考えられた。

耳鳴の行動実験では、同程度の聴覚障害でも臨床と同様に耳鳴が発生したりしなかったりすることが示された。中枢の解析により難聴だけでも辺縁系に影響を与えていることが示唆され、耳鳴の存在するラットにおいては扁桃体基底外側核群での神経可塑性が上昇しており、耳鳴発生には辺縁系の強い関与が示唆された。

結論

- (1) LISW を利用したラット内耳爆傷モデルを開発し、耳鳴発生を確認することができた。
- (2) 本モデルにおける ABR 永久的閾値上昇の主たる原因は聴毛障害であった。
- (3) 本爆傷モデルにおいて難聴が海馬に影響を与えることが示唆された。
- (4) 本爆傷モデルにおける耳鳴発生には、海馬と扁桃体基底外側核群における可塑的变化が関連していることが示唆された。