

題 目

# 爆傷による耳鳴と難聴の機序の解明

丹羽 克樹

(解剖学専攻)

防衛医科大学校

平成 28 年度

## 目 次

1 緒言 .....	3 頁
1.1 爆傷について	
1.2 研究の背景と目的	
1.3 内耳の構造と聴覚中枢、辺縁系との関係	
2 実験方法 .....	9 頁
実験1；内耳爆傷による末梢の変化	
2.1.1 動物	
2.1.2 LISW	
2.1.3 聴性脳幹反応および歪音耳音響放射を用いた聴力測定	
2.1.4 有毛細胞、シナプスリボンの定量的評価	
2.1.5 ラセン神経節細胞の定量的評価	
2.1.6 走査型電子顕微鏡による聴毛の形態評価	
2.1.7 統計学的検討	
実験2；ラット耳鳴モデルにおける聴覚中枢、辺縁系の変化	
2.2.1 動物	
2.2.2 LISW	
2.2.3 聴性脳幹反応を用いた聴力評価	
2.2.4 行動実験による耳鳴評価	
2.2.5 脳の組織学的評価	
2.2.6 統計学的検討	
3 結果 .....	17 頁

実験1；内耳爆傷による末梢の変化

3.1.1 LISWによる聴力障害の評価

3.1.2 有毛細胞、シナプスリボン、ラセン神経節細胞の定量的評価

3.1.3 走査型電子顕微鏡による聴毛の形態評価

実験2；ラット耳鳴モデルにおける聴覚中枢、辺縁系の変化

3.2.1 2.25 J/cm<sup>2</sup>のLISW暴露後の聴力変化と耳鳴評価

3.2.2 脳の組織学的評価

4 考察	23頁
5 結論	31頁
6 謝辞	32頁
付記	32頁
引用文献	33頁
図表	39頁
用語集	78頁

## 1 緒言

### 1.1 爆傷について

爆傷とは、爆発によって生じる外傷の総称で、一次爆傷から四次爆傷まで4つに分類される。一次爆傷はblast<sup>1</sup>による直接的な外傷であり鼓膜穿孔や肺損傷、腸管出血など空気や水を含む臓器が障害されやすいとされている。二次爆傷はblastによって飛ばされた破片による外傷で、三次爆傷はblastで体が飛ばされ地面や壁などに当たることで受ける外傷である。また四次爆傷は一次から三次爆傷以外の原因で生じる外傷で、blast windの熱による熱傷や、爆発によって生じた化学物質による化学損傷などが含まれる(1)。

### 1.2 研究の背景と目的

近年、軍人のみならず民間人を含めた爆傷受傷者がテロリズムや紛争の多発に伴い増加している。第二次世界大戦、朝鮮戦争、ベトナム戦争までは銃創受傷者が最多であったが、以降は爆傷受傷者が増加し、銃創受傷者は減少している。近年ではテロリズムで主に使用される即席爆弾による爆傷が増えたため民間人の犠牲者、受傷者が増えている(2)。軍人においてはボディアーマーの発達に伴い相対的に頭頸部の爆傷が増加しており(3)、イラク戦争においては耳関連の爆傷が最多であった(4)。2013年4月15日に発生したボストンマラソン爆破事件において発生した爆傷患者でも鼓膜穿孔、一過性の感音難聴、永久的感音難聴、耳鳴、聴覚過敏など耳関連の合併症が多数報告されている(5)。またイラク戦争に従軍した軍人のうち38%が耳鳴を自覚しており(6)、統計学的に認知障害や鬱病と強い相関があることが報告されている(7)(8)(9)。耳鳴に悩まされ自殺に至る症例(10)も報告されており米国を中心に社会問題となっているものの、爆傷による難聴、耳鳴の発生メカニズムは未だ解明されていない(11)(12)。

過去の音響外傷を与えた動物を用いた膨大な耳鳴研究から、耳鳴は内耳・中耳・外耳など

---

<sup>1</sup>爆傷は英語表記で blast injury だが、blast は日本語表記で爆風と訳されるため直訳すると爆風傷ということになる。しかし、blast そのものは爆発により最初に生じる超音速の衝撃波 shock wave とそれに続いて発生する爆風 blast wind に分けられる(図1)。混同を避けるため、本論文では blast、shock wave、blast wind は英語表記とする。



末梢の障害によって中枢が可塑的变化を受けることで発生すると広く認識されている(13)(14)(15)。その中枢の可塑的变化は神経細胞の自発発火率 (Spontaneous Firing Rate: SFR)増加やバースト活動 (Bursting activity)の増加、あるいは神経同調性 (Neural synchrony)などにより説明されている。例えば、音響外傷の動物モデル (耳鳴の評価はなし)では、障害後早期に一次聴覚野のSFRが急激に増加(16)(17)(18)(19)し、遅れて背側蝸牛神経核(20)(21)(22)(23)や下丘(24)(25)が過活動状態になると証明されている。また、騒音暴露によって聴神経、背側蝸牛神経核、下丘のバースト活動の増加が起こることも証明されている(24)(26)(27)(28)。一方で、音響外傷後の一次聴覚野における過活動状態は一過性であったとも報告されている(17)(19)(29)。音響外傷後に耳鳴の評価も行っている研究においては、耳鳴がある個体では背側蝸牛神経核におけるバースト活動の増加と神経同調性の増加が耳鳴と相関していたとする報告(30)や、下丘と一次聴覚野においてSFRが増加しているとする報告などがある(31)。免疫組織化学的に神経可塑性マーカーを用いた研究も行われている。immediate early geneであるc-Fosや、Arcが用いられており、耳鳴や難聴によると思われる蝸牛神経核、下丘、内側膝状体、一次聴覚野、扁桃体、海馬などでの可塑的变化が検出されている(32)。Arcはシナプス結合の変化に関係しているとされるため、過活動状態が継続している場合など変化がない神経細胞では発現が低下する(33)。c-Fosは、神経細胞活性化の初期に核内に発現し他の遺伝子を活性化させるため、神経活動のマーカーとして用いられている(34)。またc-Fosの発現が、短期間の可塑的变化を示すのと異なり、Arcの発現はより長期的な可塑的变化を示すと考えられている(35)(36)。音響外傷を与えて1週間後に、耳鳴がある個体において、一次聴覚野でArcとc-Fosの発現はコントロール群と比較して低下したと報告されている(37)。逆に、音響外傷直後は一次聴覚野でのArc、c-Fosの発現は増加したという報告もある(32)。聴覚伝導路に加え、辺縁系においても評価されているものの、音響外傷の程度、評価する時期によって全く異なる結果が多い。画像的な解析もPositron Emission Tomography: PETやFunctional Magnetic Resonance Imaging: FMRIの発展に伴い行われてきた。これらは糖代謝や脳血流の変化を見ることができ、非侵襲的に評価ができるが短所もある。PETは静かな環境

で実施可能だが放射性物質を用いるためヒトに対して同一個体で繰り返し行うことができない。また空間分解能が低いことも問題だった。最近では $\mu$ PETというより空間分解能を高めた手法が開発され、動物実験で用いられてきている。ラットにサリチル酸を投与して耳鳴を発生させ $\mu$ PETで評価した研究では、下丘と聴皮質でのみ過活動が認められ、他の部位では認めなかったと報告している(38)。FMRIは空間分解能が高く、同一個体で繰り返し実施可能だが機械自体から100 dB以上のノイズが発生するため聴覚を評価するのが困難と言われている。放射性物質を用いない利便性から、プログラムに工夫を加えて主にヒトを対象とした研究が行われている(39)。FMRIにて耳鳴のあるヒトと無いヒトを比較すると、耳鳴のあるヒトで下丘の活動性が増していたという報告(40)や、海馬、扁桃核、側坐核での活動が増していたという報告(41)などがある。最近では、Flavoprotein autofluorescence: FA imagingというミトコンドリア代謝を利用した手法が開発され、ラットの脳スライスを用いた研究(42)が報告された。背側蝸牛神経核に電気刺激を加えると、耳鳴のないラットの脳では局所的にしか刺激が伝わらないが、耳鳴のあるラットの脳ではより広い領域に刺激が伝播した。また、 $\gamma$ アミノ酪酸 (Gamma Amino Butyric Acid: GABA)作動性ニューロンのブロッカーやグルタミン作動性ニューロンのブロッカーを組み合わせで評価し、耳鳴のあるラットの背側蝸牛神経核においてはGABA作動性ニューロンによる抑制が減弱していることが示唆された。背側蝸牛神経核には、抑制性ニューロンとしてグリシン作動性のニューロンも存在するが、グリシン作動性ニューロンによる抑制の低下と耳鳴が相関しているという報告(43)がある。前述の研究と合わせて耳鳴発生メカニズムの一つに挙げられている脱抑制を証明していると考えられる。このように、音響外傷モデルを中心に耳鳴研究は発展してきたが、爆傷による難聴、耳鳴の研究はほとんどなされていない。

耳鳴研究に必要な、耳鳴の評価法についてはいくつか有用な行動実験が開発されてきた。例えば、音響刺激が存在する時に反応行動をとるように動物を訓練し、音響刺激が存在する時間と無音の時間を混在させた時、耳鳴の存在する動物が無音にもかかわらず反応行動をしてしまうことで区別する行動実験(44) (45) (46) (47) (48)などである。これらは有用な行動実

験とされているが、実際には動物の訓練に数週間から数カ月の時間を要することや、訓練自体も複雑であることなどから限られた施設でしか行われてこなかった。さらには行動実験そのものが動物の学習、記憶、動機、認知などの機能に依存しているため、同一個体で何度も耳鳴の評価はできないとされる(49)。そこで、2006年にTurnerらが動物の訓練が不要で、動物の学習、記憶、認知などと無関係な驚愕反射を利用した耳鳴評価法 (Gap detection test: GAP)を開発し、世界中で耳鳴研究が盛んに行われるようになった。本研究においては、爆傷後の耳鳴発生とその変化を経時的に計測する必要があることから、GAPを利用した。

前述のようにblastはblast windとshock waveの成分を含んでいる (図1)。いずれの成分も生体組織に影響を及ぼすものの、shock waveの方が極めて速い圧力の立ち上がりと高いピーク圧を特徴とすることから最も傷害性が高い成分と言える(50)。そのため、爆傷研究ではshock waveを発生させる装置を用いるのが一般的である。かつては限られた施設において実際の爆薬を用いて研究が行われていたが、近年では圧縮空気を用いたshock wave発生装置を用いた研究が多い(11) (51)。圧縮空気により発生させたshock waveの圧波形は実際の爆発の圧波形に近いという大きな利点を有する一方で、屋外に設置している施設もあるように装置が大きく、実験動物の死亡率が高いことが欠点であった。また、必ず鼓膜穿孔を来すことから難聴や耳鳴などの耳科領域の研究では伝音難聴の影響を排除できない。実際の爆傷患者の94%で鼓膜穿孔を認める(2)ものの、多くは自然閉鎖するうえ、自然閉鎖しない症例も外科的処置で鼓膜穿孔は完治可能である。むしろ、現代医療では治療が限られる感音難聴への対応が重要となる。爆傷による感音難聴の程度は鼓膜穿孔や耳小骨連鎖離断などの伝音難聴の程度より軽度ではあるものの頻度は最も多いという報告もある(52) (53)。よって、内耳爆傷研究においては伝音難聴の無い軽度感音難聴・耳鳴モデルを作製する必要がある。

2014年に我々の研究グループが発表したLaser-induced shock wave (LISW)を利用したラット内耳爆傷モデル(54)は、鼓膜穿孔や耳小骨連鎖離断など伝音難聴がない純粋な感音難聴モデルである。LISWは通常の実験室レベルで安全かつ簡便に発生させることができ、爆傷による肺損傷モデルや頭部爆傷モデルも報告されている(55) (56)。ラット内耳爆傷モデルは右

耳後部のみshock waveに暴露させるため暴露部位以外の障害がなく、無駄な犠牲死もない。レーザーの種類や出力を変えることでLISWのエネルギーを自由に増減できるため、感音難聴の程度も自由に変えることが可能である。さらに、レーザー照射毎にエネルギーを校正するため極めて再現性が高いことも大きな利点である。以上の優位性から、LISWを用いた内耳爆傷モデルは、爆傷による難聴や耳鳴のメカニズム解明や治療の検討に非常に有用と言える。ただし、我々の研究グループが確立したラット内耳爆傷モデルはルビーレーザーを用いた強力なLISWを使用しており、右内耳に照射後は右側の聴力がほぼ聾となり、左側の聴力もかなりの影響を受ける重度の感音難聴モデルである。実際の爆傷では軽度の感音難聴患者が最も多いと報告されており、重度の患者はむしろ少ない(5)。また、本研究では耳鳴の評価も課題としているため、耳鳴評価に用いる行動実験に適した聴力のモデルを作製しなければならない。耳鳴評価にはGAPを用いたが、聴覚を利用する行動実験のため耳鳴を発生させるために対象動物に引き起こす難聴は、片側の軽度から中等度の難聴に留める必要があるとされている(49)。そこで、より低出力のレーザーであるYAGレーザーを用いて、まず軽度感音難聴モデルを作製し、爆傷による難聴の詳細なメカニズムを検討した。その後、LISWを利用したラット耳鳴モデルを作製し、爆傷による耳鳴発生時の中枢の変化について神経可塑性マーカーであるArcを免疫染色して検討した。

### 1.3 内耳の構造と聴覚中枢、辺縁系との関係(図2, 4)

内耳は外耳、中耳から伝播した音 (物理的振動エネルギー)を神経の活動電位としての電氣的エネルギーに変換し、中枢へ伝える構造である。内耳は内耳液 (内リンパ液・外リンパ液)で満たされているため、外界からの音情報はアブミ骨の振動を介して内耳内では内耳液の波動として伝えられる。内耳液が振動すると、基底板が受動的に振動し、基底板上の有毛細胞も受動的に振動する。有毛細胞の先端には3列の聴毛があり、外側に行くほど長くなっている。聴毛の先端には機械 - 電気変換チャンネルという陽イオンに対する非特異的なイオンチャンネルが存在し、有毛細胞が振動した際、聴毛が外側に傾くとチャンネルが解放し有毛細胞

は脱分極する。逆に聴毛が内側に傾くと陽イオンの流入が無くなるので過分極となる。外有毛細胞はこのような受動的な振動に伴って能動的に伸縮運動をすることが知られており、この伸縮運動によって基板の振動はより大きくなり、音に対する感受性が増し、音の分別能が向上すると考えられている。このことをActive processと言い、内有毛細胞における音の感受性も高めている。外有毛細胞も内有毛細胞も下方で一次聴神経（ラセン神経節細胞）とシナプス結合しているが、求心性線維の約5%が外有毛細胞、約95%が内有毛細胞と結合しておりほとんどの音情報は内有毛細胞により伝達されることになる。しかし、前述のとおり、外有毛細胞にはActive processという役割があるため、外有毛細胞も内有毛細胞も音情報の伝達に重要な意味を有している。脱分極した有毛細胞はシナプス間にグルタミン酸を放出してラセン神経節細胞を興奮させる。このシナプスにはシナプスリボンという特殊な構造が存在している（図3）。シナプスリボンはシナプス前膜直下の細胞質に内有毛細胞では18～20個、外有毛細胞では1個存在している。また、ラセン神経節細胞とシナプスリボンは1対1の比率で存在している。1つ1つのシナプスリボンは、周囲にグルタミン酸を大量に含有した小胞を有しており、有毛細胞が興奮した際にシナプス間に放出している。ラセン神経節細胞は双極性細胞で、中枢側は蝸牛神経核に結合している。蝸牛神経核からは台形体核、上オリーブ核、外側毛帯核、下丘、内側膝状体、一次聴覚野に投射していく。蝸牛神経核内では、特徴周波数に応じた細胞配列を認め、これをTonotopic mapと呼ぶ。Tonotopic mapは、蝸牛神経核、下丘、内側膝状体、一次聴覚野に存在している。そのため純粋な音情報は蝸牛神経核、下丘、内側膝状体、一次聴覚野に投射され、台形体核、上オリーブ核、外側毛帯核は、主に音源定位に関わっている。なお、蝸牛神経核からはほとんどの神経線維が対側に投射しており、下丘より上位中枢側は左右の連絡が豊富である(57)。辺縁系との関係については、一次聴覚野は海馬と相互に連絡しており、内側膝状体とともに扁桃体への投射も存在する。扁桃体は海馬と相互に連絡している(58)。本研究においては、内耳の各構造に加えてTonotopic mapを伴う聴覚中枢、海馬、扁桃体について解析を行った。

## 2 実験方法

### 実験1；内耳爆傷による末梢の変化

#### 2.1.1 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36匹のSprague-Dawley系ラット雄 (体重150–200 g)を使用した (SLC, Hamamatsu, Shizuoka, Japan)。餌と水は自由に与え、各々別のケージで飼育した。飼育室の気温は23～25°Cに保ち、照明は12時間おきに自動で点灯、消灯を繰り返した。

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 12096)を得て、防衛医科大学校動物実験規則に則り実施した。

#### 2.1.2 LISW

LISW は、径 4 mm のスポットで 532-nm Q-switched Nd: YAG レーザー (Brilliant b, Quintal; pulse width, 6 nanoseconds FWHM)をターゲットに照射することで、ターゲット直下に発生する (図 5a)。ターゲットは厚さ 1.0 mm の polyethylene terephthalate: PET 製のシートに、厚さ 0.5 mm の黒色ゴムを貼り付けたもので、傷害を与えたい組織側に黒色ゴムが接するように密着させて PET 側からレーザーを照射する。レーザー出力は 2.0, 2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup> の 3 条件とし、コントロール群と合わせて計 4 群とした。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右耳後部を丁寧に剃毛し、右耳後部にレーザーを 1 回照射して LISW に暴露させ、片側の内耳を傷害した (図 5b)。

#### 2.1.3 聴性脳幹反応および歪音耳音響放射を用いた聴力測定

聴性脳幹反応 (Auditory brainstem response: ABR)を利用してラットの聴力閾値および、内耳の活動全般を反映する第 I 波の振幅を測定した。また、外有毛細胞の機能を反映する歪音耳音響放射 (Distortion product otoacoustic emission: DPOAE)を測定した。36匹全てのラットで ABR、DPOAEをLISW暴露前、暴露後1日目、7日目、28日目に測定した (図6)。ABRは測定

時、全身麻酔下に脳波記録用のステンレススチール製針電極を左右それぞれの耳後部皮下に挿入し、腰背部皮下にアース用の針電極を挿入した。1 ms幅のトーンバースト刺激は10, 12, 16, 20, 24 kHzの5条件でサウンドジェネレーターから発生させ、音圧はリアルタイムプロセッサとプログラマブルアテニュエーター (RP2.1 and PA5; Tucker-Davis Technologies, Alachua, FL, USA)を通して100 dBから5 dBステップで減衰させた。ラットの外耳道入り口に設置するスピーカーはカップラータイプ (ES1spc; Bio Research Center, Nagoya, Japan)を用いた。ABR波形は512回の刺激から得られた波形の加算平均とし、ABR閾値は第 I 波が観察できる最も小さな音圧とした。なお、ABR第 I 波の振幅は聴神経線維の活動性の和とされている(59)。第 I 波振幅は、80 dBのクリック音提示時の波形で比較し、テキスト形式で出力される時間／振幅データをExcel 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)上でグラフ化し計測した。DPOAEは、全身麻酔下に防音室内でHearID system (Mimosa Acoustics, Champaign, IL, USA)を用いて測定した。ABRと同様に10, 12, 16, 20, 24 kHzで測定すべきだが、装置の限界により10, 12, 16 kHzでの測定となった。

#### 2.1.4 有毛細胞、シナプスリボンの定量的評価

全ての組織学的検討は、最後の ABR 終了後に実施した (LISW 暴露 4 週後)。全てのラットは全身麻酔下に氷冷した 5 ml のヘパリン加 Phosphate Buffered Saline (PBS)及び 500ml の 4% paraformaldehyde (4% PFA) in 0.1 M Phosphate Buffer (pH .7.4)にて経心灌流した。Surface preparation のため、断頭後はすばやく蝸牛を摘出し、4% PFA 中で固定した。蝸牛は耳小骨を外し、卵円窓・正円窓・蝸牛頂部に穴を開け、蝸牛内にも 4% PFA を灌流して、その後 4°C にて後固定した。翌朝に 0.5 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in PBS [Decalcifying Soln. B (EDTA method); Wako Pure Chemical Industries Ltd. Osaka, Japan] に移し、4°C で 1 週間振盪し脱灰した。脱灰後は顕微鏡下に蝸牛を 6 個に切り分け、免疫染色を行った。検体は、5% Normal goat serum (S-1000; Vector Laboratories. Inc. Burlingame, CA, USA) +0.1% Triton-X in PBS 中でブロッキングを常温 1 時間で行い、一次抗体と 4°C で一晩反応させた。一次抗体に

は、有毛細胞特異的なマーカーである myosin7a を染めるための rabbit polyclonal antibody to myosin 7a (1:800; Proteus Biosciences, San Diego, CA, USA)と、シナプスリボンを染めるための mouse monoclonal antibody to CtBP2 (1:400; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)を用いた。一次抗体反応終了後は、PBS にて3回洗浄し、二次抗体反応は常温2時間で実施した。使用した二次抗体はそれぞれ Alexa 647 goat anti-rabbit IgG (H+L)、Alexa 568 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen, Eugene, OR, USA)を用いた。その後PBSで5回洗浄し、スライドグラス上に乗せ、褪色防止剤入りの封入剤 (VECTASHIELD H-1000; Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)を用いて封入した。観察は共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510 Axiovert200M, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Germany)を用いた。まず、6個に分割した蝸牛の全体像を撮影し、画像解析ソフト (ImageJ software; NIH, Bethesda, MD, USA)を利用して全長を測定し、画像上で Viberg らの報告に基づき(60)各実験例の蝸牛上に担当周波数をプロットした。蝸牛最頂部から 37.5% (10 - 12 kHz)、50% (14 - 16 kHz)、62.5% (18 - 20 kHz)、75% (22 - 24 kHz)の部位にマークをし、再度その4点を詳細に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。コントロール、2.0、2.25、2.5 J/cm<sup>2</sup>の4群で周波数別に内有毛細胞: Inner Hair Cell (IHC)・外有毛細胞数: Outer Hair Cell (OHC)、シナプスリボン数をカウントし比較した。IHC・OHC数のカウントは、蝸牛最頂部から 37.5% (10 - 12 kHz)、50% (14 - 16 kHz)、62.5% (18 - 20 kHz)、75% (22 - 24 kHz)の各部位を中心に 200 μm の範囲で行い、異なる周波数とレーザー出力の間で比較した。さらに、有毛細胞とラセン神経節細胞: Spiral Ganglion Neuron (SGN)間のシナプスを検討するため、シナプスリボンに対する抗体である CtBP2 の局在を比較した。シナプスリボンは SGN から伸びる求心性線維が有毛細胞に結合する部位の有毛細胞側に存在し、聴覚情報を持続的に中枢へ伝えるための構造である (図 3)。求心性線維の 95%が IHC と結合することから、蝸牛最頂部から 37.5% (10 - 12 kHz)、50% (14 - 16 kHz)、62.5% (18 - 20 kHz)、75% (22 - 24 kHz)の各部位を中心に 200 μm の範囲で IHC のシナプスリボン数をカウントし、IHC1個あたりのシナプスリボン数で異なる周波数とレーザー出力の間で比較した。バイアスを最小限にするため、カウントは条件を知らされていない3名にさせ、その平均値を用いた。



### 2.1.5 ラセン神経節細胞の定量的評価

LISW暴露4週後に前述と同様の条件で経心灌流、断頭、蝸牛の摘出、後固定を行い、0.5 M EDTAにて2週間脱灰した。脱灰後は10%スクロース中に1日、30%スクロース中に3日間浸漬し、OCTに包埋後、液体窒素で固化して - 80°Cで保存した。10  $\mu$ mの凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色をして光学顕微鏡 (BX51, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) にて観察した。ABRで測定した10 ~24 kHzの周波数領域をカバーするため基底回転 (高周波数領域)、中回転 (中周波数領域)、中・頂回転 (低周波数領域)の3部位に分けて検討した。バイアスを減らすため、それぞれの中心となる切片とその前後20  $\mu$ mの切片で細胞密度を計測し、その平均値で比較した。細胞密度の計測にはImageJを用いた。

### 2.1.6 走査型電子顕微鏡による聴毛の形態評価

LISW 暴露から 4 週後に、全身麻酔下に経心灌流を行った。経心灌流は、スクロースを 8.6% 含んだ 0.01 M sodium phosphate (pH 7.4) 200 ml を灌流後にスクロースを 5%含んだ 2% PFA +2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate (pH 7.4) を灌流した。固定後は直ちに蝸牛を摘出し、同じ固定液中にて耳小骨を外し、卵円窓・正円窓・蝸牛頂部に穴を開け、蝸牛内に固定液を灌流し、4°Cにて一晩静置した。翌朝に 0.5 M EDTA に移し、4°Cで 1 週間振盪し脱灰した。脱灰後は顕微鏡下にコルチ器を切り出した。組織は 1% OsO<sub>4</sub> 中 4°Cにて 30 分間固定し、エタノール中で脱水、液体二酸化炭素で乾燥させた。オスミウム処理後に電子顕微鏡 (JSM-6340F, JOEL Ltd., Tokyo, Japan) にて観察した。

### 2.1.7 統計学的検討

統計処理はPrism 5 (GraphPad software, Inc., La Jolla, CA, USA)を用いて行った。ABR 閾値、有毛細胞数、シナプスリボン数は two-way analysis of variance (ANOVA)を用いて検討した。平均値データの比較については one-way ANOVA を用いた。P 値が 0.05 未満を有意な差とみなした。エラーバーは standard error (SE) もしくは standard deviation (SD)を示している。

## 実験 2 ; ラット耳鳴モデルにおける聴覚中枢、辺縁系の変化

### 2.2.1 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Sprague-Dawley系ラット雄 (体重150–200 g)を12匹使用した (SLC, Hamamatsu, Shizuoka, Japan)。餌と水は自由に与え、各々別のケージで飼育し、飼育室の気温は23~25°Cに保ち、照明は12時間おきに自動で点灯、消灯を繰り返した。

### 2.2.2 LISW

実験 1 と同様の方法で LISW を発生させた。実験 1 の結果 (後述)より、耳鳴を評価するための行動実験に最適なレーザー出力は  $2.25 \text{ J/cm}^2$  と判明したため右耳後部に照射するレーザー出力は  $2.25 \text{ J/cm}^2$  のみとした。コントロール群 3 匹、内耳爆傷群 ( $2.25 \text{ J/cm}^2$  LISW 暴露群) 9 匹を用いて比較検討した。

### 2.2.3 聴性脳幹反応 (ABR) を用いた聴力測定

実験 1 と同様の方法で ABR を利用してラットの聴力閾値を測定した。LISW 暴露前、暴露 1 日後、1 週後、2 週後、4 週後に全身麻酔下で測定した。(図 7)

### 2.2.4 耳鳴評価のための行動実験 ; Gap detection test

Gap detection test (GAP)は、2006 年に Turner らによって開発された耳鳴評価のための行動実験である(49)。正常なげっ歯類で観察される Startle reflex (驚愕反射)と Prepulse inhibition (プレパルス抑制)を組み合わせた耳鳴評価法である。プレパルス抑制とは、驚愕反射を引き起こす驚愕刺激の直前に小さな刺激を与えると驚愕反射が抑制される現象のことである。65 dB の Background noise (環境音)を流しておいて、115 dB の驚愕音を発生させると、驚愕反射が起こる (図 8ab 上段)。驚愕音の直前に、プレパルスとして Silent gap (無音時間)を入れると、耳鳴が無いラットは Silent gap を認識してプレパルス抑制によって驚愕反射が減弱する

(図 8a)。一方で、耳鳴があるラットでは耳鳴によって Silent gap がマスクされるため、Silent gap を認識できずプレパルス抑制が起こらない (図 8b)。そのため驚愕反射が惹起されてしまう。この差を利用して耳鳴の有無を検討する行動実験が GAP である。この行動実験において環境音の周波数を変えることで耳鳴の周波数の測定も可能であり、実験動物の馴化も容易で、同一個体を繰り返し評価できるという大きなメリットがある。驚愕反射やプレパルス抑制の経路もすでに解明されており (図 9)(31) (61)、現在げっ歯類の耳鳴評価では広く使用されている手法である。

GAP を実施する際に、問題となるのは本当にその個体でプレパルス抑制が起こるかということである。即ち、プレパルス抑制の経路 (図 9)に異常があるとプレパルス抑制が起こらないため、GAP を行った際に耳鳴が存在している、と誤った結果を得ることも有りうる。そのため通常 GAP を実施する直前に、その個体のプレパルス抑制に異常がないかを評価するため silent gap ではなく、音響刺激のプレパルスを用いたプレパルス抑制テスト: Prepulse Inhibition test (PPI)を連続して行うのが必須である。GAP と PPI の測定装置は Hamilton-Kinder 社 (米国)製で、防音箱内の天井に環境音用と驚愕音用の 2 つのスピーカーが埋め込まれており、ラットの入るケージの床には圧力計が設置されている (図 10)。驚愕反射は床の圧力計で計測する仕組みとなっている。65 dB のホワイトノイズをプレパルスとし、プレパルス + 驚愕音のトライアルと、驚愕音のみのトライアルをランダムに 8 回ずつ提示し、その時測定された床の圧のそれぞれの平均から PPI Ratio を算出する (図 11)。プレパルス抑制が正常に観察されれば PPI Ratio は 0.6 以下となる。ここで 1 に近い値が出ると、その個体はプレパルスを感じていないか PPI の神経回路に異常があることになり、その後の GAP を実施するのに適さない個体ということになる。

GAP については、環境音を 10, 12, 16, 20, 24 kHz の 1/3 オクターブバンドノイズに設定し、65 dB の音圧とした。また、驚愕音は 40 ms 幅の 115 dB ホワイトノイズを用い、Silent gap は驚愕音の 100 ms 前から 50 ms 幅で提示した (図 8)。8 秒間隔で silent gap + 驚愕音と驚愕音のみのトライアルを 8 回ずつランダムに提示し、驚愕反射時の床にかかる圧を計測する。

それぞれの平均値を算出し、(Silent gap+驚愕音トリアル時の平均圧 / 驚愕音のみのトリアル時の平均圧)を計算する。耳鳴があると、耳鳴が Silent gap を埋めてしまいプレパルス抑制が機能しない。即ち驚愕反射のみのトリアル時と同じ程度の驚愕反射が起こるため、値は1に近くなる。なお正常では概ね0.6以下とされる。GAPは、ABR 閾値測定の前 (ABR 測定時は全身麻酔をかけるため)に実施した。(図12)

### 2.2.5 脳の組織学的評価

組織学的検討は、最後のABR終了後に実施した (LISW暴露4週後)。前述の聴力評価および耳鳴の行動実験により、耳鳴はなく難聴のみを呈したラットと耳鳴と難聴両方を呈したラットが存在した (後述)ため、コントロール群、耳鳴が無く難聴のみの群 (難聴群)、耳鳴と難聴がある群 (耳鳴群)の3群で比較した。全てのラットは全身麻酔下に前述と同様の方法で氷冷した5 mlのヘパリン化PBS、500 mlの4% PFAにて経心灌流した。断頭後は直ちに脳を摘出し、4% PFA中4℃にて一晩後固定した。翌朝に10%グリセリン液に移し、2日間4℃で静置。その後20%グリセリン液に移し、さらに2日間4℃で静置した。その後、図13のように脳の吻側・尾側で切断し、ドライアイスパウダー中で冷凍し、-80℃で保存した。その後、40 μmの厚さで凍結切片を作成した。凍結切片は5シリーズ作製し、そのうちの1シリーズ目はニッスル染色、2シリーズ目を用いて免疫染色を行った。即ち、各シリーズは200 μm間隔となりニッスル染色の隣接切片を免疫染色していることになる。5% Normal goat serum + 0.1% Triton -X in PBS中にて常温1時間でブロッキングを行い、その後一次抗体中にて4℃、72時間で反応させた。一次抗体には、神経可塑性マーカーでimmediate early geneの一つであるactivity regulated cytoskeleton-associated protein: Arcを染めるためのrabbit polyclonal antibody to Arc (1:2000; Synaptic Systems, Goettingen, Germany)を用いた。Arcはアクチンに結合し、核内だけでなく樹状突起にも存在するためシナプスの再配置に関わっていると考えられている(32)。一次抗体反応終了後は、PBSにて3回洗浄し、二次抗体反応は常温3時間で実施した。二次抗体にはBiotinylated anti-rabbit IgG (H+L) (BA-1000; Vector Laboratories. Inc. Burlingame,

CA, USA) を用い、PBSに対して1:500の濃度とした。二次抗体反応終了後はPBSにて3回洗浄し、ABC法にて増感した。ABCキットにはVECTASTAIN Elite ABC Standard Kit (PK-6100; Vector Laboratories. Inc. Burlingame, CA, USA) を用い、反応終了後はPBSにて3回洗浄した。その後の染色に用いるDAB -Ni溶液は、毎染色直前にPBS 200 mlに対して40 mgのDAB.4HCl (Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Osaka, Japan) と、350 mgの塩化ニッケル(II)6水和物 (KANTO CHEMICAL CO., INC.Tokyo, Japan) を遮光下で溶解し、濾過して使用した。免疫染色終了後は、洗浄後にプレパラートに切片を乗せ、乾燥させた。十分に乾燥した後に脱水・透徹・封入を行い観察した。観察部位は聴覚中枢である蝸牛神経核、下丘、内側膝状体、一次聴覚野と、辺縁系である扁桃体、海馬とした。Arc陽性細胞はStereo Investigator (MBF Bioscience -MicroBrightField Inc., Williston, VT, USA)を用いて全てプロットし、Illustrator CC (Adobe, San Jose, CA, USA)を用いてニッスル染色の隣接切片画像と重ねることで細胞構築区分を同定し、区分ごとにプロット数を算出した。Arcは核内のみならず細胞質、樹状突起まで広範に存在するため、明らかにDAB -Niにより細胞全体が黒く染色されているもの、やや薄くても核・細胞質全体が染まっているものをArc陽性とした。細胞質が染色されていても核が標識されていないものは非特異的反応としてカウントしなかった。

主な観察部位は、蝸牛神経核背側核: Dorsal cochlear nucleus (DCN)、蝸牛神経核腹側核: Ventral cochlear nucleus (VCN)、下丘中心核: Central inferior colliculus (CIC)、下丘背側中心核: Dorsal cortex inferior colliculus (DCIC)、内側膝状体: Medial geniculate body (MGB)、一次聴覚野: Primary auditory cortex (Au1)、海馬歯状回: Dentate gyrus (DG)、海馬CA1、CA2、CA3、扁桃体外側核: Lateral amygdaloid nucleus (La)、扁桃体中心核: Central amygdaloid nucleus (Ce)、扁桃体基底核: Basal amygdaloid nucleus (Ba)、扁桃体副基底核: Accessory basal amygdaloid nucleus (ABa)、扁桃体内側核: Medial amygdaloid nucleus (Me)、扁桃体皮質核: Cortical amygdaloid nucleus (Co)とした。また、La・Ba・ABaを合わせた扁桃体基底外側核群: Basolateral complex (BLC)でも評価した。

## 2.2.6 統計学的検討

統計処理は Prism 5 を用いて行った。ABR 閾値及び Au1 における担当周波数領域別の Arc 陽性細胞数は two-way ANOVA を用いて検討した。各脳領域における Arc 陽性細胞数の平均値データの比較については one-way ANOVA を用いた。P 値が 0.05 未満を有意な差とみなした。エラーバーは standard error (SE) もしくは standard deviation (SD)を示している。

## 3 結果

### 実験1 ; 内耳爆傷による末梢の変化

#### 3.1.1 LISW による聴力障害の評価

LISW による聴力変化について、ABR 閾値、ABR 第 I 波の振幅 (ABR wave 1 amplitude)、DPOAE を利用して評価した。ABR は上行性の聴覚伝導路における音響刺激によって惹起される脳電位であり、ABR wave 1 amplitude は全蝸牛神経線維の活動全体を反映していると言われている(62)。DPOAE は感覚上皮の動きを増幅するモーター、即ち Active process を担う外有毛細胞の機能を直接評価できる検査である。

ABR において、2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群の右耳 (LISW 暴露側)で閾値上昇を LISW 暴露直後から認め、28 日後まで LISW 暴露前と比べて有意差 [2.25 J/cm<sup>2</sup> 群; 20 kHz; 17.5 ± 2.50 dB SPL (Pre), 37.5 ± 2.50 dB SPL (28 日後), P<0.05, 24 kHz; 25.0 ± 2.89 dB SPL (Pre), 45.0 ± 2.89 dB SPL (28 日後), P<0.05] [2.5 J/cm<sup>2</sup> 群 ; 20 kHz; 22.5 ± 4.79 dB SPL (Pre), 57.5 ± 10.3 dB SPL (28 日後), P<0.001, 24 kHz; 27.5 ± 4.79 dB SPL (Pre), 67.5 ± 4.79 dB SPL (28 日後), P<0.001]を認めた (図 14b, c)。逆に、2.0 J/cm<sup>2</sup> 群では LISW 暴露後に有意な ABR 閾値上昇は認めなかった (図 14a)。ABR の閾値上昇はレーザーのエネルギー密度に依存して大きくなることが示された。左耳 (非暴露側)の ABR 閾値は、有意な変化を認めなかった (図 15a-c)。

2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群に加えて 2.0 J/cm<sup>2</sup> 群でも右耳 (LISW 暴露側)で ABR wave 1 amplitude は LISW 暴露直後から 28 日後まで LISW 暴露前と比較して全周波数で有意な低下を認めた (図 14d, e, f)。これらの結果は、全ての LISW 暴露群において蝸牛神経レベルまでの上行性聴覚

伝導路に障害があることを示している。なお、LISW 非暴露側である左耳の ABR wave 1 amplitude でも、右側ほどではないが 28 日後まで 10, 12, 16 kHz 領域で有意な低下を認めた (図 15d-f)。ABR 閾値では変化は無かったものの、非暴露側でも何らかの内耳障害が起きていることを示唆している。

DPOAE において、10, 12 kHz での DPOAE 値に全ての群で有意な変化は認めなかったが、16 kHz では 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群のみ LISW 暴露直後から 28 日後まで有意な低下 [60 dB SPL; 36.4 ± 2.55 dB SPL (Pre), 15.9 ± 4.19 dB SPL (28 日後), P<0.01] を認めた (図 13i)。2.0, 2.25 J/cm<sup>2</sup> 群では有意な変化は認めなかった (図 14g, h)。LISW 非暴露側である左耳では全く変化を認めなかった (図 15g-i)。

### 3.1.2 有毛細胞、シナプスリボン、ラセン神経節細胞の定量的評価

LISW による感音難聴の原因を検討するため、LISW 暴露4週後に蝸牛の Surface preparation を行った。LISW 暴露側である右耳では 2.25 J/cm<sup>2</sup> 以上の高エネルギー群で ABR 閾値の上昇を認めているにもかかわらず、OHC 数は全ての条件・周波数で有意な減少を認めなかった (図 16a-d, 図 17a)。LISW 非暴露側である左耳の OHC 数と、両側の IHC 数もまた不変であった (図 17b, d, e)。

続いて、SGN と IHC の間のシナプスについて検討した IHC 1 個当たりのシナプスリボン数は、LISW 暴露側である右耳でレーザーのエネルギー密度依存性に低下していた (図 16e-h, 図 17c)。特に、2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群では有意に減少 [8-12 kHz; Control 群; 13.5 ± 0.440 個, 2.25 J/cm<sup>2</sup> 群; 11.4 ± 0.583 個 (P<0.05), 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群; 9.94 ± 0.225 個 (P<0.001), 12-16 kHz; Control 群; 12.6 ± 0.248 個, 2.25 J/cm<sup>2</sup> 群; 10.1 ± 0.586 個 (P<0.01), 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群; 9.50 ± 0.595 個 (P<0.001), 18-22 kHz; Control 群; 12.2 ± 0.419 個, 2.25 J/cm<sup>2</sup> 群; 8.92 ± 0.551 個 (P<0.001), 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群; 8.26 ± 0.402 個 (P<0.001), 24-28 kHz; Control 群; 12.7 ± 0.485 個, 2.25 J/cm<sup>2</sup> 群; 7.24 ± 0.693 個 (P<0.001), 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群; 6.20 ± 0.577 個 (P<0.001)] しており、高周波数領域ほど障害が強い。LISW 非暴露側である左耳ではシナプスリボン数に変化は無かった (図 17f)。

さらに、SGN数を検討するために蝸牛の凍結切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色)を行った。2.5 J/cm<sup>2</sup>群のみSGN密度が有意に低下 [Basal; 21.8±1.59 個 /10,000 μm<sup>2</sup> (Control群), 15.9±0.951 個/10,000 μm<sup>2</sup> (2.5 J/cm<sup>2</sup>群), P<0.05]し、細胞体の萎縮を認めた (図18d, e)。2.25 J/cm<sup>2</sup>群でも低下傾向を認めたが、細胞体の形状変化は認めなかった (図18c, e)。LISW非暴露側である左耳のSGN密度は全く変化を認めなかった。

これらの組織学的所見は、シナプスリボン数のカウントによりIHCからの入力を受ける一次求心性線維の活動性を正確に評価できるという過去の報告(59) (63) と一致し、LISW暴露後にABR wave 1 amplitudeが低下していることと良く相関している。

全てのラットでLISW暴露直後に鼓膜穿孔は認めず、解剖時の観察にて蝸牛組織の亀裂・正円窓の破裂・アブミ骨底板の亀裂や消失など、明らかな機械的損傷も認めなかった。また蝸牛凍結切片の観察にて基板とコルチ器が離れ、膜構造が破たんする所見も認めなかった。YAGレーザーを用いたLISWよりさらにエネルギー密度の高いルビーレーザーを用いたLISWによる内耳障害を検討した報告(13) でも同様の結果が得られている。よって、本動物モデルはLISWによる内耳への機械的な傷害は無いと考えられる。

### 3.1.3 走査型電子顕微鏡による聴毛の形態評価

2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup>群ではLISW暴露4週後に右耳 (LISW暴露側)高周波数領域で約30 dBのABR閾値上昇を認めた (図14b, c)が、組織学的検討で判明したシナプスリボンの減少とSGNの減少では説明がつかない。Kujawa & Libermann が2009年に発表したマウスのシナプスリボン数とABR閾値上昇の関係について詳細に検討した論文(59)によると、たとえシナプスリボンが半減してもABR閾値上昇は数dBと報告している。我々のDPOAEの結果では10~16 kHzの周波数しか測定できていないものの、高周波数になるほどDPOAE値の低下傾向が見られた。DPOAEは前述のとおりOHCの機能を反映しているとされるため、免疫染色ではわからない聴毛の障害がある可能性を考慮し走査型電子顕微鏡によるOHCの聴毛を調べた。音に由来する振動は有毛細胞の頂部にある聴毛によって伝えられる(64) (65)。正常の



外有毛細胞では聴毛は3列でV型である(19a', e')。しかし、2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup>群では最も外側の列の聴毛が外側に倒れており(図19d, g, h, 黒矢印)、その部位はABR閾値上昇を認めていた周波数の担当部位と一致していた。

## 実験2 ; ラット耳鳴モデルにおける聴覚中枢、辺縁系の変化

### 3.2.1 2.25 J/cm<sup>2</sup>のLISW暴露後の聴力変化と耳鳴評価

ABR閾値変化は4週間後にも高周波数領域で約30 dBの閾値上昇を認めた(図20a, b)。これは、3.1.1で示した結果とほぼ一致しており、LISWの高い再現性を反映している。

PPIの結果は全期間0.6以下に抑えられており(図20c)、全てのラットがプレパルス抑制の経路に異常が無くGAPに適した聴力を持った個体と言える。

GAPの結果からは、中～高周波数領域にLISW暴露1日後から耳鳴が発生していることが確認できた。[16 kHz; Pre; 0.464±0.0410, 1日後; 0.803±0.0760 (P<0.05), 1週後; 0.861±0.0330 (P<0.01), 2週後; 0.835±0.0710 (P<0.01), 20 kHz; Pre; 0.471±0.0490, 1週後; 0.961±0.0790 (P<0.001), 2週後; 0.861±0.0890 (P<0.01), 24 kHz; Pre; 0.490±0.0620, 1日後; 0.780±0.105 (P<0.05), 1週後; 0.822±0.0840 (P<0.05), 2週後; 0.891±0.100 (P<0.01), 4週後; 0.804±0.0770 (P<0.05)]

### 3.2.2 脳の組織学的評価

コントロール群3匹(C1, C2, C3)は、LISW暴露群と同じ条件で飼育され、PPIやGAPも正常範囲内の個体を用いている。LISW暴露群9匹のうち、4週後の断頭直前のABR、GAPにて難聴のみの群(難聴群)が4匹(N1, N2, N3, N10)、難聴と耳鳴が存在する群(耳鳴群)が5匹(N6, N8, N9, N11, N12)であった(図21)。各群で、初めにArcの免疫染色をしたC2, N1, N11についてはArc発現の傾向を見るため全体のArc陽性細胞をカウントした。その結果、差を認めた領域として右DCN・Au1・海馬DG・海馬CA1・BLCは、各群3個体ずつカウントした。[(コントロール群; C1, C2, C3), (難聴群; N1, N2, N3), (耳鳴群; N6, N8, N11)] N1は、蝸牛神経核の

左側が解剖時に損傷したため評価できなかった。また、下丘まではArc陽性細胞数を左右別に集計しているが、より中枢や辺縁系では左右の連絡が多くなるため左右合計のArc陽性細胞数で比較した。

脳は前額断で切片を作製しており、蝸牛神経核は吻尾長が短いため200  $\mu\text{m}$ 間隔の連続切片で評価した (図22)。右DCNについては他の個体、即ちC1, C3 (コントロール群)、N2, N3 (難聴群)、N6, N8 (耳鳴群)でも同じ領域で比較した。下丘も同様に吻尾長が短いため200  $\mu\text{m}$ 間隔とした (図23)。MGBは、Arc陽性細胞が全ての条件で無かったため、吻尾長が短い連続切片での観察はしなかった。海馬、Au1、扁桃核は吻尾長が長いため、400~800  $\mu\text{m}$ 間隔で観察して比較した (図24-1, 2, 3)。Au1・DG・CA1・BLCについてはC1, C3 (コントロール群)、N2, N3 (難聴群)、N6, N8 (耳鳴群)でも同じ領域で比較した。

C2, N1, N11のDCN、VCNではコントロール群に比較して明らかに難聴群・耳鳴群の方が多くのArc陽性細胞を認め、特に耳鳴群では多かった (図25a)。右DCNの3個体ずつの平均値での比較では有意差は認めないものの耳鳴群でArc陽性細胞数は多い傾向であった (図25b)。また、DCNは表層から深部に向かってMolecular Cell Layer: MCL、Fusiform Cell Layer: FCL、Deep Layer: DLの3層に区分されている (図26b)。難聴群・耳鳴群で多くのArc陽性細胞を認めた領域はFCL、DLであり、Tonotopic map (図26b)(66, 67)と比較すると、ABRで閾値上昇を認めている周波数以上の領域で多かった (図22)。VCNではArc陽性細胞の分布領域に明らかな局在は無かったが、Arc陽性細胞数は難聴群・耳鳴群で多かった。

主に対側のDCN、VCNからの投射を受けるCICにおいて難聴群の方が耳鳴群よりArc陽性細胞が多かった (図25a)。染色像 (図28)をCICにおけるTonotopic map (図28b) (66)と比較すると、ABRで閾値上昇を認めた領域でArc陽性細胞が多かった (図23)。上位中枢から下行性の投射を受けるDCICでは、コントロール群と難聴群が同程度であったが耳鳴群では少なく、特に左側でArc陽性細胞が少ない結果であった。

Au1では、II~VI層におけるArc陽性細胞数の合計で比較した。また、Laに投射するのは第II層と第IV層のニューロンのみとされており (68)、第II層と第IV層の合計数でも比較した。

C2、N1、N11でのArc陽性細胞数比較 (図25a)ではコントロール群が最も多く、次いで耳鳴群、最も少なかったのは難聴群であったが、各群3例の平均値の比較 (図25b)では有意差はないものの耳鳴群で最も少なかった。Au1の染色像 (図29)およびArc陽性細胞の分布 (図24-1, 2, 3)を見ると、コントロール群は全層にまんべんなくArc陽性細胞が分布しているように見える。。本研究では、Au1の尾側端から2.4 mm吻側まで観察しており、Au1のTonotopic map (図30) (69)と比較すると低周波数領域から概ね30 kHz領域までカバーしていることになるため、Arc陽性細胞数を断面ごとに比較した (図31a, b)。全体的にコントロール群において各断面でArc陽性細胞が多い傾向にあった。また、難聴群で高周波数領域になるほどArc陽性細胞が少ない傾向だった。これは、難聴の影響が考えられるが、有意差は無いもののAu1後端から2.0 mmの距離の領域、即ちABRで難聴を認めた周波数領域でのみコントロール群より多い傾向であった。耳鳴群では全領域で難聴群よりさらにArc陽性細胞が少ない傾向であった。過去の報告では音響外傷により耳鳴が存在するときAu1のArc陽性細胞は著明に減少するとされている(70)ため、本研究の結果も類似する結果と言える。

海馬ではCA1、DGで陽性細胞数が多くCA2、CA3では少なかった (図25a)。CA1では難聴群・耳鳴群で明らかにArc陽性細胞数が多く、ほとんどの陽性細胞が扁桃体と直接連絡する腹側(68)に集中していた (図32c, d, e, 図24-1, 2, 3)。各群3例の平均値の比較 (図25b)でも同様の傾向であり、コントロール群と耳鳴群間で有意差を認めた ( $P<0.05$ )。DGは元々神経細胞の新生が盛んなところであり(70)、多くのArc陽性細胞を認めた (図32f, g, h)が、難聴群・耳鳴群でやや多い傾向だった (図25a)。各群3例の平均値の比較 (図25b)でも同様の傾向であった。

扁桃体ではそれぞれの区分ごと異なる傾向を示した。扁桃体への主な入力は、Au1・MGBからLaへ、海馬からはBaに存在する。また主な出力は、Laから前頭前皮質・側坐核へ、Baから下丘・海馬へ、Ceからは自律神経系・情動反応系へ存在する (図33a, b)。Arc陽性細胞数は、Laではコントロール群と耳鳴群で多く、難聴群で少なかった。Baではコントロール群で最も少なく、耳鳴群で最も多かった。海馬へ連絡する嗅後部皮質へ出力するABa (71)

では、コントロール群だけが少なく難聴群・耳鳴群で多かった。La、Ba、ABaは合わせてBLCと呼ばれ(図33c)(68)、聴覚に関わる重要な領域である。BLC全体でArc陽性細胞を比較すると、コントロール群で陽性細胞が最も少なく、耳鳴群で最も多いという結果(図33d-f)であった。これは、各群3例での平均値の比較(図25b, d)でも有意差は無いものの同様の傾向であった。Ceでは全体的にArc陽性細胞数が少なかった(図25a)。主に嗅覚と関係するCoではコントロール群で最もArc陽性細胞数が多く、耳鳴群で最も少なかった。同じく嗅覚と関係するMeでは耳鳴群でArc陽性細胞を最も多く認めた(図25a)。

## 4 考 察

### LISWを利用したラット内耳爆傷モデルの有用性

我々は、LISWを利用したラット内耳爆傷モデルを作製した。同モデルには伝音難聴は無く、純粋な感音難聴モデルである。本研究で使用したLISWの条件で生じる難聴は比較的軽いが、実際のヒトの爆傷患者で見られる聴力像に類似している(5)。これまで行われてきた爆薬や圧縮空気を用いる爆傷の動物モデルでは必ず鼓膜穿孔が生じるため、動物モデルの正確な内耳機能評価は不可能であった。さらに、インパルスノイズを用いた爆傷モデルにおいてはコルチ器が重度の障害を受け、基底板から剥がれたり有毛細胞が消失したりするなど重度の感音難聴を認めていた(72)(73)が、これは実際の爆傷患者ではめったに見られない現象とされる(5)。よって、爆傷でよく見られる軽度感音難聴の研究には、LISWを利用した本動物モデルのように鼓膜穿孔を生じないモデルが適していると考えられる。加えて、我々のモデルでは $2.0 \text{ J/cm}^2$ の条件においてABR閾値は上昇せずABR wave1 amplitudeの低下を認めており、有意差は無いもののシナプスリボンの減少によるものと考えられた。このようなタイプの難聴は近年Hidden hearing lossと名付けられ、Cochlear neuropathyがその原因であるとされている(59)(74)(75)。Hidden hearing lossの原因が耳鳴発生(74)(76)や聴覚過敏(77)と密接に関係していることも示されている。よって我々のモデルは爆傷の合併症として最も頻度の高い耳鳴や聴覚過敏の原因を解析するのに価値ある存在と考えられる。

## 爆傷後、有毛細胞は生存していても聴毛が障害を受けている

LISW暴露後1ヶ月であってもDPOAEの低下している周波数と一致して電子顕微鏡で聴毛の障害が観察された。興味深いことに、聴毛の乱れ方が特徴的であった。すなわち3列ある聴毛のうち、内側2列は正常であるのに対し、最も外側の聴毛のみが障害されており、Surface preparationの有毛細胞カウント結果と同様に有毛細胞自体の消失はほとんど認めなかった。聴毛障害は、音響外傷でも観察されるが、障害パターンは全く異なる。2011年にWangらが発表した110 dB PSLのホワイトノイズを2時間暴露させた典型的な音響外傷モデルでは、聴毛の癒合や列に関係なく聴毛がばらばらに倒れ、有毛細胞の消失も高率に認めている(78)。Wangらの論文では、音響暴露1カ月後に聴毛の形状は回復していた。2013年にChoらが発表した圧縮空気により衝撃波を作製できる装置で爆傷による難聴を再現した研究では、有毛細胞を免疫染色後に共焦点顕微鏡で観察して聴毛は正常であったと結論付けている(51)。しかし、Choらの論文中の画像を見ると、最も外側の聴毛がその基部から外側に倒れているようにも見えただため、Choらと同じグループの研究者に確認したところ、障害はあると認め、その後電子顕微鏡で証明したとの答えを得た。またネコに音響外傷(110 dB ホワイトノイズを15分間)を与え、2ヶ月以上経過してから電子顕微鏡で聴毛を評価した報告でも同じように最も外側の長い聴毛のみが倒れる所見が見られている(79)。この論文では、聴毛の根の部分(rootlet)で折れている所見を認めておりrootletで折れている聴毛の数は聴力障害と良く相関すると結論付けている。音響外傷の条件としてはWangらの報告より軽度だが、動物種が異なるため比較はできない。聴毛は、同じ列の隣接する聴毛とside linkという構造で結合しており、内側から1列目と2列目、あるいは2列目と最外側の列の聴毛は頂部でtip linkという構造で結合している。我々が走査型電子顕微鏡で得た所見からは、rootletが折れているかどうかは確認していないが、LISWによりtip linkやside linkが切断され、完全に外側へ倒れてしまっていた可能性がある(図34)。

## 爆傷による耳鳴に関する研究

爆傷による耳鳴に関する研究はここ数年でようやく行われるようになってきたが、MRIなど画像的手法とGAPを用いたものが多く、神経病理学的な発症機序はほとんど不明であった。2012年に発表された、ラット頭部に爆薬を用いて発生させた衝撃波を暴露させ耳鳴を発生させた研究では、衝撃波暴露後2週間で下丘とMGBにおいて可塑的变化が見られたものの、蝸牛神経核やAu1、扁桃体では変化は認めなかったとしている(11)。Luoらが2014年に圧縮空気による衝撃波に暴露させ耳鳴を発生させたラットの蝸牛神経核と下丘の活動性の変化を電気生理学的に解析した研究を発表した(80)(81)が、その結果として、衝撃波暴露後1日目から耳鳴が発生し、徐々に減衰するものの3ヶ月後にも高周波数領域の耳鳴が残存していたと報告している。その際DCNでSFRの増加が衝撃波暴露後1日目から発生し、徐々に減衰して3ヶ月後にはコントロール群と変わらないレベルになっており、Tinnitus(-)群ではSFRに変化がなかったと報告している。下丘においては、Tinnitus(+)群で衝撃波暴露後1日目から3か月目まで有意にSFRの増加が見られ、バースト活動も増加傾向だったが、Tinnitus(-)群でも同様の結果であり、Tinnitus(+)群とTinnitus(-)群の間に有意差は無かったとしている。これは、下丘において耳鳴の減衰に関する何らかの可塑的变化が生じていることを示唆する所見か、下丘では難聴のみの影響しか存在しないという所見と思われる。

我々の結果ではLISW暴露4週後の時点で、下丘中心核におけるArc陽性細胞数は難聴群で最も多く、耳鳴群の2倍近く発現が多い。またコントロール群より明らかに難聴・耳鳴群では多い(図25)。これらの論文ではABR閾値は障害後1ヶ月で回復しているものの、ABR wave1 amplitudeは低下したままとなっており、いわゆるHidden hearing lossの状態でも末梢から聴覚中枢への入力が減っていると考えられる。上位聴覚中枢が、末梢からの入力低下に伴い活動性を増すという変化は恒常性維持という観点からも合理的で、過去の音響外傷による耳鳴研究とも一致する所見と言える(74)。動物モデルとしては我々のLISW 2.0 J/cm<sup>2</sup>の条件と類似しており、今回耳鳴の実験で用いた2.25 J/cm<sup>2</sup>の条件よりはマイルドな内耳障害が起きていると考えられるが、我々の蝸牛神経核と下丘におけるArc陽性細胞数の増加はLuoらのSFR

の上昇と相関しているように見える。

### 蝸牛神経核における神経可塑性変化

DCNにおいては特にLISW暴露側である右側でArc陽性細胞が多く認められた。また、その分布は代表的なグルタミン作動性ニューロンであるFusiform Cellが存在するFusiform Cell Layer: FCLと、Giant Cellが存在するDeep Layer: DLに集中していた。さらに、難聴の存在する周波数領域に一致した分布を示した。コントロール群では左右差はなく、Arc陽性細胞数も少なかった。耳鳴群では難聴群よりもさらにArc陽性細胞が多いことから、難聴の影響のみならず耳鳴群でさらに強い脱抑制が起きている可能性があり、耳鳴発生とも関係していることが示唆される。また、音響外傷により耳鳴を発生させたラットを用いた研究では、電気生理学的に耳鳴とDCNのFCLに存在するFusiform Cellの活動性が相関していたとの報告(30)もあり、今回のArc陽性細胞増加と関係があるかもしれない。

VCNにおいてもコントロール群ではArc陽性細胞数が左右差なく少なかったが、難聴群・耳鳴群でかなり増加していた。しかしながら難聴の存在する周波数領域に限らず、全体的に増加している像を認めた(図22)。特に耳鳴群ではArc陽性細胞が多かったが、左右差はなく単純に難聴の影響と言えない結果であった。

### 下丘における神経可塑性変化

CICは、対側の蝸牛神経核だけでなく、同側あるいは両側の外側毛帯や上オリーブ核からも投射を受けている。交連線維を通して左右の連絡も存在する。CICからは大部分が同側のMGBへTonotopic mapに従って整然と投射している。一部対側のMGBにも投射している(82)。Arc陽性細胞数はコントロール群で少なく、難聴群・耳鳴群が多かった。難聴群の方が特に多く、さらに左側のCICの方が右側のCICより多かった。難聴の存在する周波数領域で特にArc陽性細胞が多いことも考慮すると、これは右耳の難聴を反映していると考えられる。興味深いことに右側のCICでもArc陽性細胞は多いが、分布をみるとTonotopic mapに関係なく

全体的に分布している像が認められた (図23)。耳鳴群でも総数は難聴群よりやや少ないものの、左側CICではTonotopic mapに従ったArc陽性細胞の分布を示し、右側では全体的に分布している。ただし、耳鳴群では右側CICの方が左側よりArc陽性細胞の総数は多く、耳鳴の発生と関係している可能性がある。衝撃波を左耳に暴露させ、難聴と耳鳴を評価し、電気生理学的に下丘のSFRを測定したLuoらの論文(81)では、衝撃波を暴露させた左側とは逆の右側のSFRが増加していることを報告しているが、暴露側の測定をしていないため比較はできない。CICには聴皮質からの入力や対側のCICからの入力も存在し、GABA作動性ニューロンが豊富にある(83)ことから、ここでも脱抑制が起きている可能性がある。また、両側の聴皮質から投射を受け、CICへの投射が存在するDCIC (84)では難聴群・耳鳴群ともに右側のArc陽性細胞が多くなっており、特に耳鳴群では3倍近い数の差があるため、右CICにおけるArc陽性細胞数増加と関係があるかもしれない。耳鳴が発生するとされる条件で音響外傷を与えた直後にArcの発現を調べた論文では下丘でArc陽性細胞はほとんどないという結果であった(32)。Luoらの研究では衝撃波暴露後1日後には下丘のSFRの増加を認めている(81)ので、下丘では末梢側から徐々に可塑的变化を受けているものと推察される。

### 内側膝状体における神経可塑性変化

MGBの領域は3つに区分され、それぞれ腹側領域: Ventral division (MGV)、背側領域: Dorsal division (MGD)、内側領域: Medial division (MGM)と呼ばれている。MGVにはTonotopic mapに従った下位聴覚中枢からの投射や視床網様核からの抑制性の投射が入力し、Au1への出力が存在している。MGDにはDCICからの上行性の投射や視床網様核、Au1からの下行性の投射も入力しており、Laや二次聴覚野などへ出力が存在している。MGMには下丘外側核や上オリーブ核、上丘などから上行性の投射を受け、視床網様核やAu1から下行性の投射を受け、非聴覚系の皮質や扁桃体への出力が存在している。このように、MGBは辺縁系や皮質と複雑に連絡しており、純粋な聴覚情報などの感覚情報をリレーするだけの領域ではなく、学習や記憶と深く関係している(85)。このように、MGBは重要な部位であるにもかかわらず



らず我々の研究ではArc陽性細胞は全く無かった。耳鳴研究でArcを評価している他の研究(32)(86)でもMGBへの言及は無く、染色されるのかも不明である。Arcと同様に神経可塑性マーカーとして用いられるc-FosはMGBで染色される(87)が、耳鳴に関する文献は存在しない。c-Fosは短期間の可塑的变化を示し、Arcはより長期的な可塑的变化を示すとされている(35)ため、MGBにおける変化が非常に速いためArcが検出されない可能性が考えられる。

### 一次聴覚野における神経可塑性変化

Au1はMGBからの投射を受ける。Au1は扁桃体外側核に投射するとともに、MGB、下丘、DCNなどにも下行性投射をしている(82)。一般的に、耳鳴が存在するときAu1は過活動状態でSFRが上昇しており、その際のAu1におけるArc発現は減少していると報告されている(37, 88)。Arc発現の減少は可塑性の低下を意味するので、これはAu1が過活動状態のまま変化しない状態と解釈されている(89)。本研究では、Au1のArc陽性細胞数はII～VI層全体での比較ではコントロール群で最も多く、耳鳴群で最も少ないという傾向であった(図25b)。Laへの投射が第II、IV層のみからである(68)ことを考慮し、第II、IV層の合計数でも比較したが、ほぼ同様の傾向を示し、耳鳴群でArc陽性細胞数は最も少ない傾向であった(図25b)。Au1におけるArc陽性細胞の分布を担当周波数領域別にグラフ化すると(図31a, b)、難聴群ではAu1後端から2.0 mmの領域でコントロール群よりArc陽性細胞数が多い傾向であった。耳鳴群では全領域で最もArc陽性細胞数が少ないが、特に1.2 mm, 2.0 mmの領域で最も少ない傾向であった。この領域は、難聴や耳鳴が存在する周波数を担当する領域も含まれている(図30)。したがって耳鳴群におけるArc陽性細胞数の低下傾向は、一般的に耳鳴の周波数は難聴の周波数に近似することと合わせ、難聴周波数領域における耳鳴の存在を示唆している。一方で、難聴群におけるArc陽性細胞数の低下傾向は、純粋に末梢からの入力低下によるものと考えられる。また、2.0 mmの領域でコントロール群より難聴群でArc陽性細胞数が多いことに関しては、難聴後に聴覚過敏(本研究では未評価)が存在するとArc陽性細胞がAu1で増

加することが知られている(70)ため、2.0 mm領域の担当する周波数で聴覚過敏が存在していた可能性がある。

### 海馬における神経可塑性変化

海馬は、聴覚連合野から直接あるいは前頭前皮質や扁桃体経由で間接的に聴覚情報を受け取っている(90)。逆に聴覚連合野は海馬CA1から直接投射を受けている。加えてAu1もCA1から直接投射を受けている(91)。聴覚情報に対する海馬の機能は、長期的な聴覚記憶の形成である。また、プレパルス抑制を通して驚愕刺激の調節にも関わっており(92)、海馬の灰白質が減少する統合失調症の患者ではプレパルス抑制が障害されることも知られている(93)。加齢性難聴や、音響外傷の動物モデルでは、海馬内のシナプス変性や神経細胞の新生障害が報告されている(94, 95)ことから、GAPを行う際には必ずPPIも組み合わせて実施し、PPIが正常であることを確認する必要がある。本研究ではGAPを実施する前にPPIを実施し、全期間で正常範囲内であることを確認している (図20c)。

DGにおいて、各群でArc陽性細胞数を比較すると耳鳴群が最も多く、次いで難聴群が多かった (図25b, e)。CA1ではArc陽性細胞のほとんどが腹側領域であり、Baと直接連絡する領域(68)であった。各群でArc陽性細胞数を比較すると難聴群・耳鳴群がコントロール群より明らかに多く、特に耳鳴群とコントロール群間で有意差を認めた ( $P<0.05$ )。コントロール群と比べて難聴群でも有意差は無いものの増加傾向を示しており、難聴だけでも辺縁系に影響を与えている可能性がある。

### 扁桃体における神経可塑性変化

C2 (コントロール群)、N1 (難聴群)、N11 (耳鳴群)での比較 (図25a)ではLaにおけるArc陽性細胞は、コントロール群と耳鳴群において同程度で難聴群では少なかった。Laに入力するのはAu1の第II、IV層とMGBであることから、Au1の第II、IV層における難聴群と耳鳴群でのArc陽性細胞数の差が関係している可能性がある。BaにおけるArc陽性細胞数は、コントロ

ール群で最も少なく、最も多かったのは耳鳴群であった。Baは海馬と相互に連絡しているため、耳鳴群の海馬CA1における有意なArc陽性細胞の増加と関係している可能性がある。ABaにおいてもコントロール群で最も少なく、難聴群・耳鳴群で多い傾向であった。La、Ba、ABaをBLCとしてまとめて比較するとArc陽性細胞がコントロール群で最も少なく、耳鳴群で最も多い結果となった。これは、各群3例ずつでの比較 (図25b, d)でも同様の傾向であった。よって耳鳴群は、BLCを通して海馬や前頭前皮質などへ強い影響を与えていることが想定される。

Ceは情動反応や自律神経系などへの出力を担う領域だが、Arc陽性細胞は極端に少なかった。この結果は耳鳴を発生させる音響外傷を与えたスナネズミで、音響外傷直後にCeでArcやc-Fos陽性細胞が著明に増加していたという報告(32)と大きく異なるが、我々の研究における評価時期はLISW暴露4週後であり、断頭する時期が全く異なるため比較はできない。Ceが自律神経系への出力を伴う部位であることを考慮すると、音響外傷直後に活動性が増すのは当然と思われる。Ceでの神経可塑性が低いということは、耳鳴が存在していても、自律神経系や情動反応には変化がない状態と考えられる。

2013年にSingerらが発表した論文では、同程度の音響外傷を与えたラットのうち、耳鳴のない個体と耳鳴のある個体でArcの発現を比較しており、耳鳴がある個体ではCA1、扁桃体基底外側核でArc発現が減少していたと報告している(86)。Ba、LaのArc陽性細胞数は我々の結果と異なるが、音響外傷モデルと爆傷モデルの違いに加え、耳鳴の評価法がGAPではないことや、Singerらの評価時期が音響外傷後2週であることから異なる反応を示した可能性がある。

### 爆傷による耳鳴発生には辺縁系が関与している

難聴群はコントロール群と比較して、蝸牛神経核・下丘・海馬 CA1 で Arc 陽性細胞数が増加し、Au1 で減少していた (図 35)。Arc 陽性細胞数の差は難聴の影響と考えられるため、

これらの結果は難聴が聴覚伝導路のみならず辺縁系にも影響を与えている証拠と考えられる。

また、耳鳴群は難聴群と比較して、蝸牛神経核・BLCでArc陽性細胞数が増加し、下丘・Au1において低下していた(図36)。耳鳴群と難聴群間の差は耳鳴の影響と考えられるため、詳しいメカニズムは未だ不明だが、耳鳴もまた辺縁系に関与しているという証拠と考えられる。今回は評価していないが、ノイズ(耳鳴)キャンセル機構と考えられているBa→側坐核→視床網様核→MGBからなるネットワーク(96)に関与しているかもしれない。通常は不快な音(耳鳴)を持続的に自覚すると、Baからの投射により側坐核のセロトニン作動性ニューロンが興奮し、視床網様核の抑制性のGABA作動性ニューロンを興奮させ(82)、MGBを強力に抑制すると言われており(96)、何らかの影響でこのネットワークが働かないことが耳鳴につながっている可能性がある。

今回、詳細な中枢の解析が可能なラット難聴・耳鳴モデルを確立したため、将来的にはArc発現だけでなく、ニューロンの分別、聴覚伝導路や辺縁系におけるSFRの測定を行うことで、詳細な耳鳴発生メカニズムを解明できると考えられる。

## 5 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。

## 6 謝辞

御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校解剖学講座 小林靖教授、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いた防衛医科大学校耳鼻咽喉科学講座 水足邦雄講師、解剖学講座 松井利康助教、薬理学講座 佐藤泰司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、そして防衛医科大学校解剖学講座諸先生および耳鼻咽喉科学講座教室員諸先生、実験助手の渡辺まゆみさんに深く感謝の意を表します。

## 付記

本研究の一部は下記の学会において発表した。

- ・ 第 23 回日本耳科学会総会・学術講演会（2013 年 11 月、宮崎）
- ・ 第 24 回日本耳科学会総会・学術講演会（2014 年 10 月、新潟）
- ・ Association for Research in Otolaryngology The 38st Annual MidWinter Meeting（2015 年 2 月、ボルチモア、メリーランド州、米国）
- ・ 第 38 回日本神経科学大会（2015 年 7 月、神戸）
- ・ 第 25 回日本耳科学会総会・学術講演会（2015 年 10 月、長崎）
- ・ Association for Research in Otolaryngology The 39st Annual MidWinter Meeting（2016 年 2 月、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国）
- ・ 第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会（2016 年 3 月、郡山）
- ・ Japan-US Forum on blast injury 2016（2016 年 6 月、東京）

本研究の一部は、Scientific Reports. 6, 31754 (2016)に掲載された。

## 引用文献

1. DePalma RG, Burris DG, Champion HR, Hodgson MJ. Blast injuries. *N Engl J Med*. 2005;352(13):1335-42.
2. Wolf SJ, Bebarta VS, Bonnett CJ, Pons PT, Cantrill SV. Blast injuries. *Lancet*. 2009;374(9687):405-15.
3. Owens BD, Kragh JF, Jr., Wenke JC, Macaitis J, Wade CE, Holcomb JB. Combat wounds in operation Iraqi Freedom and operation Enduring Freedom. *J Trauma*. 2008;64(2):295-9.
4. Gondusky JS, Reiter MP. Protecting military convoys in Iraq: an examination of battle injuries sustained by a mechanized battalion during Operation Iraqi Freedom II. *Mil Med*. 2005;170(6):546-9.
5. Remenschneider AK, Lookabaugh S, Aliphass A, Brodsky JR, Devaiah AK, Dagher W, et al. Otologic outcomes after blast injury: the Boston Marathon experience. *Otol Neurotol*. 2014;35(10):1825-34.
6. Lew HL, Jerger JF, Guillory SB, Henry JA. Auditory dysfunction in traumatic brain injury. *J Rehabil Res Dev*. 2007;44(7):921-8.
7. Jia S, Yang S, Guo W, He DZ. Fate of mammalian cochlear hair cells and stereocilia after loss of the stereocilia. *J Neurosci*. 2009;29(48):15277-85.
8. Halford JB, Anderson SD. Anxiety and depression in tinnitus sufferers. *J Psychosom Res*. 1991;35(4-5):383-90.
9. Langguth B. A review of tinnitus symptoms beyond 'ringing in the ears': a call to action. *Curr Med Res Opin*. 2011;27(8):1635-43.
10. Turner O, Windfuhr K, Kapur N. Suicide in deaf populations: a literature review. *Ann Gen Psychiatry*. 2007;6:26.
11. Mao JC, Pace E, Pierozynski P, Kou Z, Shen Y, VandeVord P, et al. Blast-induced tinnitus and hearing loss in rats: behavioral and imaging assays. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(2):430-44.
12. Adjamian P, Sereda M, Hall DA. The mechanisms of tinnitus: perspectives from human functional neuroimaging. *Hear Res*. 2009;253(1-2):15-31.
13. Eggermont JJ, Roberts LE. The neuroscience of tinnitus. *Trends Neurosci*. 2004;27(11):676-82.
14. Roberts LE, Eggermont JJ, Caspary DM, Shore SE, Melcher JR, Kaltenbach JA. Ringing ears: the neuroscience of tinnitus. *J Neurosci*. 2010;30(45):14972-9.
15. Kaltenbach JA. Tinnitus: Models and mechanisms. *Hear Res*. 2011;276(1-2):52-60.
16. Kimura M, Eggermont JJ. Effects of acute pure tone induced hearing loss on response properties in three auditory cortical fields in cat. *Hear Res*. 1999;135(1-2):146-62.
17. Komiya H, Eggermont JJ. Spontaneous firing activity of cortical neurons in adult cats with reorganized tonotopic map following pure-tone trauma. *Acta Otolaryngol*. 2000;120(6):750-6.

18. Norena AJ, Eggermont JJ. Enriched acoustic environment after noise trauma reduces hearing loss and prevents cortical map reorganization. *J Neurosci.* 2005;25(3):699-705.
19. Seki S, Eggermont JJ. Changes in spontaneous firing rate and neural synchrony in cat primary auditory cortex after localized tone-induced hearing loss. *Hear Res.* 2003;180(1-2):28-38.
20. Brozoski TJ, Bauer CA, Caspary DM. Elevated fusiform cell activity in the dorsal cochlear nucleus of chinchillas with psychophysical evidence of tinnitus. *J Neurosci.* 2002;22(6):2383-90.
21. Kaltenbach JA, McCaslin DL. Increases in Spontaneous Activity in the Dorsal Cochlear Nucleus Following Exposure to High Intensity Sound: A Possible Neural Correlate of Tinnitus. 1996;3(1):57-78.
22. Kaltenbach JA, Godfrey DA, Neumann JB, McCaslin DL, Afman CE, Zhang J. Changes in spontaneous neural activity in the dorsal cochlear nucleus following exposure to intense sound: relation to threshold shift. *Hear Res.* 1998;124(1-2):78-84.
23. Kaltenbach JA, Afman CE. Hyperactivity in the dorsal cochlear nucleus after intense sound exposure and its resemblance to tone-evoked activity: a physiological model for tinnitus. *Hear Res.* 2000;140(1-2):165-72.
24. Bauer CA, Turner JG, Caspary DM, Myers KS, Brozoski TJ. Tinnitus and inferior colliculus activity in chinchillas related to three distinct patterns of cochlear trauma. *Journal of neuroscience research.* 2008;86(11):2564-78.
25. Mulders WH, Robertson D. Hyperactivity in the auditory midbrain after acoustic trauma: dependence on cochlear activity. *Neuroscience.* 2009;164(2):733-46.
26. Chen GD, Jastreboff PJ. Salicylate-induced abnormal activity in the inferior colliculus of rats. *Hear Res.* 1995;82(2):158-78.
27. Finlayson PG, Kaltenbach JA. Alterations in the spontaneous discharge patterns of single units in the dorsal cochlear nucleus following intense sound exposure. *Hear Res.* 2009;256(1-2):104-17.
28. Liberman MC, Kiang NY. Acoustic trauma in cats. Cochlear pathology and auditory-nerve activity. *Acta Otolaryngol Suppl.* 1978;358:1-63.
29. Norena AJ, Eggermont JJ. Changes in spontaneous neural activity immediately after an acoustic trauma: implications for neural correlates of tinnitus. *Hear Res.* 2003;183(1-2):137-53.
30. Wu C, Martel DT, Shore SE. Increased Synchrony and Bursting of Dorsal Cochlear Nucleus Fusiform Cells Correlate with Tinnitus. *J Neurosci.* 2016;36(6):2068-73.
31. Eggermont JJ, Roberts LE. The neuroscience of tinnitus: understanding abnormal and normal auditory perception. *Front Syst Neurosci.* 2012;6:53.
32. Mahlke C, Wallhausser-Franke E. Evidence for tinnitus-related plasticity in the auditory and limbic system, demonstrated by arg3.1 and c-fos immunocytochemistry. *Hear Res.* 2004;195(1-2):17-34.

33. Tzingounis AV, Nicoll RA. Arc/Arg3.1: linking gene expression to synaptic plasticity and memory. *Neuron*. 2006;52(3):403-7.
34. Wallhausser-Franke E, Mahlke C, Oliva R, Braun S, Wenz G, Langner G. Expression of c-fos in auditory and non-auditory brain regions of the gerbil after manipulations that induce tinnitus. *Exp Brain Res*. 2003;153(4):649-54.
35. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, et al. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci*. 2000;20(11):3993-4001.
36. Gao M, Sossa K, Song L, Errington L, Cummings L, Hwang H, et al. A specific requirement of Arc/Arg3.1 for visual experience-induced homeostatic synaptic plasticity in mouse primary visual cortex. *J Neurosci*. 2010;30(21):7168-78.
37. Tan J, Ruttiger L, Panford-Walsh R, Singer W, Schulze H, Kilian SB, et al. Tinnitus behavior and hearing function correlate with the reciprocal expression patterns of BDNF and Arg3.1/arc in auditory neurons following acoustic trauma. *Neuroscience*. 2007;145(2):715-26.
38. Paul AK, Lobarinas E, Simmons R, Wack D, Luisi JC, Sperryak J, et al. Metabolic imaging of rat brain during pharmacologically-induced tinnitus. *Neuroimage*. 2009;44(2):312-8.
39. Lanting CP, de Kleine E, van Dijk P. Neural activity underlying tinnitus generation: results from PET and fMRI. *Hear Res*. 2009;255(1-2):1-13.
40. Melcher JR, Levine RA, Bergevin C, Norris B. The auditory midbrain of people with tinnitus: abnormal sound-evoked activity revisited. *Hear Res*. 2009;257(1-2):63-74.
41. Leaver AM, Seydell-Greenwald A, Rauschecker JP. Auditory-limbic interactions in chronic tinnitus: Challenges for neuroimaging research. *Hear Res*. 2016;334:49-57.
42. Middleton JW, Tzounopoulos T. Imaging the neural correlates of tinnitus: a comparison between animal models and human studies. *Front Syst Neurosci*. 2012;6:35.
43. Wang H, Brozoski TJ, Turner JG, Ling L, Parrish JL, Hughes LF, et al. Plasticity at glycinergic synapses in dorsal cochlear nucleus of rats with behavioral evidence of tinnitus. *Neuroscience*. 2009;164(2):747-59.
44. Bauer CA, Brozoski TJ, Rojas R, Boley J, Wyder M. Behavioral model of chronic tinnitus in rats. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;121(4):457-62.
45. Guitton MJ, Caston J, Ruel J, Johnson RM, Pujol R, Puel JL. Salicylate induces tinnitus through activation of cochlear NMDA receptors. *J Neurosci*. 2003;23(9):3944-52.
46. Heffner HE, Harrington IA. Tinnitus in hamsters following exposure to intense sound. *Hear Res*. 2002;170(1-2):83-95.
47. Jastreboff PJ, Brennan JF, Coleman JK, Sasaki CT. Phantom auditory sensation in rats: an animal model for tinnitus. *Behav Neurosci*. 1988;102(6):811-22.

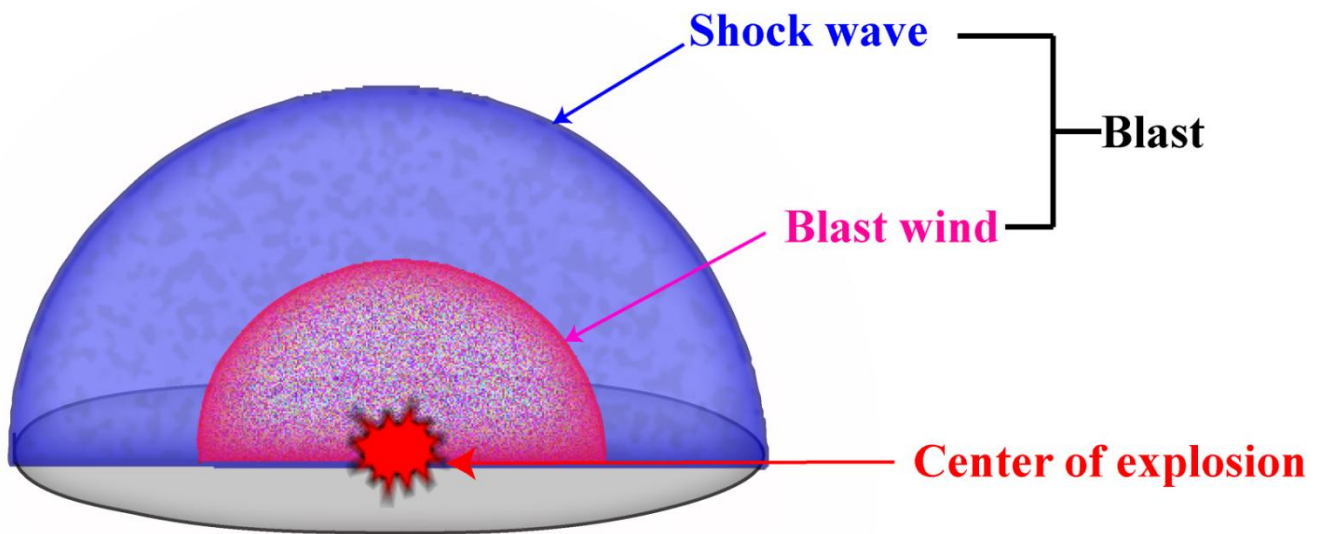


48. Ruttiger L, Ciuffani J, Zenner HP, Knipper M. A behavioral paradigm to judge acute sodium salicylate-induced sound experience in rats: a new approach for an animal model on tinnitus. *Hear Res.* 2003;180(1-2):39-50.
49. Turner JG, Brozoski TJ, Bauer CA, Parrish JL, Myers K, Hughes LF, et al. Gap detection deficits in rats with tinnitus: a potential novel screening tool. *Behav Neurosci.* 2006;120(1):188-95.
50. Sato S, Kawauchi S, Okuda W, Nishidate I, Nawashiro H, Tsumatori G. Real-time optical diagnosis of the rat brain exposed to a laser-induced shock wave: observation of spreading depolarization, vasoconstriction and hypoxemia-oligemia. *PLoS One.* 2014;9(1):e82891.
51. Sung-II Cho1, Simon S. Gao1,3, Anping Xia1, Rosalie Wang1, Felipe T. Salles1, Patrick D. Raphael1,, Homer Abaya1 JW, Jongmin Baek4, David Jacobs4, Matthew N. Rasband5,, Oghalai1\* JS. <Mechanisms of Hearing Loss after Blast Injury to the Ear.pdf>. *PLoS One.* 2013;8(7).
52. Perez R, Gatt N, Cohen D. Audiometric configurations following exposure to explosions. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126(10):1249-52.
53. Persaud R, Hajioff D, Wareing M, Chevretton E. Otolological trauma resulting from the Soho Nail Bomb in London, April 1999. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2003;28(3):203-6.
54. Kurioka T, Matsunobu T, Niwa K, Tamura A, Kawauchi S, Satoh Y, et al. Characteristics of laser-induced shock wave injury to the inner ear of rats. *J Biomed Opt.* 2014;19(12):125001.
55. Matsumoto Y, Hatano B, Matsushita Y, Nawashiro H, Shima K. [The characteristics of blast traumatic brain injury]. *No Shinkei Geka.* 2010;38(8):695-702.
56. Satoh Y, Sato S, Saitoh D, Tokuno S, Hatano B, Shimokawaji T, et al. Pulmonary blast injury in mice: a novel model for studying blast injury in the laboratory using laser-induced stress waves. *Lasers in surgery and medicine.* 2010;42(4):313-8.
57. 小川郁. よくわかる聴覚障害. 2010:10-9.
58. Kraus KS, Canlon B. Neuronal connectivity and interactions between the auditory and limbic systems. Effects of noise and tinnitus. *Hear Res.* 2012;288(1-2):34-46.
59. Kujawa SG, Liberman MC. Adding insult to injury: cochlear nerve degeneration after "temporary" noise-induced hearing loss. *J Neurosci.* 2009;29(45):14077-85.
60. Viberg A, Canlon B. The guide to plotting a cochleogram. *Hear Res.* 2004;197(1-2):1-10.
61. Swerdlow NR, Geyer MA, Braff DL. Neural circuit regulation of prepulse inhibition of startle in the rat: current knowledge and future challenges. *Psychopharmacology (Berl).* 2001;156(2-3):194-215.
62. Buchwald JS, Huang C. Far-field acoustic response: origins in the cat. *Science.* 1975;189(4200):382-4.
63. Liberman MC, Dodds LW, Pierce S. Afferent and efferent innervation of the cat cochlea: quantitative analysis with light and electron microscopy. *J Comp Neurol.* 1990;301(3):443-60.
64. Nayak GD, Ratnayaka HS, Goodyear RJ, Richardson GP. Development of the hair bundle and mechanotransduction. *Int J Dev Biol.* 2007;51(6-7):597-608.

65. Hudspeth AJ. Making an effort to listen: mechanical amplification in the ear. *Neuron*. 2008;59(4):530-45.
66. Ryan AF, Furlow Z, Woolf NK, Keithley EM. The spatial representation of frequency in the rat dorsal cochlear nucleus and inferior colliculus. *Hear Res*. 1988;36(2-3):181-9.
67. Doucet JR, Ryugo DK. Projections from the ventral cochlear nucleus to the dorsal cochlear nucleus in rats. *J Comp Neurol*. 1997;385(2):245-64.
68. Sah P, Faber ES, Lopez De Armentia M, Power J. The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol Rev*. 2003;83(3):803-34.
69. Doron NN, Ledoux JE, Semple MN. Redefining the tonotopic core of rat auditory cortex: physiological evidence for a posterior field. *J Comp Neurol*. 2002;453(4):345-60.
70. Meconi A, Lui E, Marrone DF. Sustained Arc expression in adult-generated granule cells. *Neuroscience letters*. 2015;603:66-70.
71. Pikkarainen M, Pitkanen A. Projections from the lateral, basal and accessory basal nuclei of the amygdala to the perirhinal and postrhinal cortices in rat. *Cereb Cortex*. 2001;11(11):1064-82.
72. Hamernik RP, Turrentine G, Roberto M, Salvi R, Henderson D. Anatomical correlates of impulse noise-induced mechanical damage in the cochlea. *Hear Res*. 1984;13(3):229-47.
73. Hamernik RP, Turrentine G, Wright CG. Surface morphology of the inner sulcus and related epithelial cells of the cochlea following acoustic trauma. *Hear Res*. 1984;16(2):143-60.
74. Schaette R, McAlpine D. Tinnitus with a normal audiogram: physiological evidence for hidden hearing loss and computational model. *J Neurosci*. 2011;31(38):13452-7.
75. Plack CJ, Barker D, Prendergast G. Perceptual consequences of "hidden" hearing loss. *Trends Hear*. 2014;18.
76. Schaette R, Turtle C, Munro KJ. Reversible induction of phantom auditory sensations through simulated unilateral hearing loss. *PLoS One*. 2012;7(6):e35238.
77. Hickox AE, Liberman MC. Is noise-induced cochlear neuropathy key to the generation of hyperacusis or tinnitus? *J Neurophysiol*. 2014;111(3):552-64.
78. Wang H, Yin S, Yu Z, Huang Y, Wang J. Dynamic changes in hair cell stereocilia and cochlear transduction after noise exposure. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;409(4):616-21.
79. Liberman MC. Chronic ultrastructural changes in acoustic trauma: serial-section reconstruction of stereocilia and cuticular plates. *Hear Res*. 1987;26(1):65-88.
80. Luo H, Pace E, Zhang X, Zhang J. Blast-Induced tinnitus and spontaneous firing changes in the rat dorsal cochlear nucleus. *Journal of neuroscience research*. 2014.
81. Luo H, Pace E, Zhang X, Zhang J. Blast-induced tinnitus and spontaneous activity changes in the rat inferior colliculus. *Neuroscience letters*. 2014.
82. Paxinos G. *The Rat Nervous System*. 2004:997-1082.

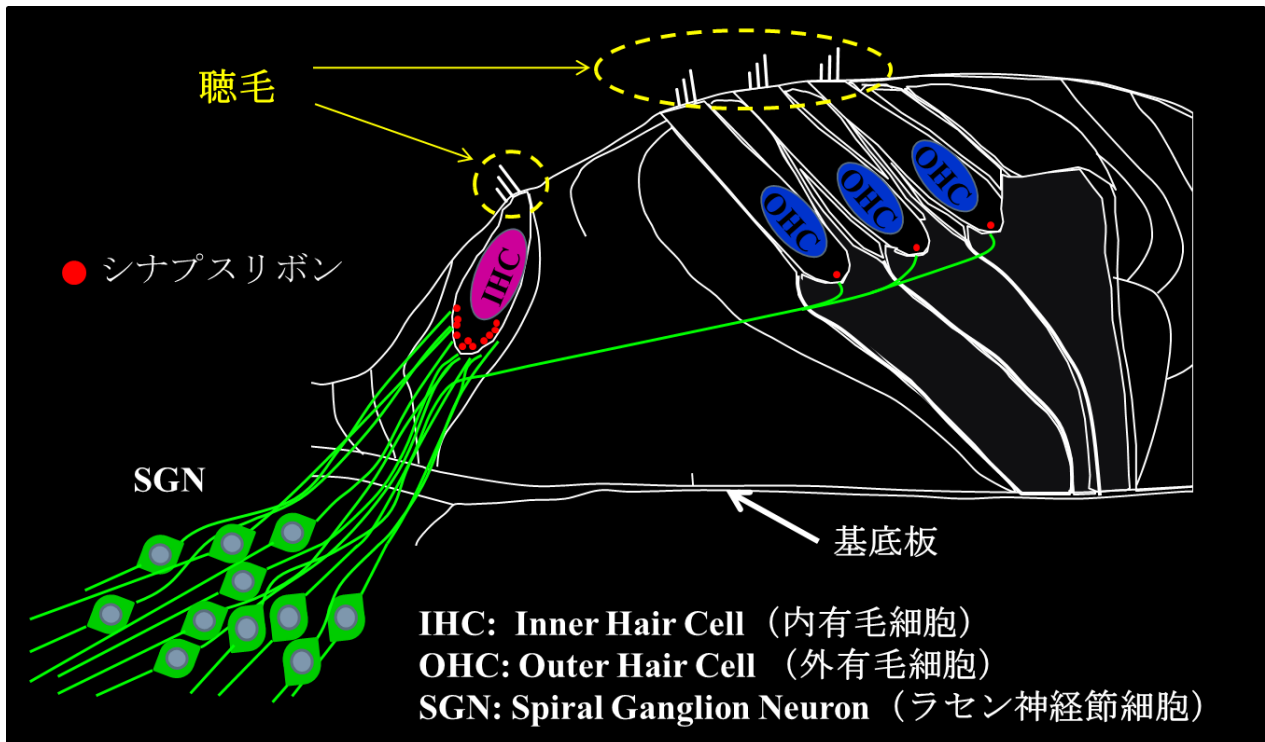
83. Ito T, Oliver DL. The basic circuit of the IC: tectothalamic neurons with different patterns of synaptic organization send different messages to the thalamus. *Front Neural Circuits*. 2012;6:48.
84. Saldana E, Feliciano M, Mugnaini E. Distribution of descending projections from primary auditory neocortex to inferior colliculus mimics the topography of intracollicular projections. *J Comp Neurol*. 1996;371(1):15-40.
85. Winer JA, Kelly JB, Larue DT. Neural architecture of the rat medial geniculate body. *Hear Res*. 1999;130(1-2):19-41.
86. Singer W, Zuccotti A, Jaumann M, Lee SC, Panford-Walsh R, Xiong H, et al. Noise-induced inner hair cell ribbon loss disturbs central arc mobilization: a novel molecular paradigm for understanding tinnitus. *Mol Neurobiol*. 2013;47(1):261-79.
87. Guo YP, Sun X, Li C, Wang NQ, Chan YS, He J. Corticothalamic synchronization leads to c-fos expression in the auditory thalamus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11802-7.
88. Panford-Walsh R, Singer W, Ruttiger L, Hadjab S, Tan J, Geisler HS, et al. Midazolam reverses salicylate-induced changes in brain-derived neurotrophic factor and arg3.1 expression: implications for tinnitus perception and auditory plasticity. *Mol Pharmacol*. 2008;74(3):595-604.
89. Eggermont JJ. The Neuroscience of Tinnitus. 2012:195-216.
90. Munoz-Lopez MM, Mohedano-Moriano A, Insausti R. Anatomical pathways for auditory memory in primates. *Front Neuroanat*. 2010;4:129.
91. Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain Res Rev*. 2007;56(1):1-26.
92. Shoemaker JM, Saint Marie RL, Bongiovanni MJ, Neary AC, Tochen LS, Swerdlow NR. Prefrontal D1 and ventral hippocampal N-methyl-D-aspartate regulation of startle gating in rats. *Neuroscience*. 2005;135(2):385-94.
93. Kumari V, Antonova E, Zachariah E, Galea A, Aasen I, Ettinger U, et al. Structural brain correlates of prepulse inhibition of the acoustic startle response in healthy humans. *Neuroimage*. 2005;26(4):1052-8.
94. Yu YF, Zhai F, Dai CF, Hu JJ. The relationship between age-related hearing loss and synaptic changes in the hippocampus of C57BL/6J mice. *Exp Gerontol*. 2011;46(9):716-22.
95. Kraus KS, Mitra S, Jimenez Z, Hinduja S, Ding D, Jiang H, et al. Noise trauma impairs neurogenesis in the rat hippocampus. *Neuroscience*. 2010;167(4):1216-26.
96. Rauschecker JP, Leaver AM, Muhlau M. Tuning out the noise: limbic-auditory interactions in tinnitus. *Neuron*. 2010;66(6):819-26.

図1 Blast の概念図



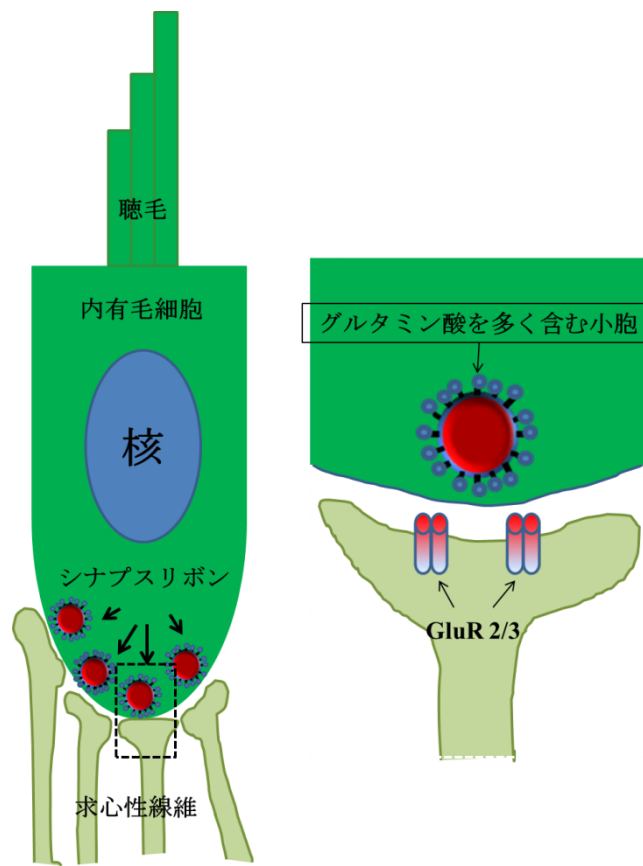
超音速の Shock wave と、それに引っ張られるようにして生じる Blast wind を合わせて Blast と呼ぶ。

図2 内耳の構造



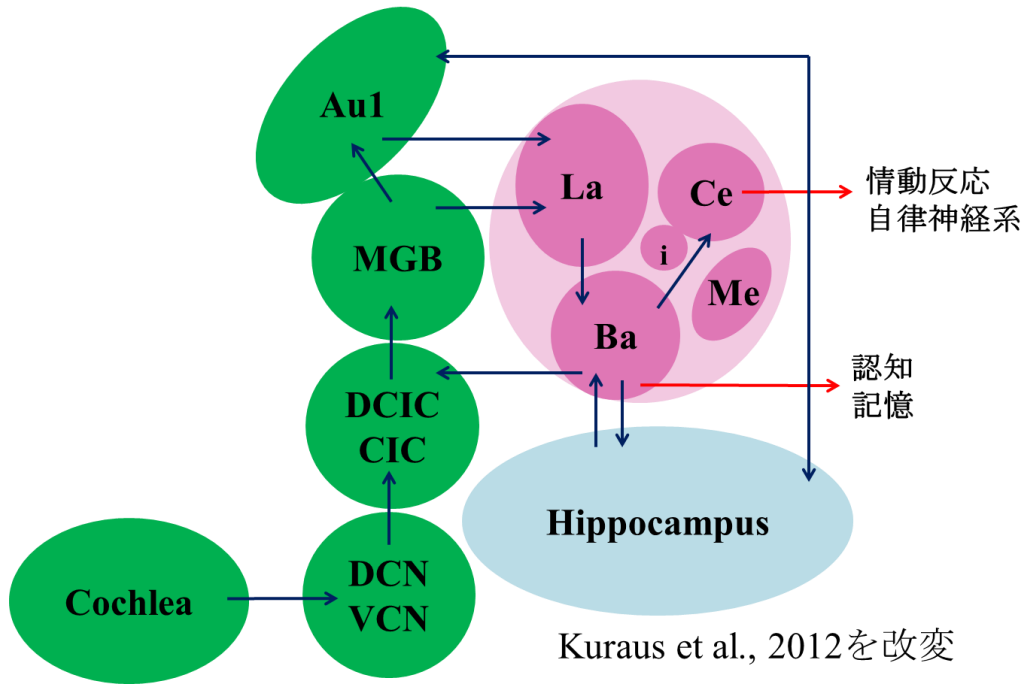
1 列の IHC と 3 列の OHC には、それぞれ下方にシナプスリボンが存在する。シナプスリボンは SGN と有毛細胞間のシナプスの有毛細胞内に存在しており、IHC には正常で約 18~20 個程度、OHC には 1 個ずつ存在する。各有毛細胞の頂部には 3 列の聴毛が整然と並んでいる。また、SGN の 95% が IHC とシナプスを形成しており、聴覚情報のほとんどが IHC 由来であることがわかる。ただし、OHC は Active process という重要な役割を担っており、OHC の障害もまた難聴を来す。

図3 内毛細胞とラセン神経節細胞間のシナプス構造



IHC のシナプスリボンは求心性線維と 1:1 の比率で存在し、ラットでは 1 個の内毛細胞に対して正常では 18-20 個程度存在する。

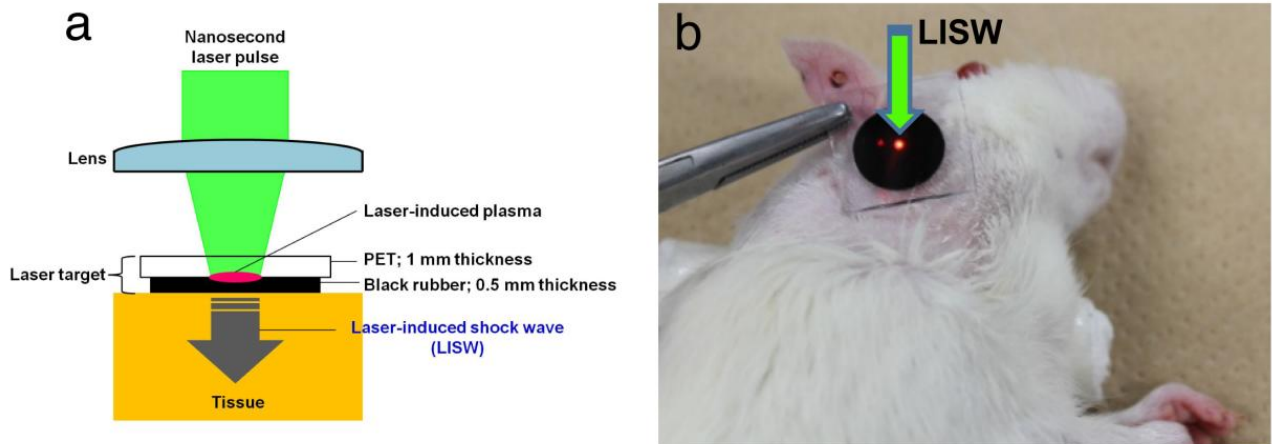
図4 内耳・聴覚中枢・辺縁系の関係



- DCN:** Dorsal cochlear nucleus : 背側蝸牛神経核
- VCN:** Ventral cochlear nucleus : 腹側蝸牛神経核
- CIC:** Central nucleus of inferior colliculus : 下丘中心核
- DCIC:** Dorsal cortex inferior colliculus : 下丘背側核
- MGB:** Medial geniculate body : 内側膝状体
- Au1:** Primary auditory cortex : 一次聴覚野
- B:** Basal amygdaloid nucleus : 扁桃体基底核
- L:** Lateral amygdaloid nucleus : 扁桃体外側核
- C:** Central amygdaloid nucleus : 扁桃体中心核
- M:** Medial amygdalod nucleus : 扁桃体内側核
- i:** intercalated cell : 介在細胞

聴覚情報は内耳から蝸牛神経核、下丘、MGB、Au1 に Tonotopic map に従って投射している。下丘、MGB、Au1 は扁桃体と連絡しており、扁桃体はさらに海馬と連絡している。

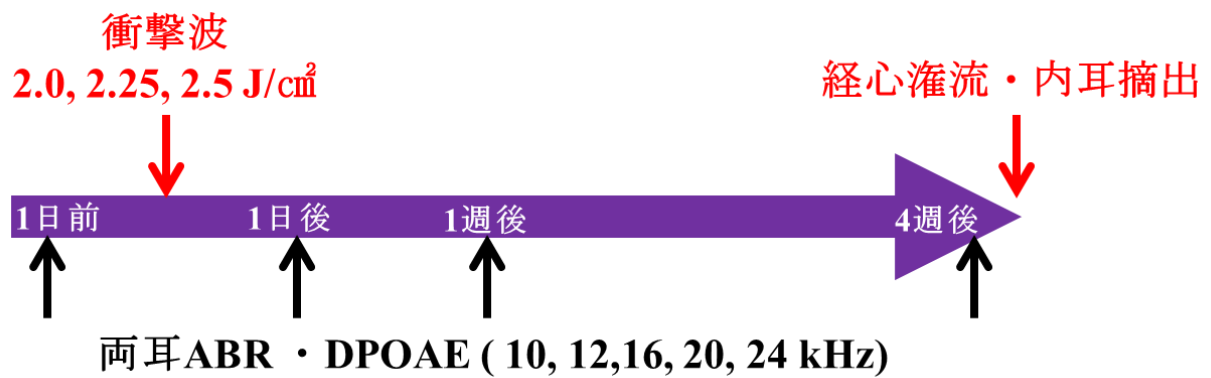
図 5 LISW の原理と照射方法



**a**, レーザーパルスが黒色ゴムの密着した PET 製のターゲットに照射されると、黒色ゴムと PET の間にプラズマが発生する。すると黒色ゴム直下に衝撃波が発生し組織を傷害する。レーザーパルスの照射サイズはレンズを通すことで調整可能となっている。**b**, 剃毛したラットの右耳後部にターゲットを密着させレーザーを照射する。触診にて中耳骨胞を確認し、レーザーの照射角度が中耳骨胞面に垂直になるようにする必要がある。また、ガイド光があるため安全かつ確実にターゲットに照射することが可能である。

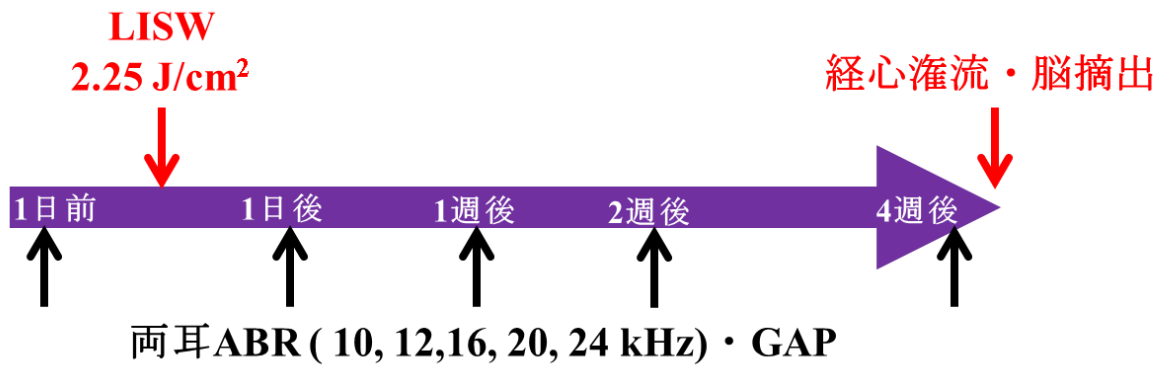


図6 実験1 “内耳爆傷による末梢の変化” のスケジュール



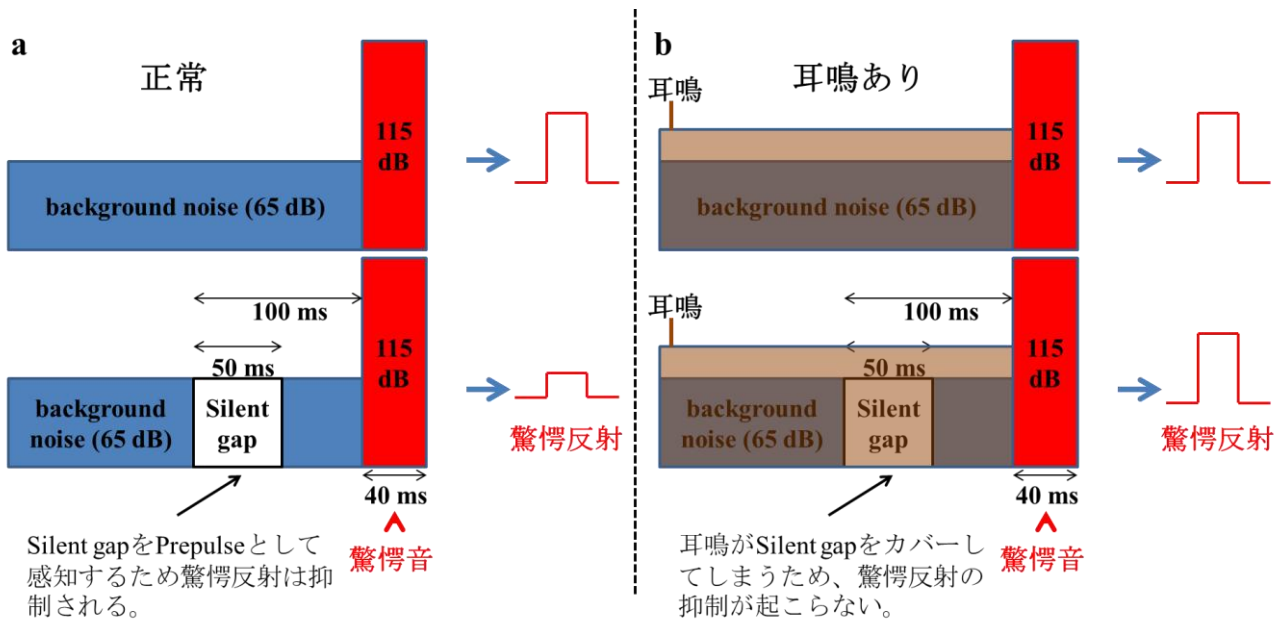
ラットの右耳後部にLISWを暴露させる1日前に両耳のABRとDPOAEを実施しておく。  
LISW暴露後は1日後、1週間後、4週間後に聴力評価を実施し最後に経心灌流固定をして内耳を摘出した。

図7 実験2 “ラット耳鳴モデルにおける聴覚中枢、辺縁系の変化” のスケジュール



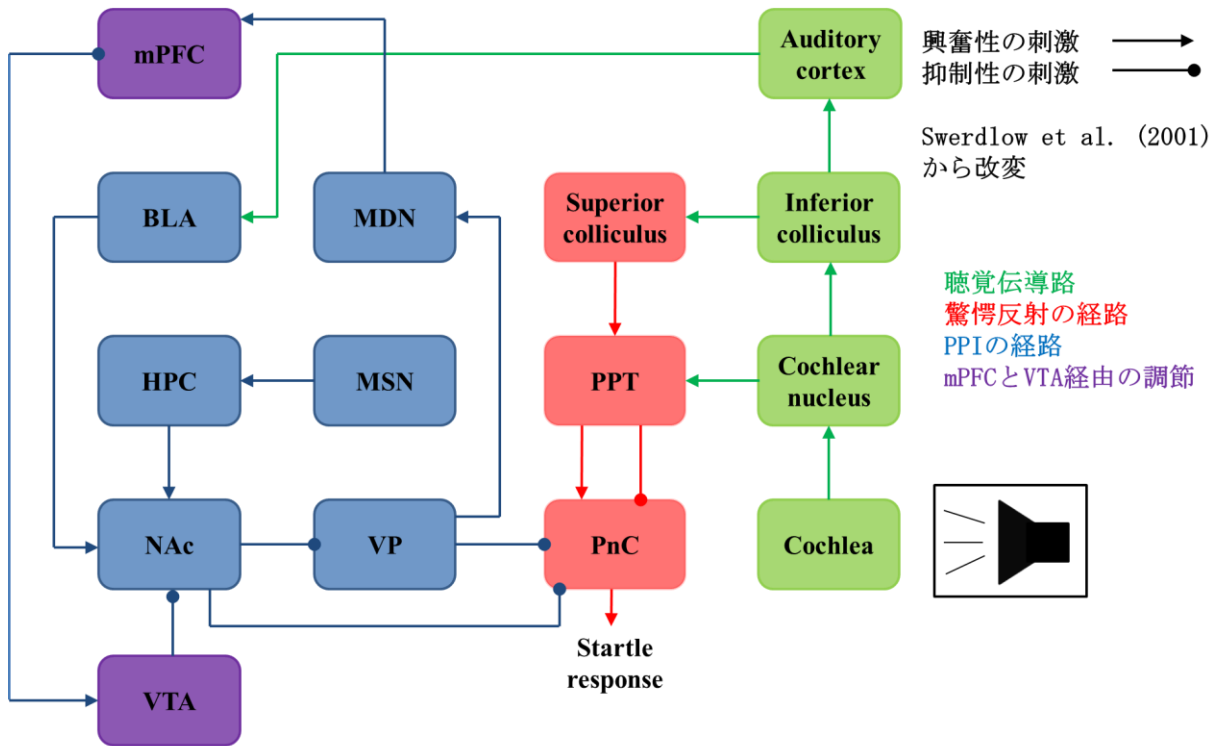
LISW 暴露の1日前、1日後、1週後、2週後、4週後にラット両耳の ABR 閾値測定と GAP を実施した。4週後に経心灌流固定後脳を摘出した。

図 8 Gap detection test (GAP)の原理



青は環境音 (background noise)を示し、赤は驚愕音を示しておりそれぞれ 65 dB と 115 dB の音圧である。**a** 上段のように、正常なラットだと驚愕音を突然与えると驚愕反射が惹起される。そして**a** 下段のように驚愕音の直前に弱い刺激 (Prepulse)として 50 ms の無音時間 (silent gap)を与えると、プレパルス抑制が起き、驚愕反射が抑制される。ところが**b** 下段のように、ラットに耳鳴があると、耳鳴のために silent gap を感知できず、そのまま驚愕反射が惹起されてしまう。この差を利用してラットの耳鳴を評価するのが GAP である。

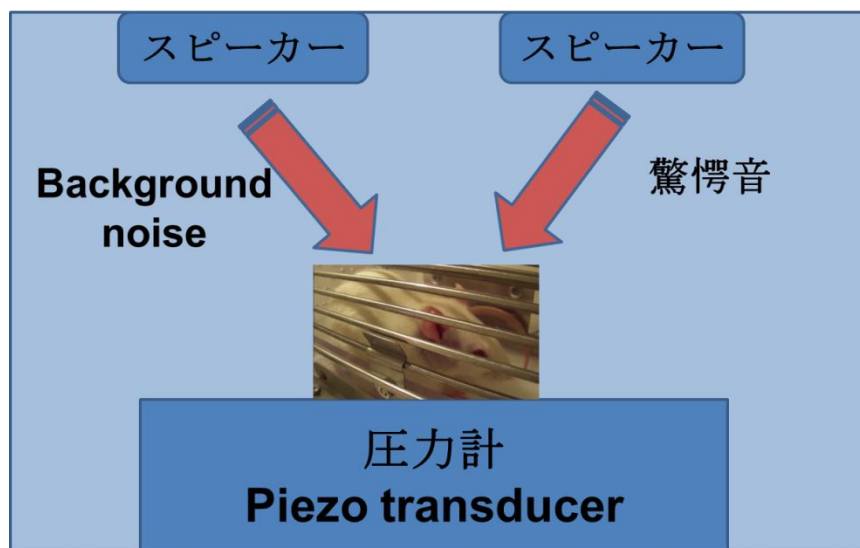
図9 驚愕反射とプレパルス抑制の関与する経路と聴覚伝導路との関係



BLA; Basolateral amygdala (扁桃体基底外側核)  
 HPC; Hippocampus (海馬)  
 MDN; Mediodorsal thalamic nucleus (視床背内側核)  
 mPFC; Medial prefrontal cortex (内側前頭前皮質)  
 MSN; Medial septal nucleus (内側中隔核)  
 NAc; Nucleus accumbens (側坐核)  
 PPT; Pedunculopontine tegmental nucleus (脚橋被蓋核)  
 PnC; Nucleus reticularis pontis caudalis (尾側橋網様核)  
 VP; Ventral pallidum (腹側淡蒼球)  
 VTA; Ventral tegmental area (腹側被蓋野)

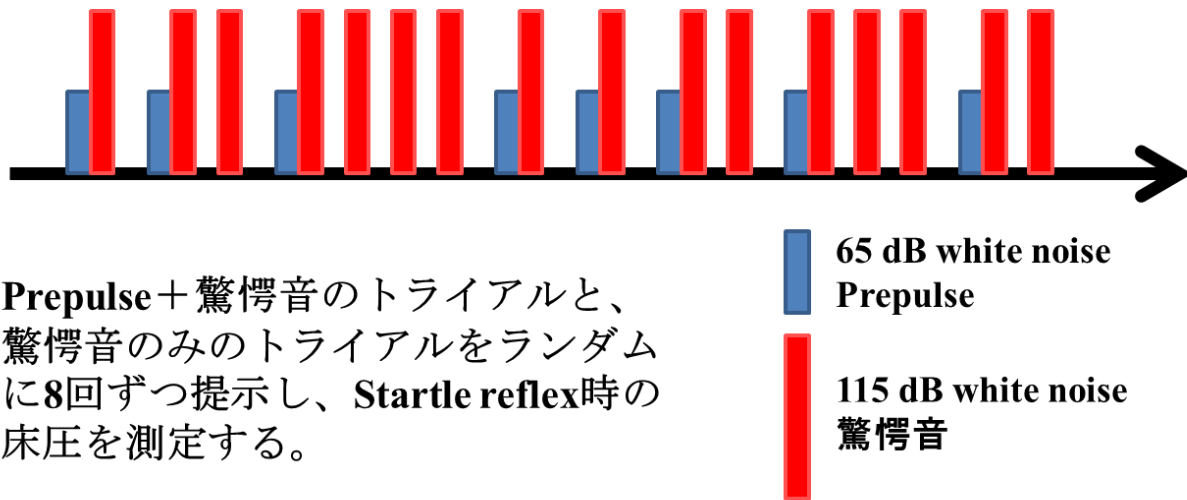
赤で示された驚愕反射の経路は聴覚伝導路から上丘、脚橋被蓋核、尾側橋網様核を経由している。青で示されたプレパルス抑制の経路は辺縁系も関わっているため、辺縁系に異常のある個体ではプレパルス抑制が通常通り起こらない。そのため、Gap detection test (GAP)を行う際は必ず Prepulse Inhibition test (PPI)も実施し、正常にプレパルス抑制が観察されるか評価する必要がある。

図 10 PPI、GAP に使用する装置の概念図



天井に環境音と驚愕音を出す2種類のスピーカーを備えた防音箱の中で測定する。ラットが入るケージの床が圧力計となっており、驚愕反射時の床にかかる圧力を測定する。

図 11 Prepulse Inhibition test (PPI)の概要

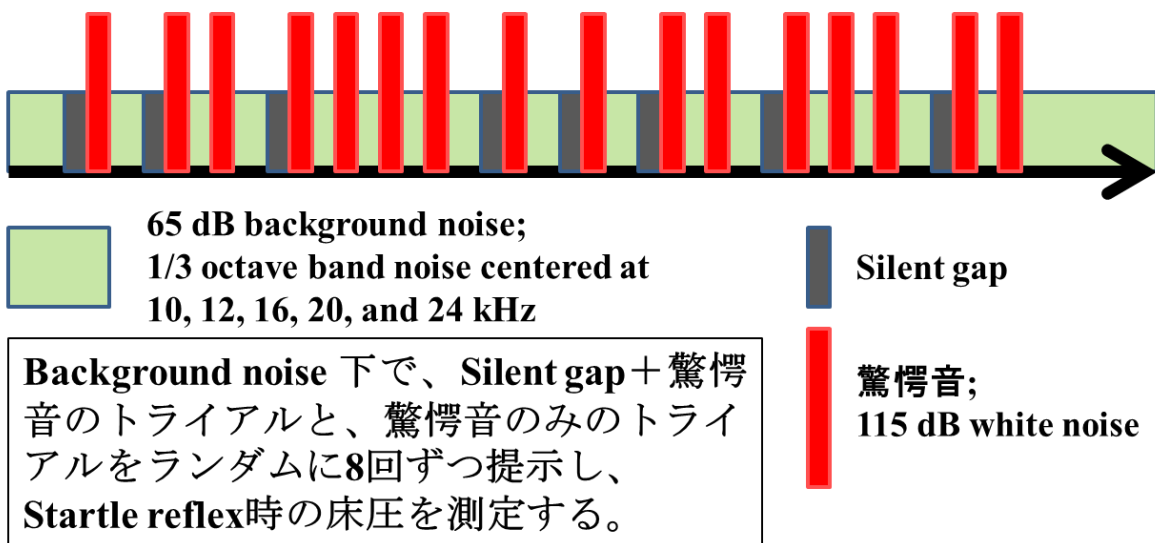


Prepulse + 驚愕音のトライアルと、  
驚愕音のみのトライアルをランダム  
に8回ずつ提示し、Startle reflex時の  
床圧を測定する。

$$\text{PPI Ratio} \rightarrow \frac{\text{Prepulse + 驚愕音 トライアル時の平均圧}}{\text{驚愕音のみのトライアル時の平均圧}}$$

正常個体ではプレパルス抑制により驚愕反射が抑制されるため、PPI Ratio は約 0.6 以下となる。PPI Ratio が 1 に近い個体はプレパルスを感じていない (難聴などにより) ことが言える。そうした個体は GAP に適さない。

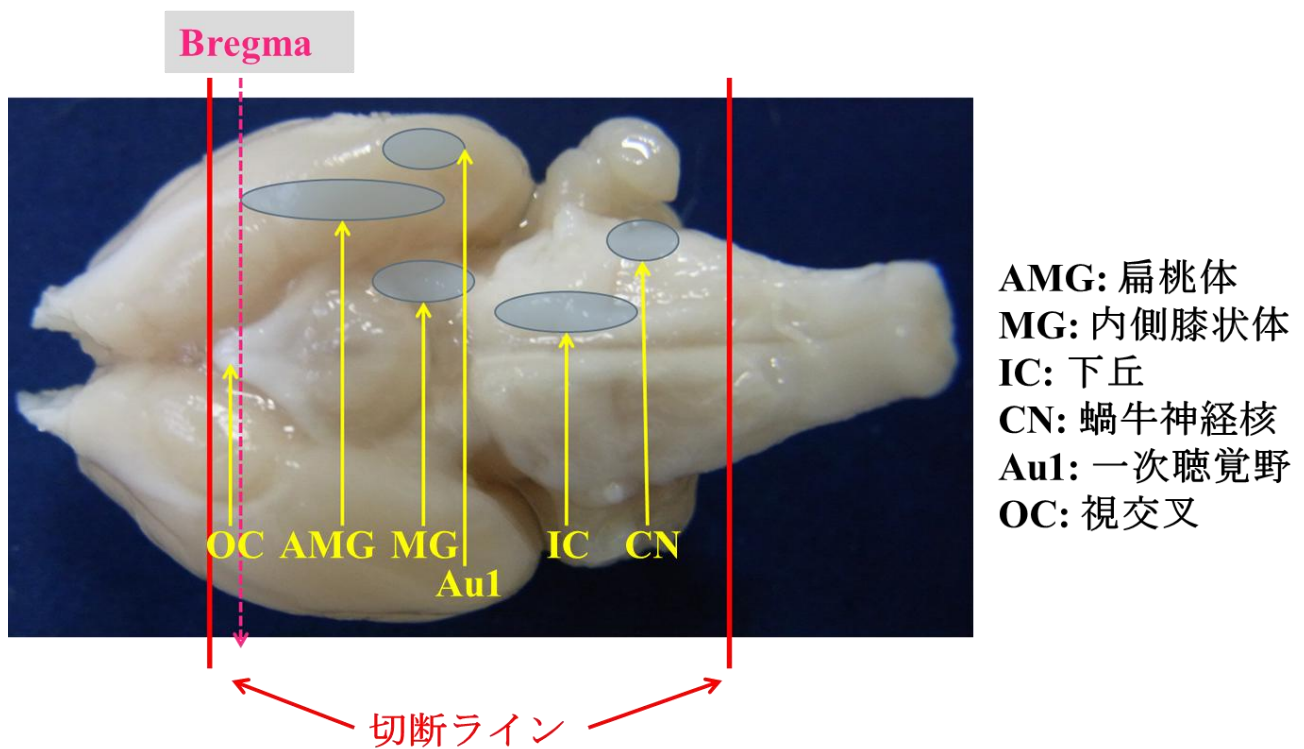
図 12 Gap detection test (GAP)の概要



$$\text{GAP Ratio} \rightarrow \frac{\text{Silent gap} + \text{驚愕音 トライアル時の平均圧}}{\text{驚愕音のみのトライアル時の平均圧}}$$

正常個体では GAP プレパルス抑制により驚愕反射が抑制されるため、GAP Ratio は約 0.6 以下となる。GAP Ratio が 1 に近いと耳鳴により Silent gap を感じていないと判定される。

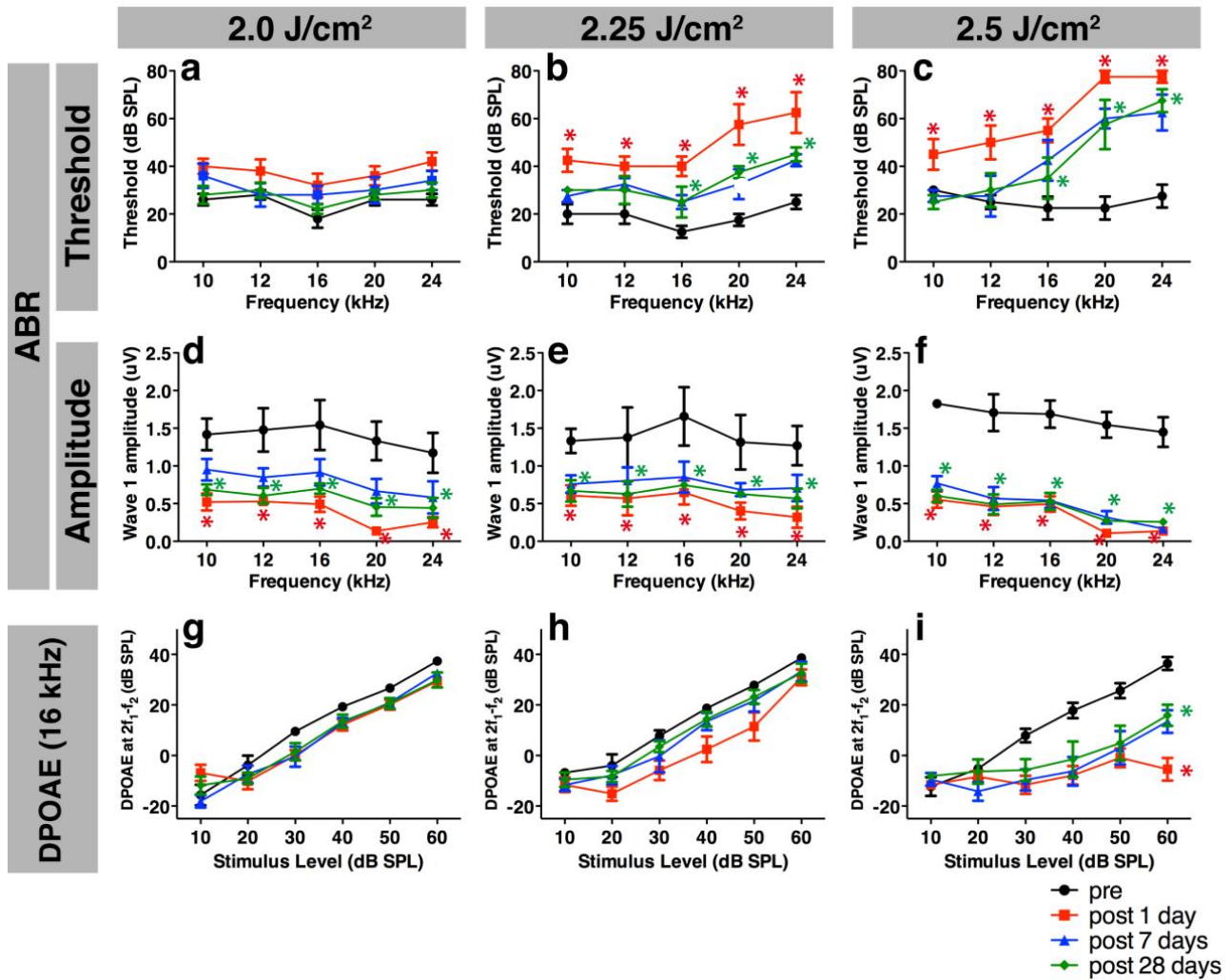
図 13 ラット脳の切り出し図



左方向が吻側で右方向が尾側で、おおよその評価部位を示した。凍結切片作製時は、吻側の切断面を下にして尾側から 40  $\mu\text{m}$  切片を作製した。

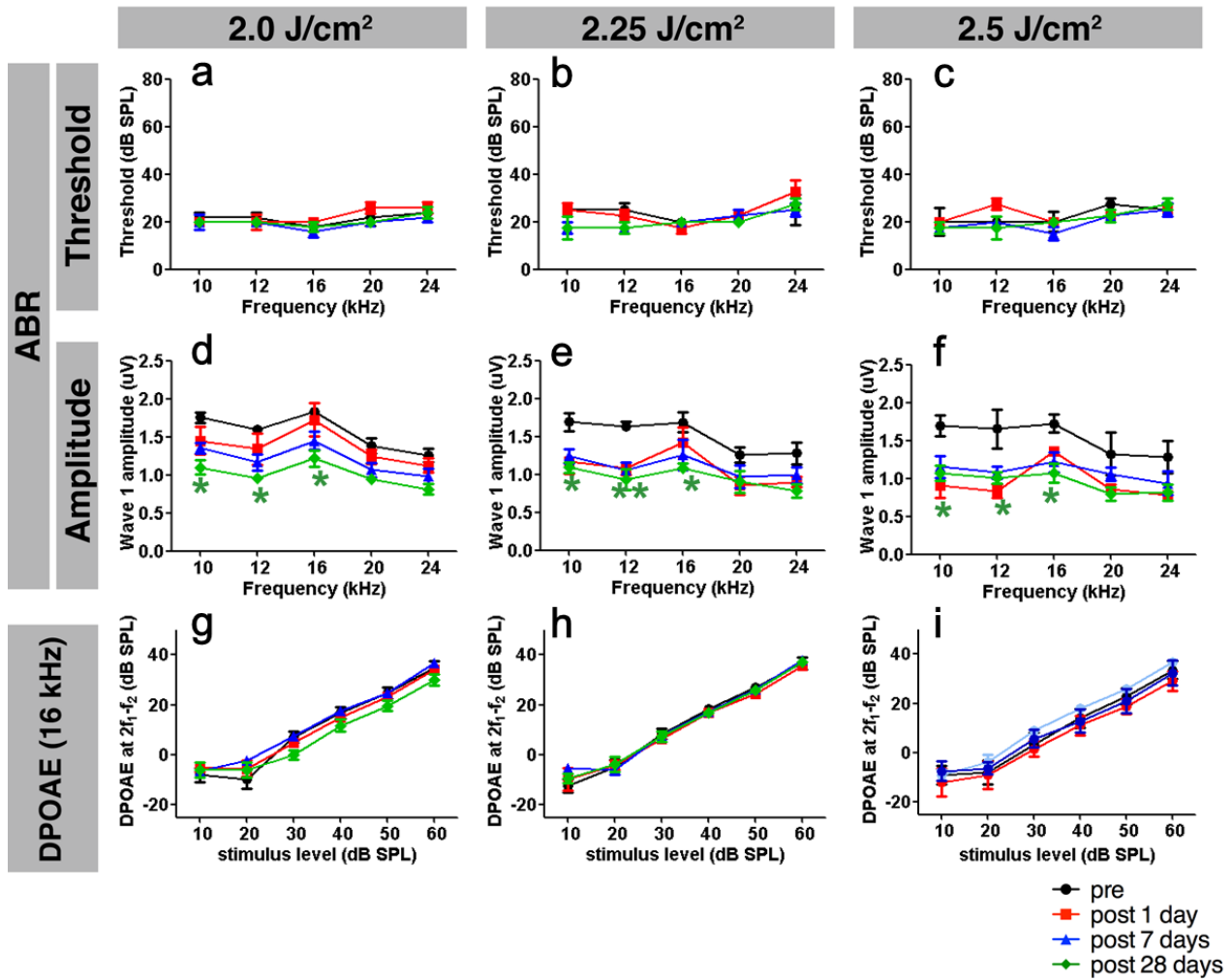


図 14 右耳 (LISW 暴露側) ABR、DPOAE の結果



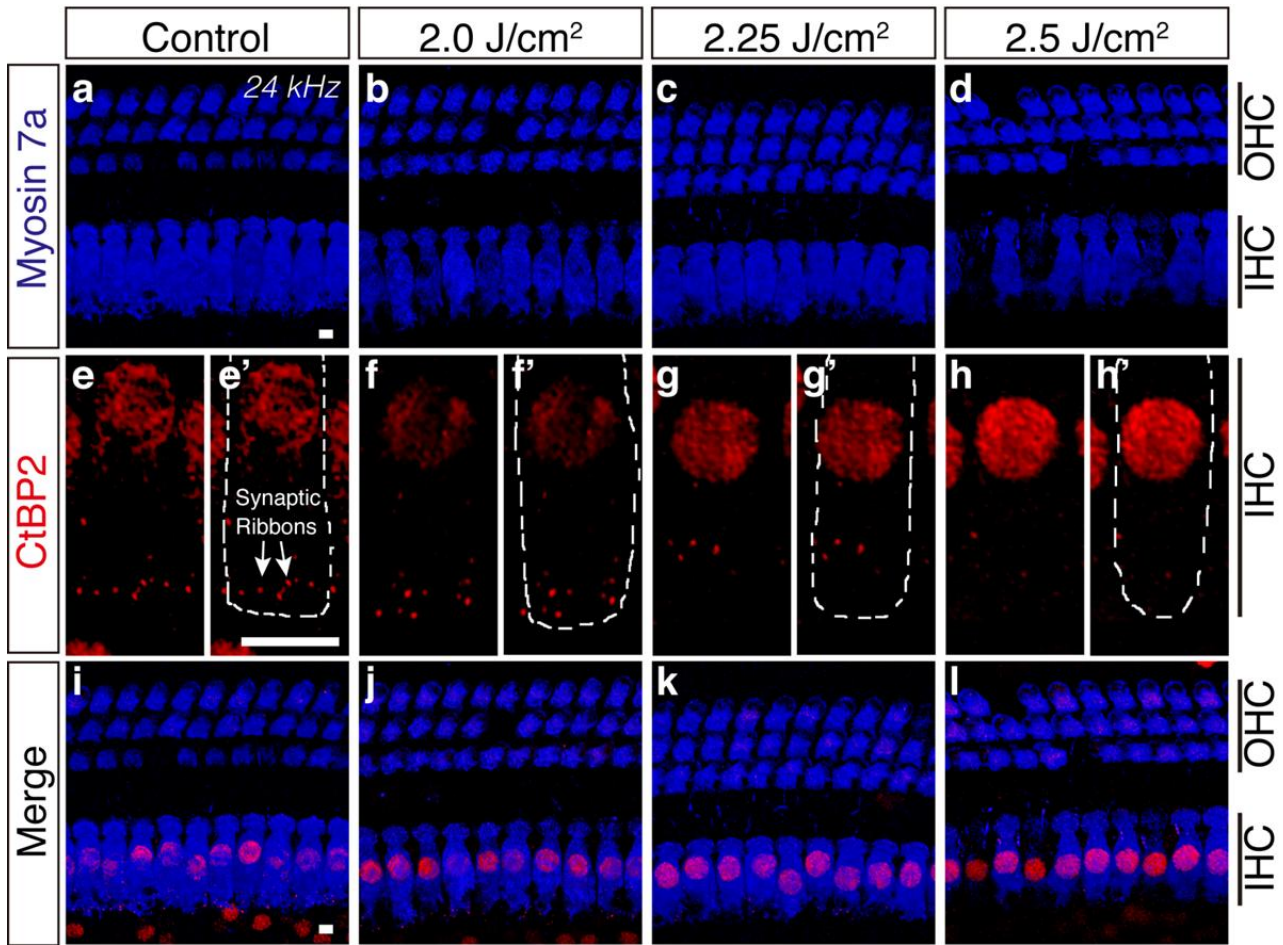
*a-c*, 2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群において、LISW 暴露後 1 日目に全周波数で LISW 暴露前と比べて ABR 閾値上昇を認め、高周波数領域では 4 週間後まで有意な上昇を認めた。*d-f*, 2.0 J/cm<sup>2</sup> 群の ABR 閾値は上昇していないにもかかわらず、wave 1 amplitude は 2.25, 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群と同様に LISW 暴露前と比べて 4 週間後まで有意に低下していた。*g-I*, 16 kHz における DPOAE レベルは 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群のみ LISW 暴露前と比べて有意に低下していた。2.0, 2.25 J/cm<sup>2</sup> 群では有意な低下は認めなかった。\*は、LISW 暴露前と比べて有意差 (P<0.05) があることを示す。それぞれの群 N=5 でエラーバーは SEM を示す。

図 15 左耳 (LISW 非暴露側) ABR、DPOAE の結果



*a-c*, ABR 閾値は全ての群で変化を認めなかった。*d-f*, wave 1 amplitude は全ての群で LISW 暴露前と比べ有意に低下していた。*g-i*, DPOAE レベルは全ての群で変化を認めなかった。\*は、LISW 暴露前と比べて有意差 (P<0.05) があることを示す。それぞれの群 N=5 でエラーバーは SEM を示す。

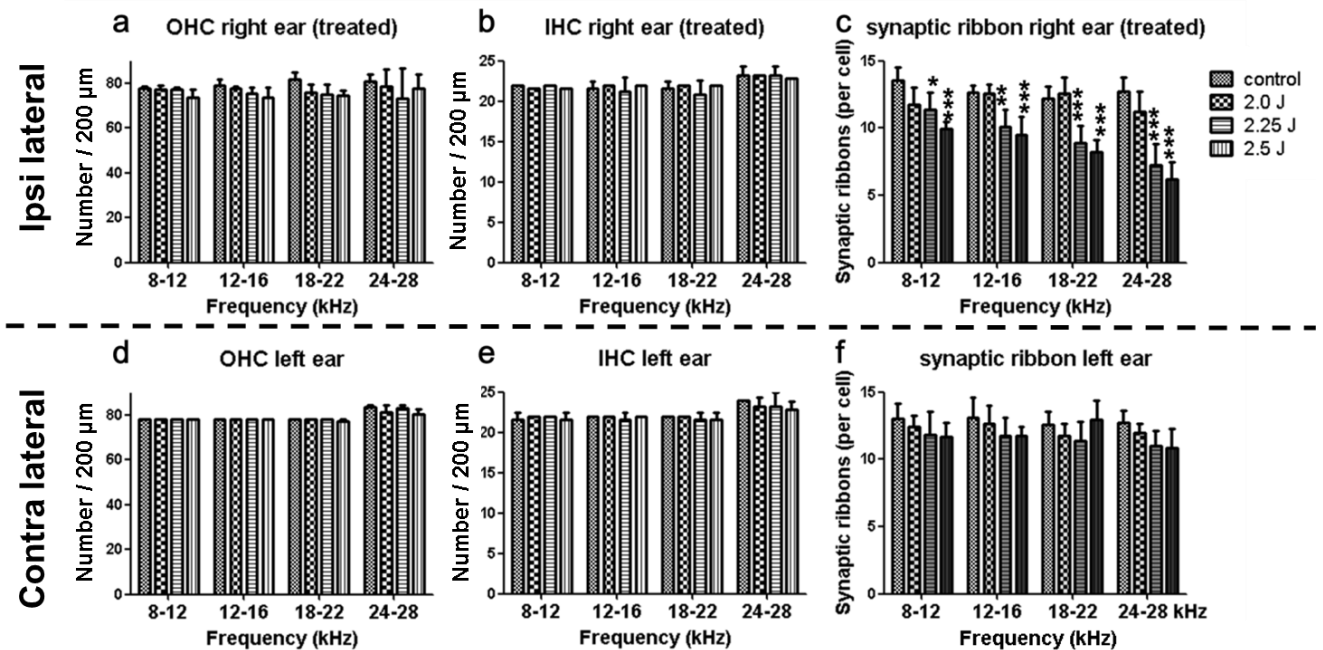
図 16 右耳 (LISW 暴露側) 内耳の蛍光免疫染色像



IHC: Inner Hair Cell (内有毛細胞) OHC: Outer Hair Cell (外有毛細胞)  
 Blue: Myosin 7a (有毛細胞) Red: CtBP2 (シナプスリボン)

*a-h*, 24 kHz 領域の OHCs と IHCs (*a-d*, 青, anti-Myosin 7a)、シナプスリボン(*e-h*, 赤, anti-CtBP2, *e'-h'* の破線は IHC の輪郭)の共焦点免疫染色像を示す。*i-l*, Merge した像。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

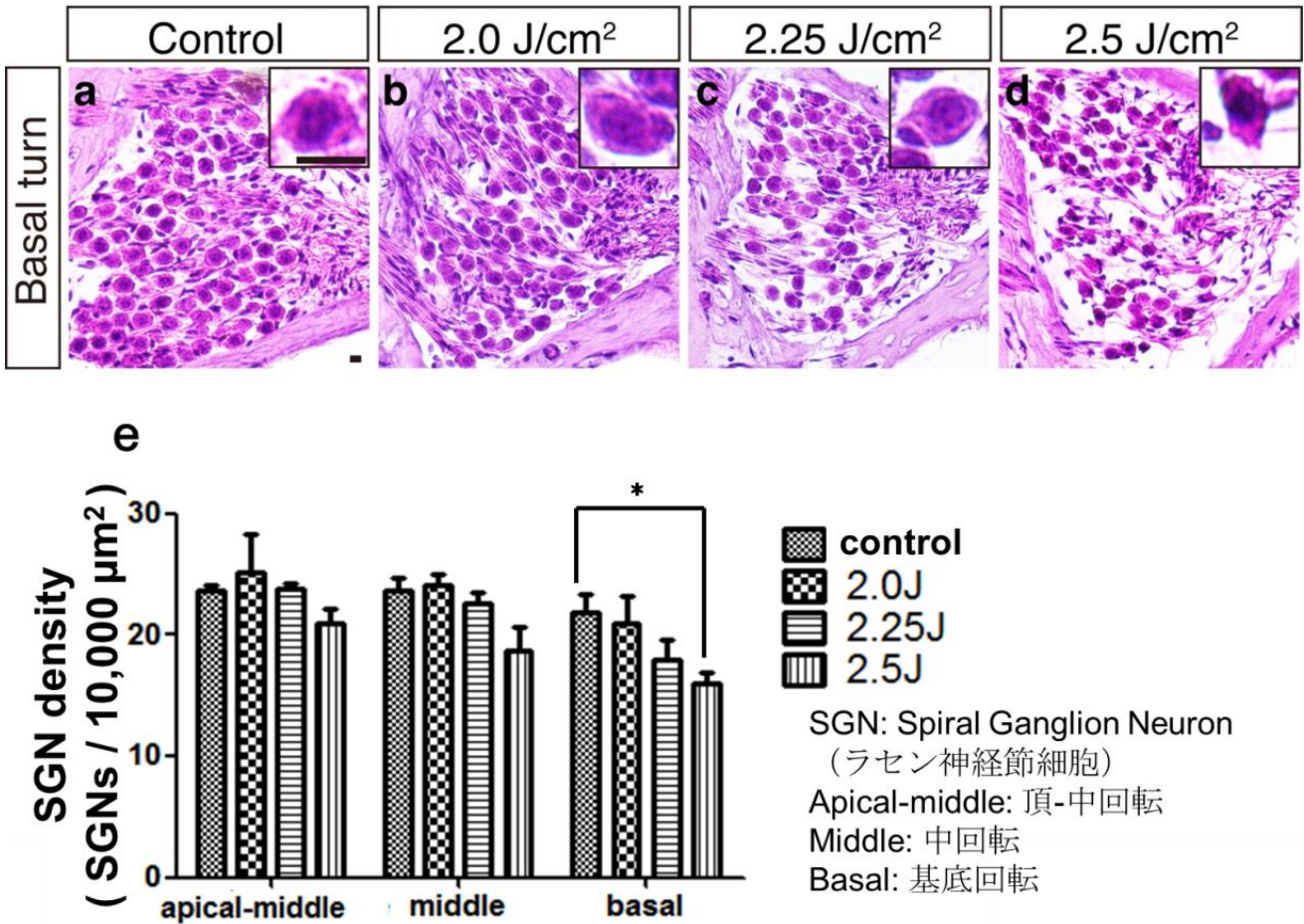
図 17 両耳の外有毛細胞 (OHC)・内有毛細胞 (IHC)・シナプスリボンのカウント結果



*a, b, d, e*, ABR 測定周波数を含む 200 μm の範囲でカウントしている。右耳の高周波数領域は有意な ABR 閾値上昇を認めているにもかかわらず左右 OHC、IHC ともに有意な減少は認めなかった。*c, f*, IHC1 個あたりのシナプスリボン数での比較。右耳において、レーザーのエネルギー密度依存性にシナプスリボンの減少を認めた。左耳の同様の傾向はあるものの有意差は認めなかった。\*は、コントロールと比較して有意差(P<0.05)があることを示す。エラーバーは SEM を示す。

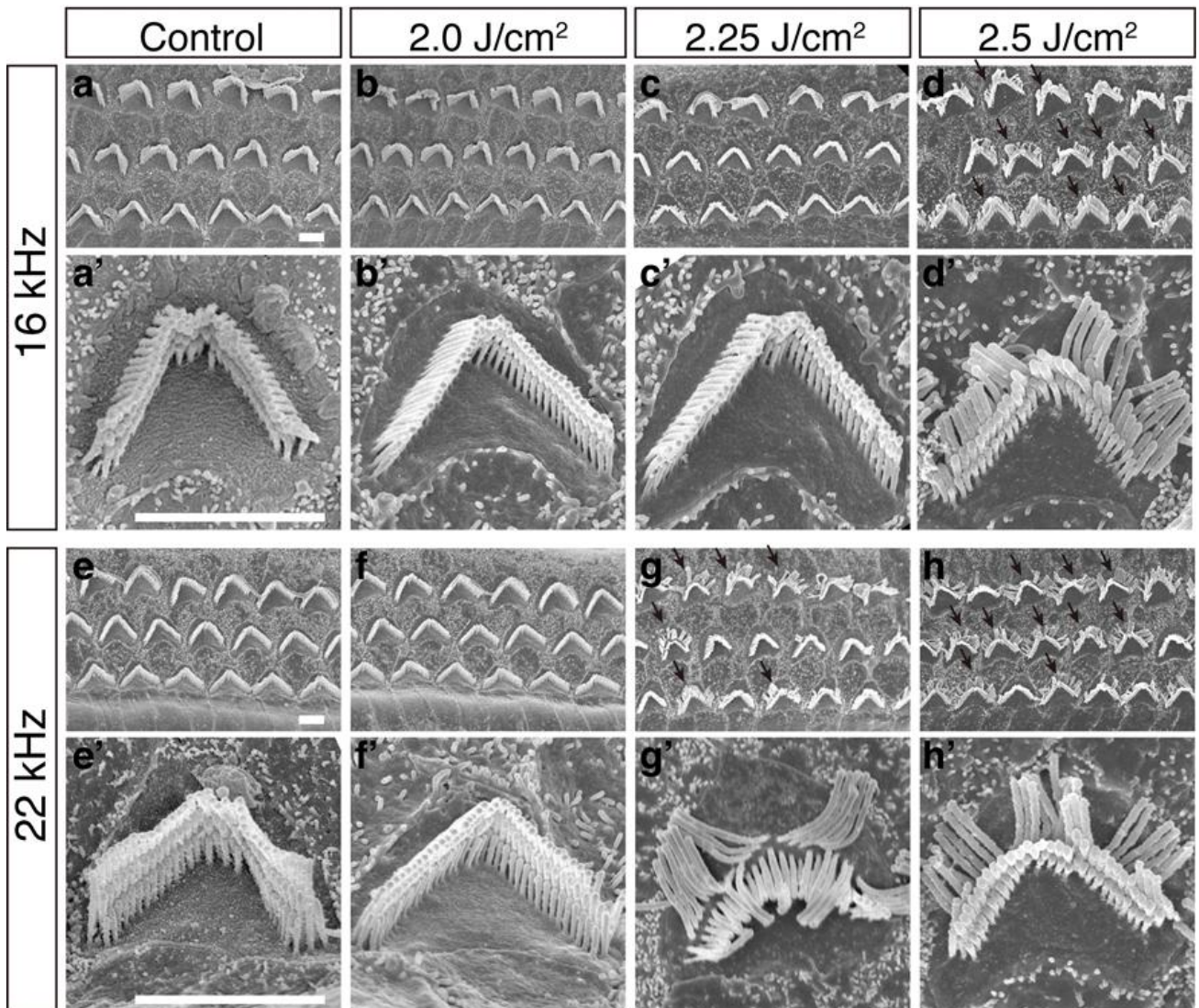


図 18 右耳 (LISW 暴露側) におけるラセン神経節細胞 (SGN)の細胞密度比較結果



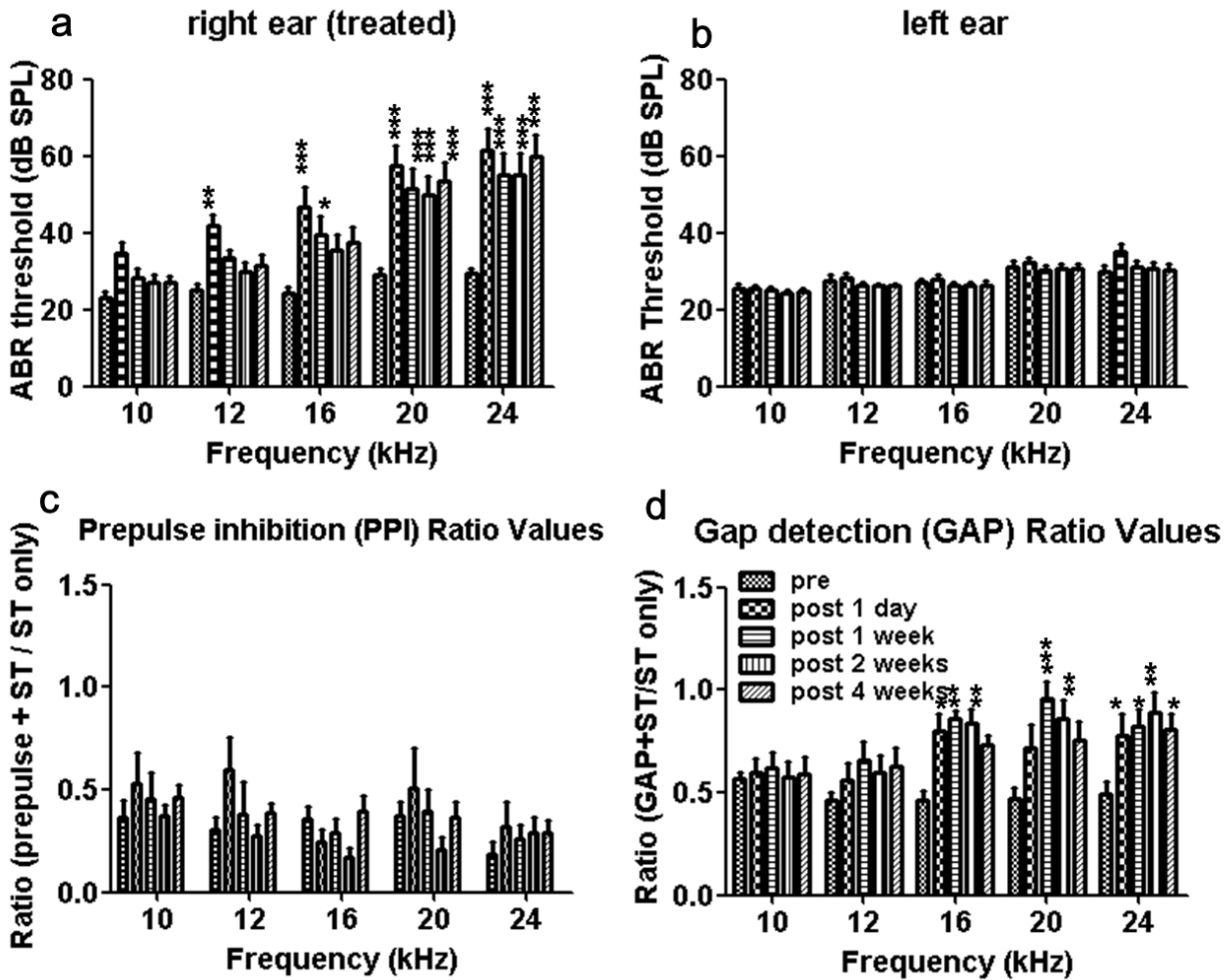
*a-d*, 蝸牛基底回転 (高周波数領域)における凍結切片の HE 染色像。各画像の右上に 1 個の SGN の強拡大像を示す。*e*, LISW 暴露後 4 週後の頂-中回転 (低周波数領域)、中回転(中周波数領域)、基底回転における SGN 細胞密度を示す。SGN 細胞密度は 2.5 J/cm<sup>2</sup> 群の基底回転においてコントロール群と比較して有意に減少していた。2.5 J/cm<sup>2</sup> 群における基底回転の SGN はコントロールに比べて収縮しているように見える(*a, d*)。\*は、コントロール群と比較して有意差 ( $p < 0.05$ )があることを示す。エラーバーは SEM を示す。スケールバーは 5  $\mu\text{m}$ 。

図 19 右耳 (LISW 暴露側) の外有毛細胞 (OHC) の表面構造



*a-d*, 16 kHz領域におけるOHC聴毛の電子顕微鏡所見。*a'-d'*, 16 kHz領域の強拡大像。*e-h*,  
*e'-h'*, 22 kHz領域におけるOHC聴毛の所見。2.25 J/cm<sup>2</sup>群の22 kHz領域において、3列の聴  
 毛のうち最外側の最も背の高い聴毛が根部より倒れていた。*(g, g')* 2.5 J/cm<sup>2</sup>群では16, 22  
 kHz領域で同様の聴毛障害が認められた。*(d, h, d', h')* スケールバーは 2 μm。

図 20 2.25 J/cm<sup>2</sup> の LISW 照射後の ABR 閾値変化と耳鳴評価

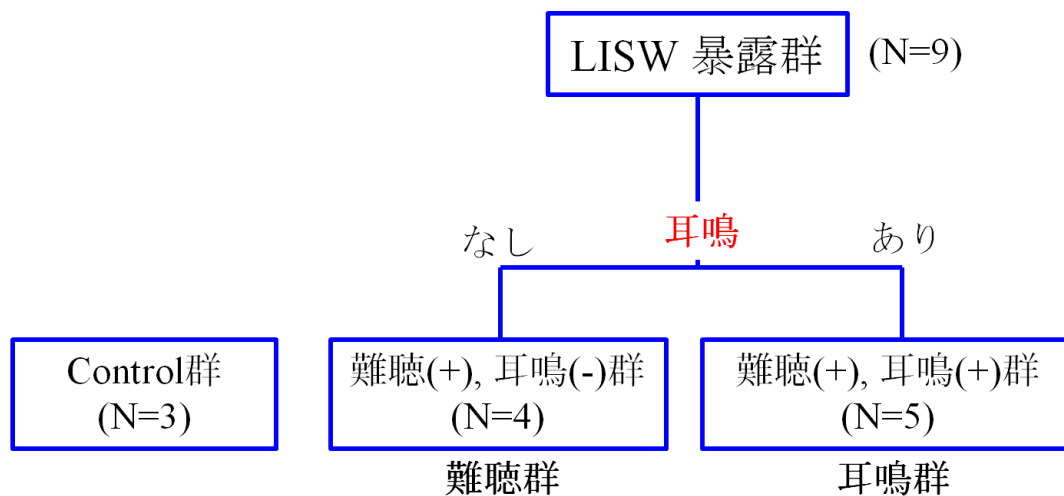


a, b, 右耳 (LISW 暴露側)と左耳 (LISW 非暴露側)の ABR 閾値変化。右耳では 20, 24 kHz 領域で 1 カ月後も閾値上昇を認めた(a)。左耳は変化を認めなかった(b)。

c, 耳鳴評価の行動実験を正常に行えるかどうかを評価する Prepulse Inhibition test (PPI)の結果。LISW 暴露 1 日後にはやや PPI Ratio が上昇する傾向を認めるが有意な上昇は認めなかった。正常値は 0.6 以下と言われており、全期間で正常範囲内であった。

d, Gap detection test (GAP)の結果。10, 12 kHz 領域の耳鳴は発生せず、16 kHz 領域では 1 日～2 週間後に耳鳴が発生し、4 週間には消退。20 kHz 領域では 1 週間～2 週間後で耳鳴が発生し、4 週間には消退。24 kHz 領域では 1 日～4 週間まで耳鳴を認めた。\*は LISW 暴露前と比較して有意差があることを示す。(\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001) エラーバーは SEM を示す。

図 21 脳の組織学的検討における群分け

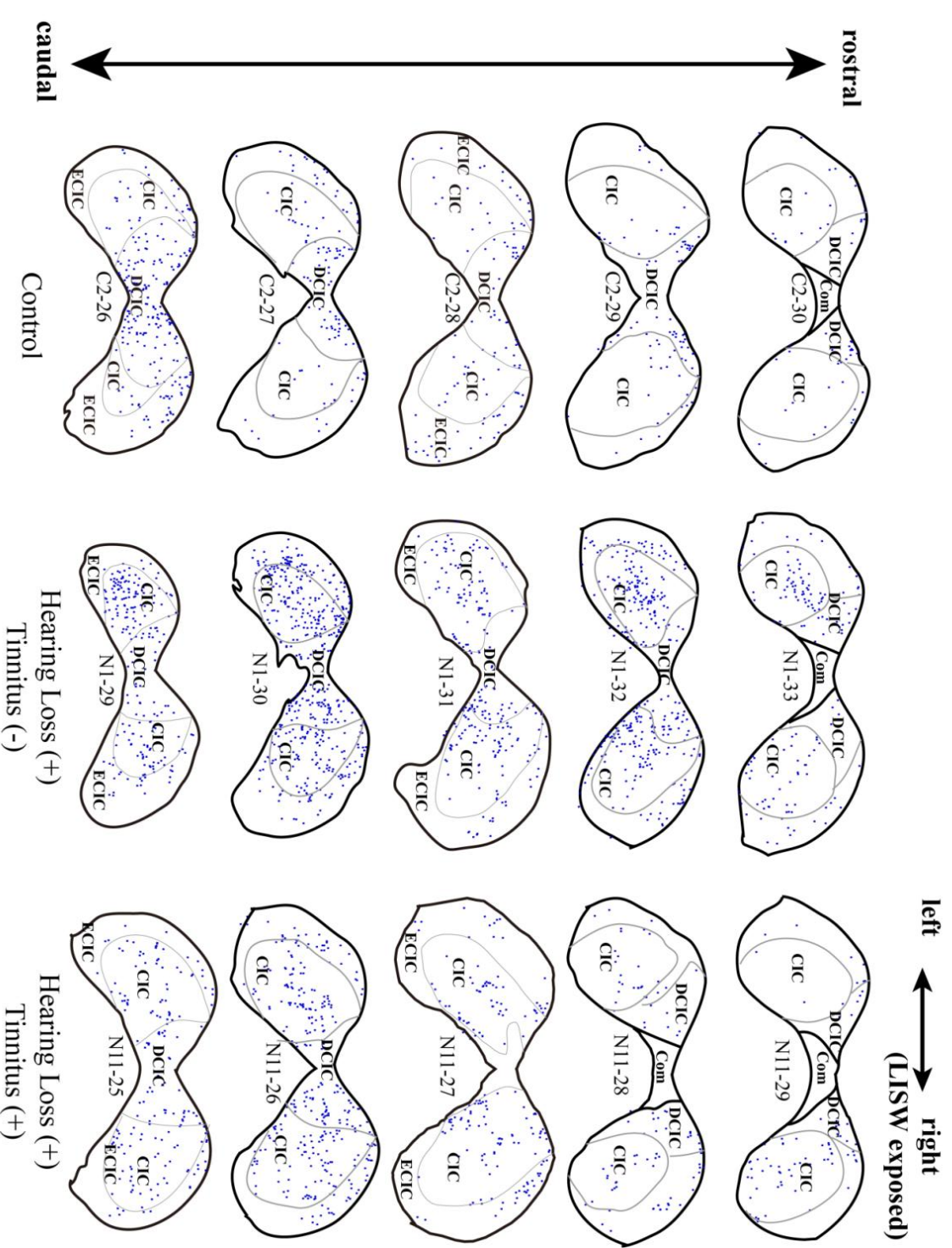


12 匹のラットのうち、コントロール群 3 匹、LISW 暴露群 9 匹とした。LISW 暴露 4 週後の時点で耳鳴が無いラットが 4 匹、耳鳴があるラットが 5 匹だったため、それぞれ難聴群、耳鳴群とした。





図23 下丘におけるArc陽性細胞プロット図



CIC: Central nucleus Inferior Colliculus  
 DCIC: Dorsal Cortex IC  
 ECIC: External Cortex IC  
 Com: Commissural nucleus IC



図24-1 一次聴覚野・海馬・扁桃体におけるArc陽性細胞プロット図

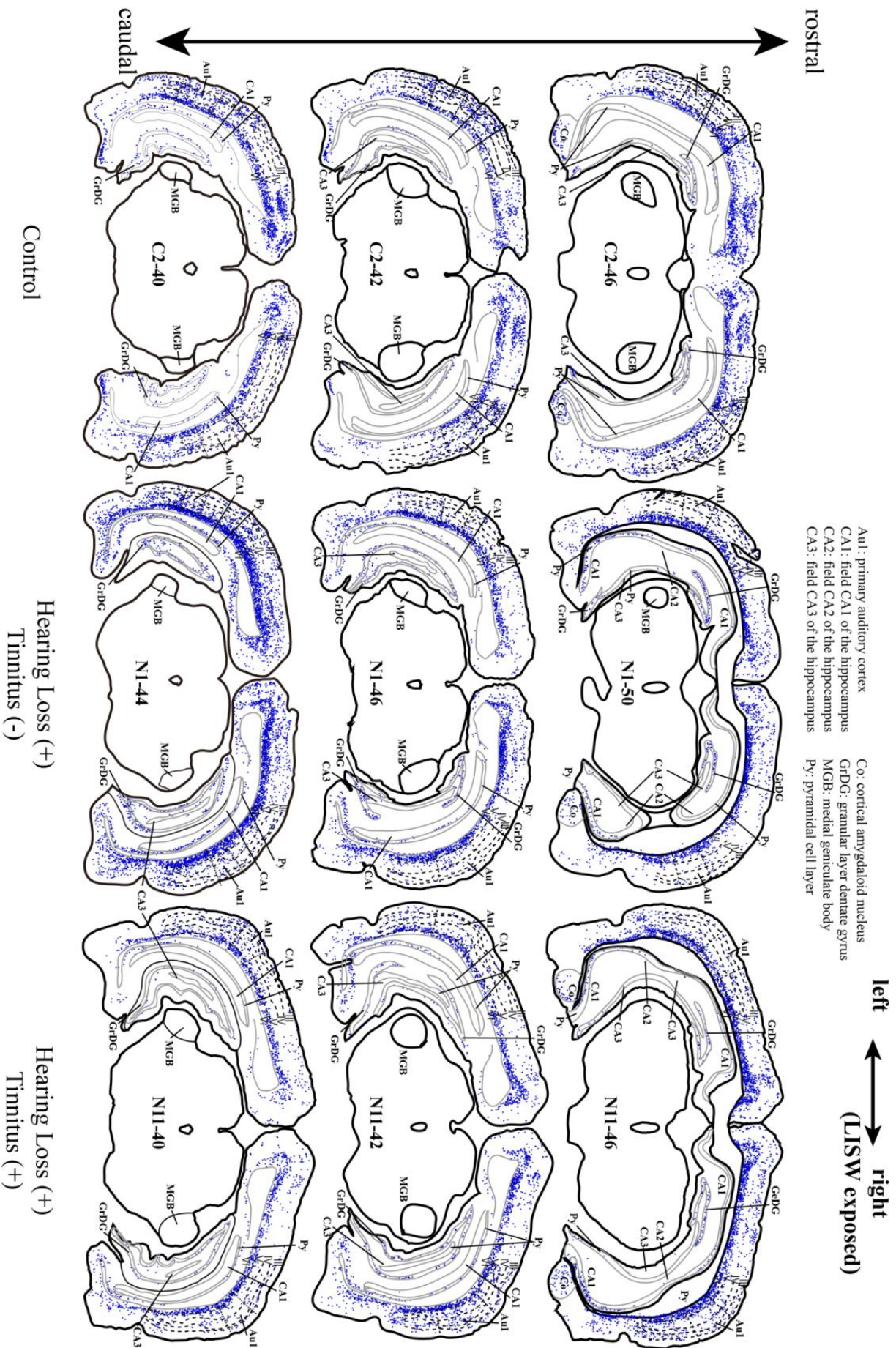




図24-2 一次聴覚野・海馬・扁桃体におけるArc陽性細胞プロット図

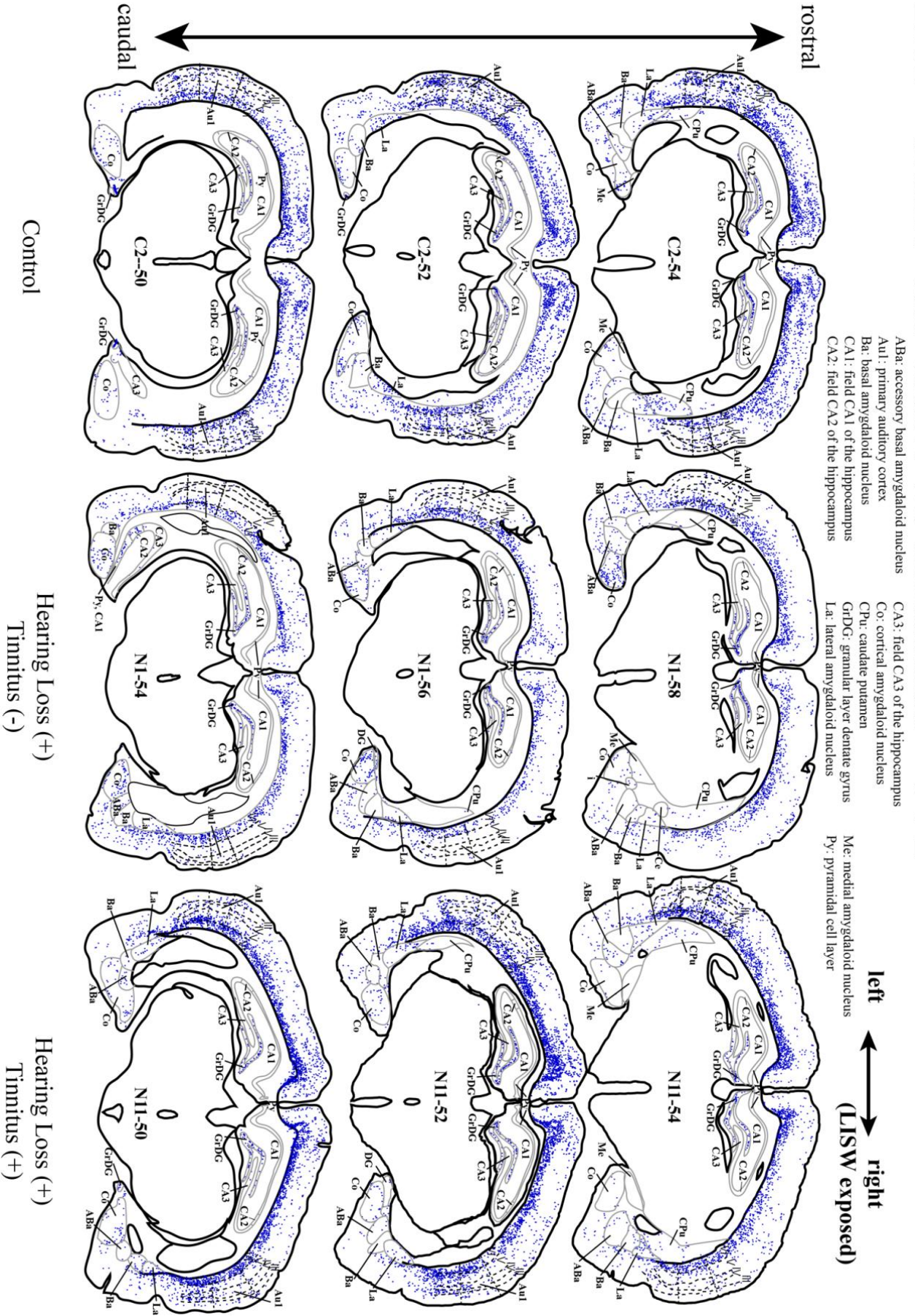




図24-3 一次聴覚野・海馬・扁桃体におけるArc陽性細胞プロット図

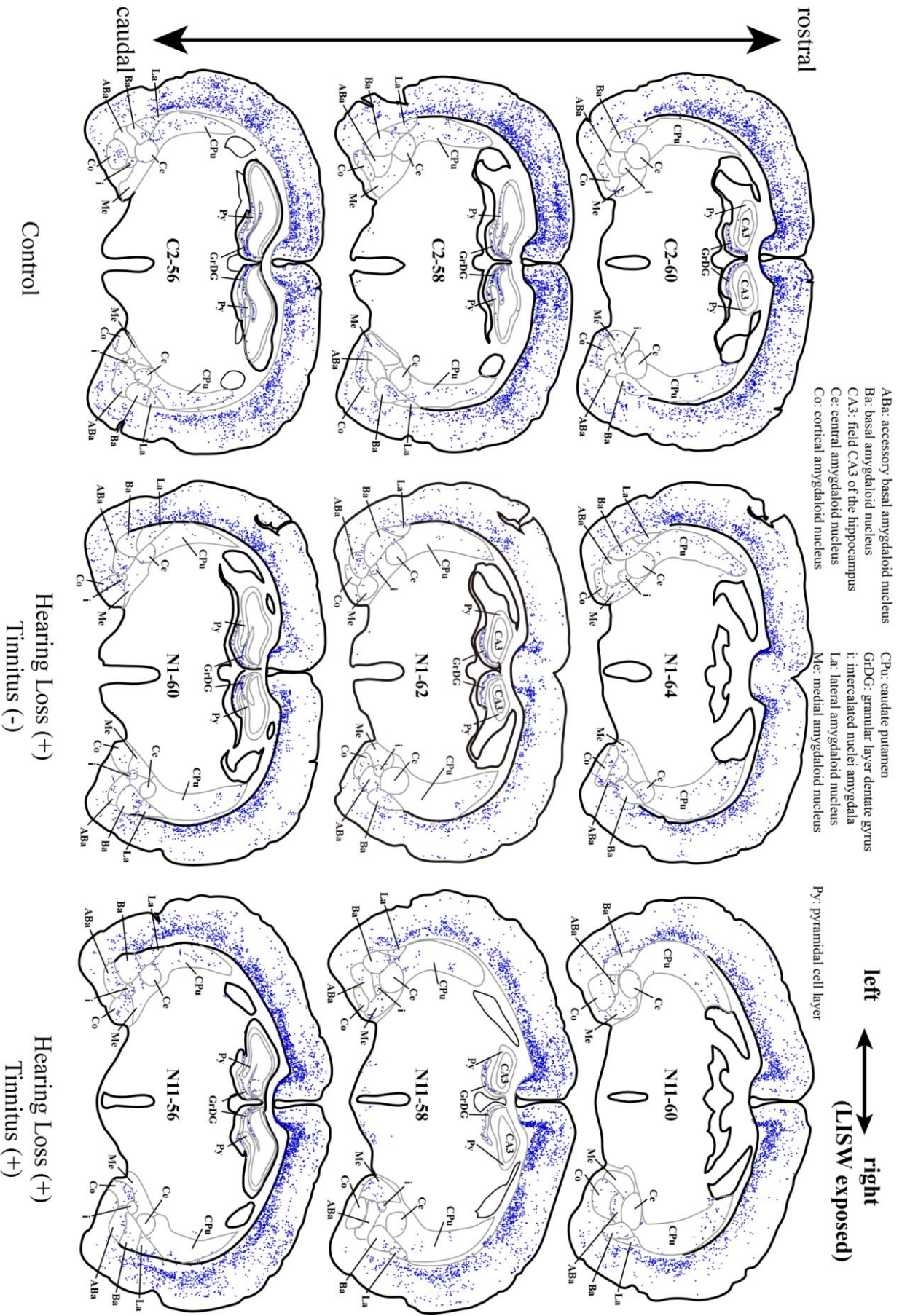


図 25 Arc 陽性細胞数

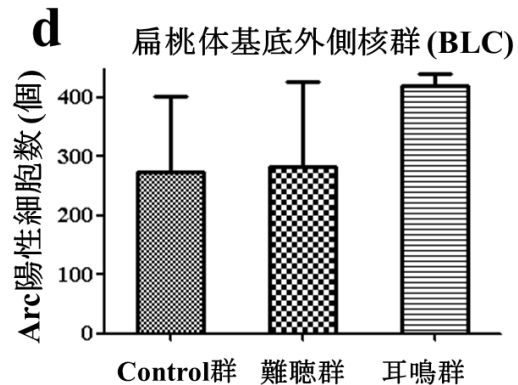
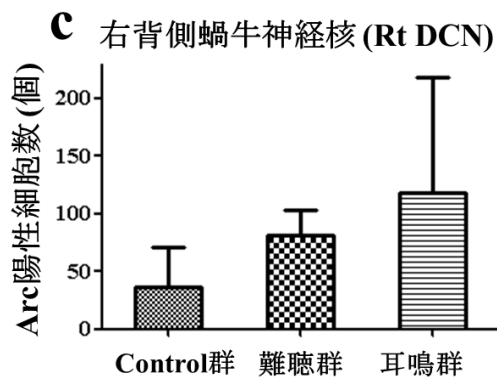
**a**

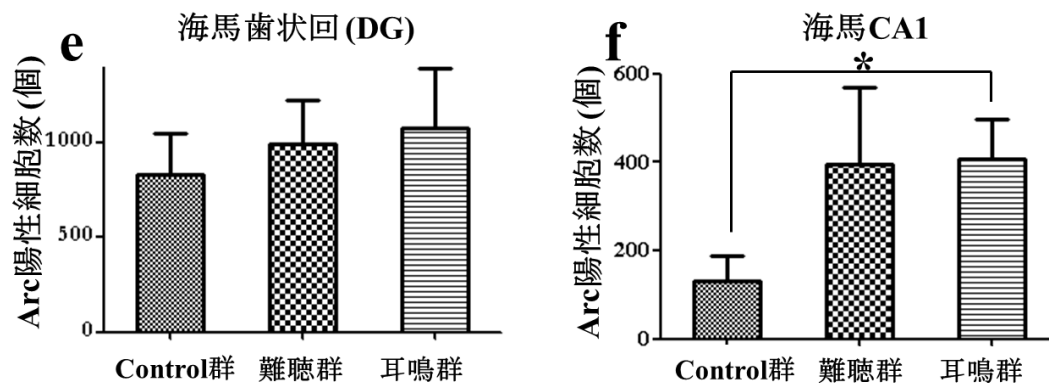
	C2 Control群	N1 難聴群	N11 耳鳴群
Rt DCN	10	57	233
Lt DCN	12	lost	74
Rt VCN	63	322	525
Lt VCN	53	lost	666
Rt CIC	66	337	287
Lt CIC	80	474	215
Rt DCIC	156	168	116
Lt DCIC	137	83	39
Au1	1876	1481	1749
Au1 (II,IV)	537	111	261
CA1	146	523	344
CA2	4	27	8
CA3	90	23	24
DG	801	1235	794
La	189	122	205
Ba	74	105	124
ABa	36	123	110
BLC	299	350	429
Ce	9	18	7
Co	517	396	227
Me	28	35	65

**b**

	C1, C2, C3 Control群 平均値	N1, N2, N3 難聴群 平均値	N6, N8, N11 耳鳴群 平均値
Rt DCN	36.3	81.3	118.3
Au1	1835	1695	1290
Au1 (II, IV)	419.7	278.0	176.3
DG	829.0	990.0	1079
CA1	132.0	394.7	408.3
BLC	274.7	282.0	420.7

Rt: Right  
 Lt: Left  
 DCN: Dorsal Cochlear Nucleus  
 VCN: Ventral Cochlear Nucleus  
 CIC: Central nucleus of Inferior Colliculus  
 DCIC: Dorsal Cortex Inferior Colliculus  
 Au1: primary Auditory cortex  
 II,IV: layer II,IV  
 CA1: CA1 area of hippocampus  
 CA2: CA2 area of hippocampus  
 CA3: CA3 area of hippocampus  
 DG: Dentate Gyrus  
 La: Lateral amygdaloid nucleus  
 Ba: Basal amygdaloid nucleus  
 ABa: Accessory Basal amygdaloid nucleus  
 BLC: Basolateral Complex  
 Ce: Central amygdaloid nucleus  
 Co: Cortical amygdaloid nucleus  
 Me: Medial amygdaloid nucleus  
 \* Au1 ~ Meは左右の合計数(個)





N=3; C1, C2, C3 (コントロール群)、N1, N2, N3 (難聴群)、N6, N8, N11 (耳鳴群)

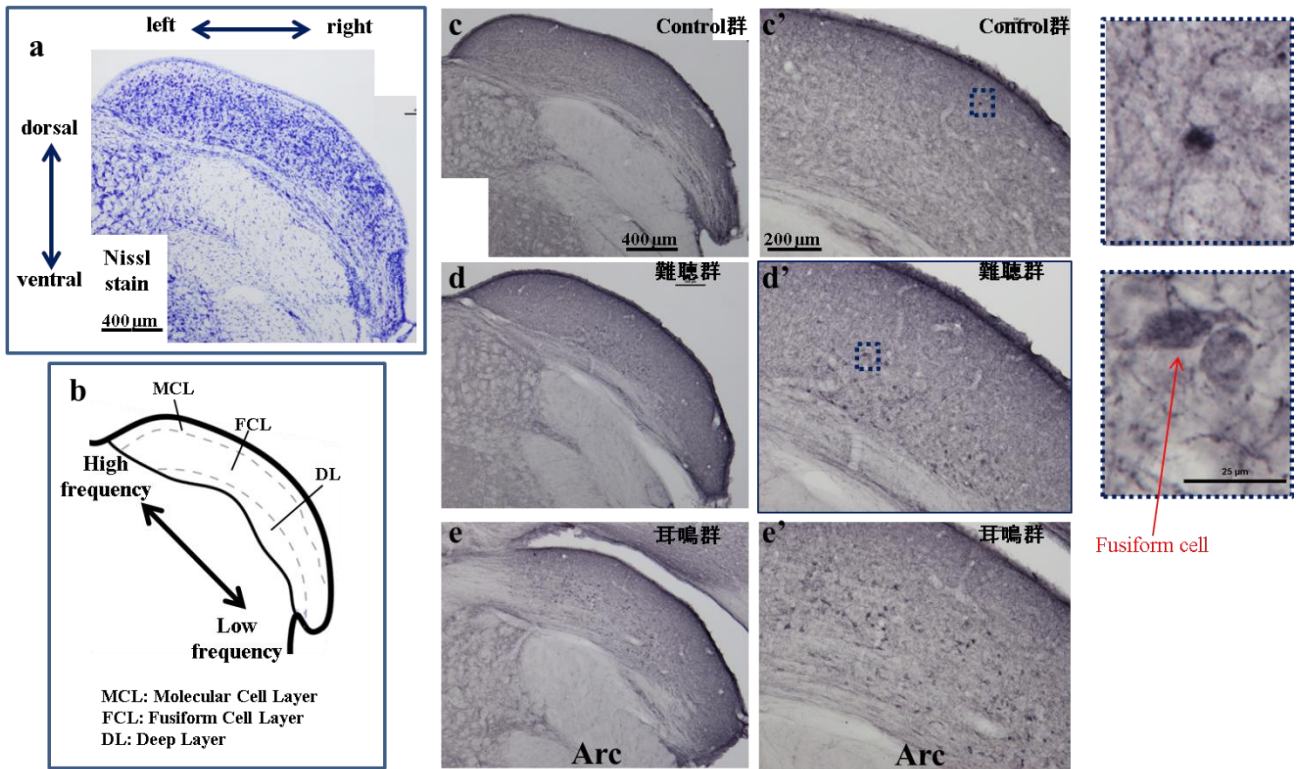
**a**, C2 (コントロール群)、N1 (難聴群)、N11 (耳鳴群)における脳の各区分の Arc 陽性細胞数。DCN~DCIC までは、左右別に算出しているが、Au1 以降は左右の連絡が豊富で左右差が認められないため左右合計して算出している。なお MGB は全く陽性細胞が存在しなかったため記載していない。また、N1 では脳の尾側左側が一部失われており、DCN、VCN は Lost と記載してある。DCN、VCN、CIC、CA1 においてコントロール群と比較して難聴群・耳鳴群の Arc 陽性細胞数が増加している。また、BLC において難聴群・耳鳴群でやや増加傾向を認めている。Au1 (II, IV)においてはコントロール群の Arc 陽性細胞数が多い傾向にある。

**b**, C1, C2, C3 (コントロール群)、N1, N2, N3 (難聴群)、N6, N8, N11 (耳鳴群)における Rt DCN、Au1、Au1 (II, IV)、DG、CA1、BLC の Arc 陽性細胞数平均値。Rt DCN、CA1 では難聴群・耳鳴群で Arc 陽性細胞数は増加傾向を認め、Au1、Au1 (II, IV)では減少傾向を認めている。BLC では耳鳴群で Arc 陽性細胞数が多い傾向であった。

**c-f**, Rt DCN、BLC、DG、CA1 の Arc 陽性細胞数比較結果。CA1 のコントロール群と耳鳴群でのみ有意差を認めた。(\* P<0.05)エラーバーは SD を示す。



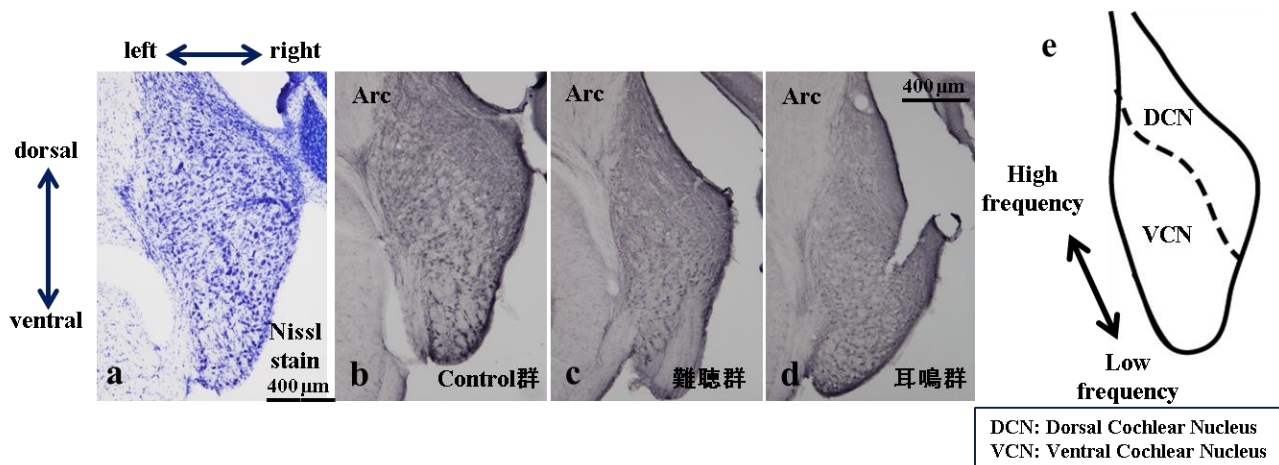
図 26 蝸牛神経背側核 (DCN) の染色像



**a**, DCN のニッスル染色像。**b**, DCN は、MCL、FCL、DL の 3 層に分けられる。周波数特性は背側が高周波数、腹側が低周波数。(Tonotopic map は Doucet et al., 1997; Ryan et al., 1998 を参考に作製) **c-e**, 各群の Arc 免疫染色像。**c'-e'**, 各群の強拡大像。難聴群・耳鳴群 (**d', e'**) では、FCL、DL において Arc 陽性細胞数が多く、代表的なグルタミン作動性ニューロン (興奮性) である Fusiform Cell の陽性像も認めた。コントロール群(**c'**) ではほとんど Arc 陽性細胞は無く、MCL にわずかに存在していた。

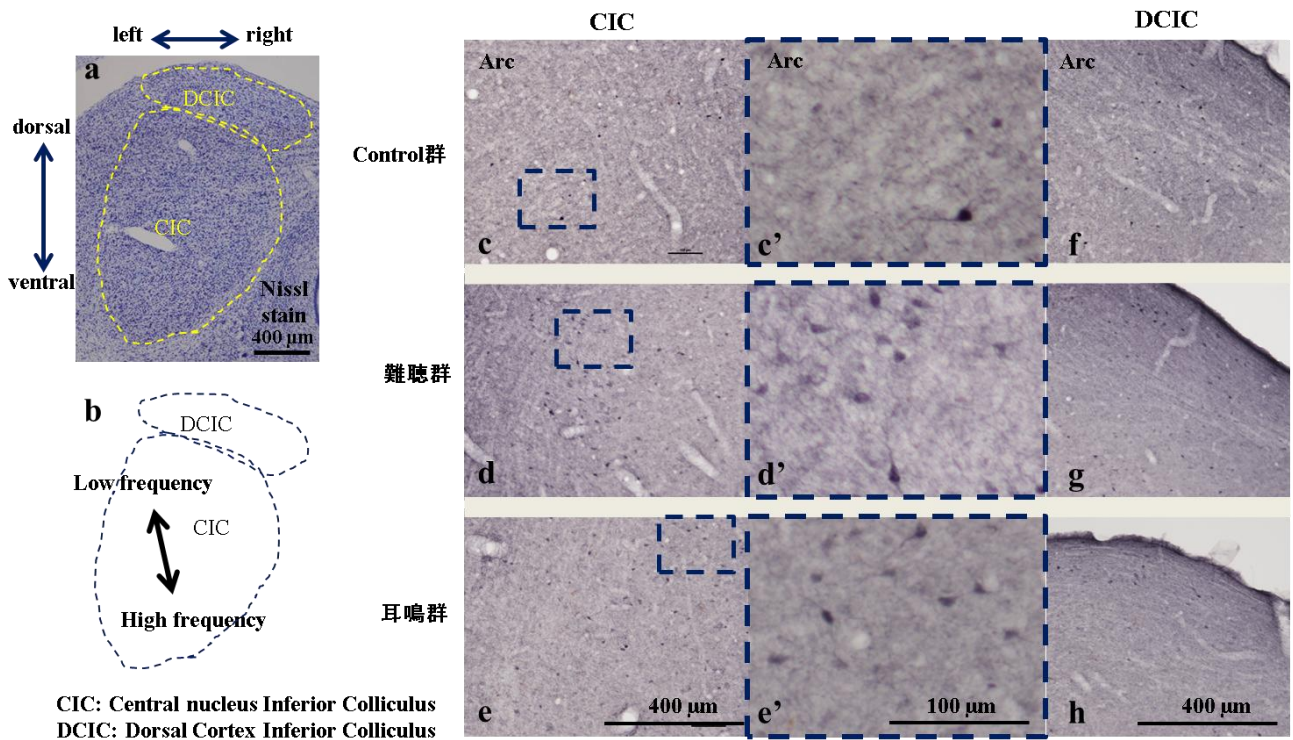


図 27 蝸牛神経腹側核 (VCN) の染色像



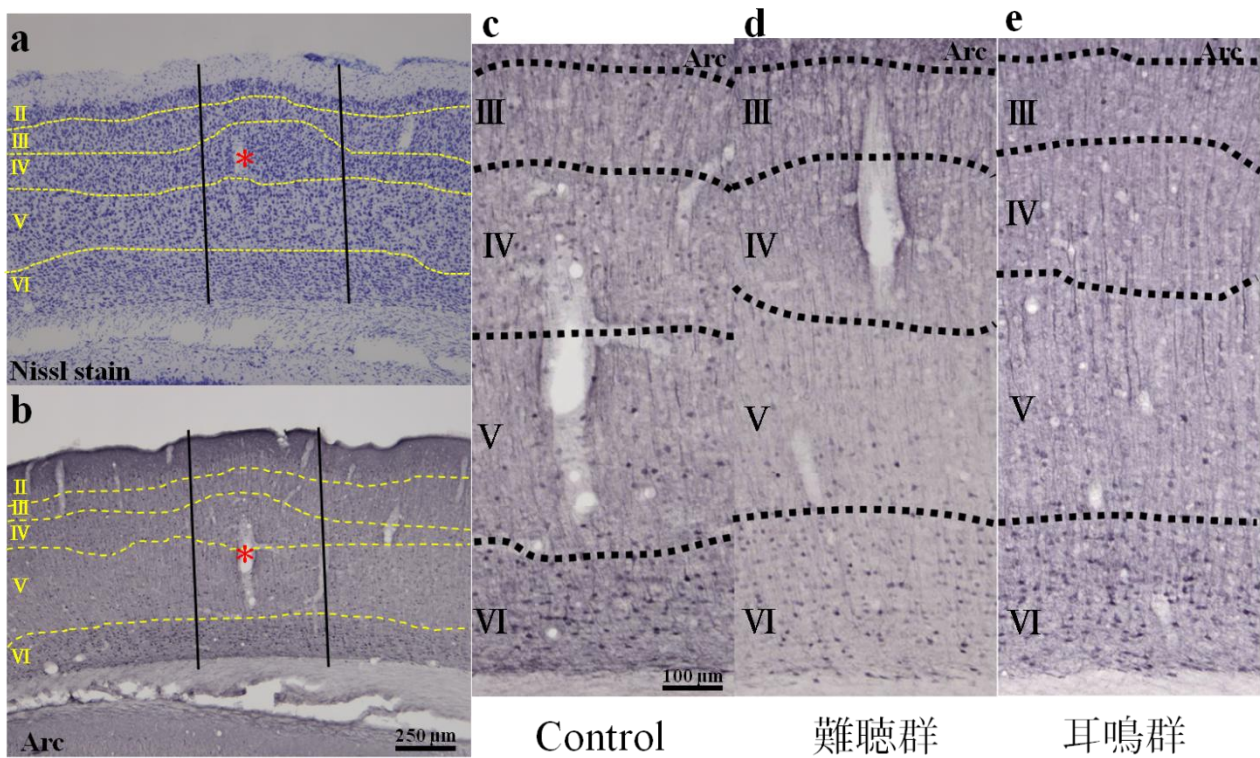
**a**, VCN のニッスル染色像。**b-d**, 各群の Arc 免疫染色像。Arc 陽性細胞の分布する領域に特徴は認めなかったが、陽性細胞数は明らかに難聴群・耳鳴群の方が多かった (**c**, **d**)。 **e**, Tonotopic map を示している。(Tonotopic map は Doucet et al., 1997; Ryan et al., 1998 を参考に作製)

図 28 下丘中心核 (CIC) および下丘背側中心核 (DCIC) の染色像



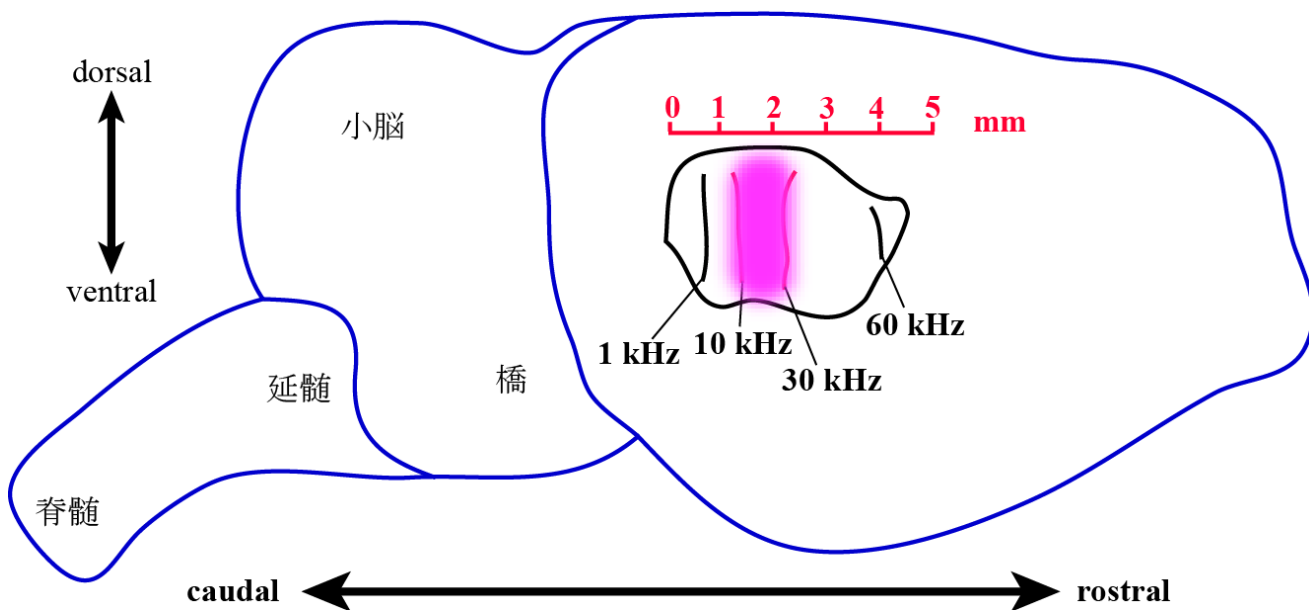
**a**, 左下丘のニッスル染色像。**b**, 下丘の区分と Tonotopic map。(Tonotopic map は Ryan et al., 1998 を参考に作製) **c-e**, 各群の CIC における Arc 免疫染色像。他領域と異なり細胞が小さい。コントロール群 (**c**) は Arc 陽性細胞数が少なく、難聴群・耳鳴群 (**d, e**) は明らかに多い。**c'-e'**, 各群の CIC における Arc 免疫染色像の強拡大像。**f-h**, 各群の DCIC における Arc 免疫染色像。Arc 陽性細胞の分布や数に大きな差は認めない。

図 29 一次聴覚野 (Au1) の染色像



**a**, Au1 のニッスル染色像。厚い第IV層の領域が Au1。 **b**, Au1 の Arc 免疫染色像。Au1 を確認したニッスル染色の隣接切片で Au1 を観察、評価する。 **c-e**, 各群における Arc 免疫染色の強拡大像。コントロール群(**c**)では全体的に Arc 陽性細胞が分布しているが、難聴群・耳鳴群(**d, e**)では第 6 層に極端に偏っているように見える。

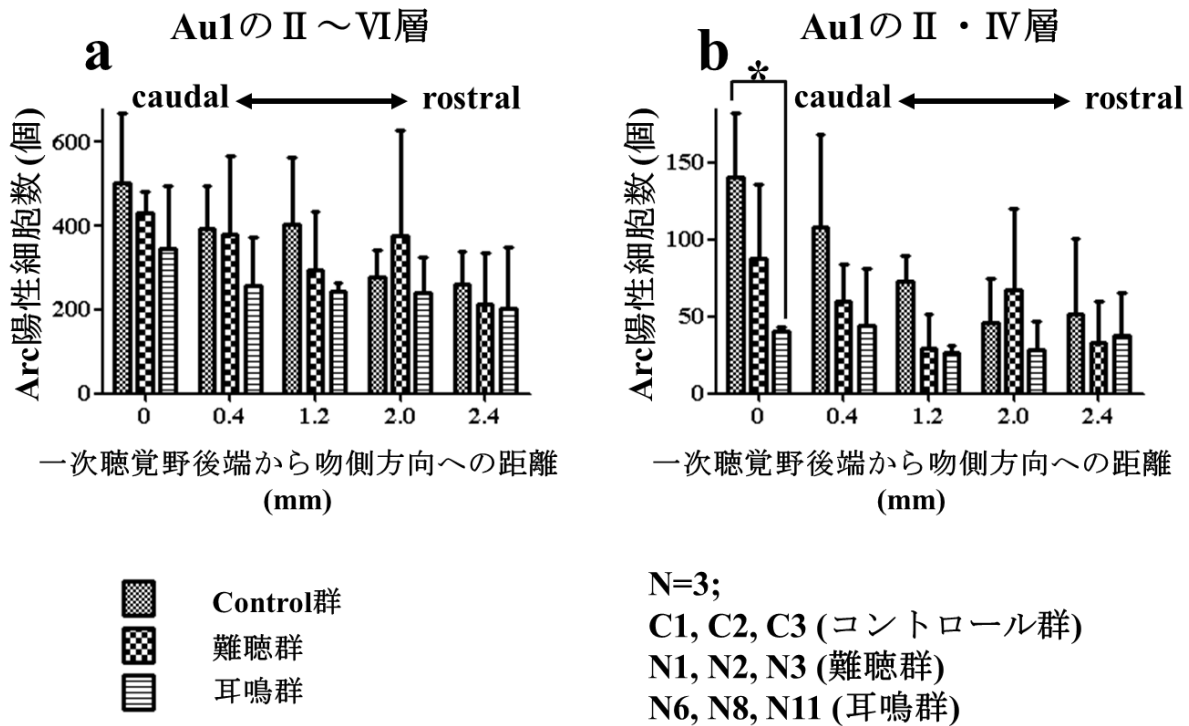
図 30 一次聴覚野 (Au1) における Tonotopic map



桃色のエリアが ABR で測定した領域である。本研究で Arc を評価している領域は赤いスケールで 0~2.4 mm の領域であり、ABR など聴力評価を実施した領域を含んでいる。

(Tonotopic map は Doron at al., 2002 を参考に作製)

図 31 一次聴覚野(Au1)における Arc 陽性細胞の分布



**a**, Au1の第II～VI層におけるArc陽性細胞数をAu1後端からの距離別にプロットしたグラフ。コントロール群におけるArc陽性細胞数は、概ね場所を問わず最も多いが、有意差は無いものの2.0 mmの領域でのみ難聴群が多い結果となった。難聴群・耳鳴群では吻側(高周波数領域)に向かって低下傾向を示しているが難聴群の2.0 mm領域でのみ増加を認めている。

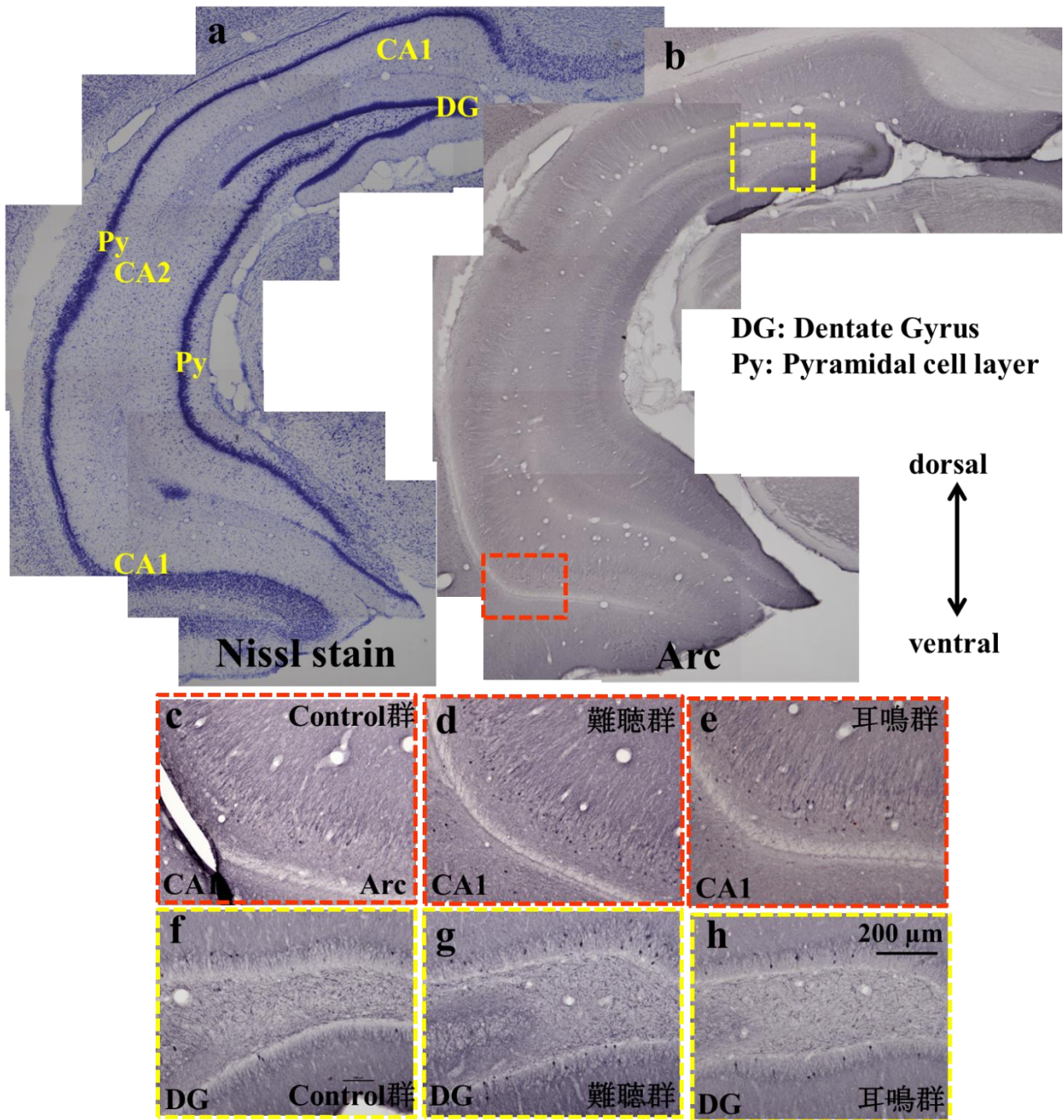
**b**, 扁桃体外側核に投射しているのは第II、IV層のみであることから、第II、IV層における各群のArc陽性細胞数をAu1後端からの距離別にプロットしたグラフ。コントロール群ではArc陽性細胞は全体的に多く、難聴群・耳鳴群では少ない傾向であった。0 mmの領域(低周波数領域)でコントロール群と比較して耳鳴群では有意に低下していた。

( $P < 0.05$ )

エラーバーはSDを示す。

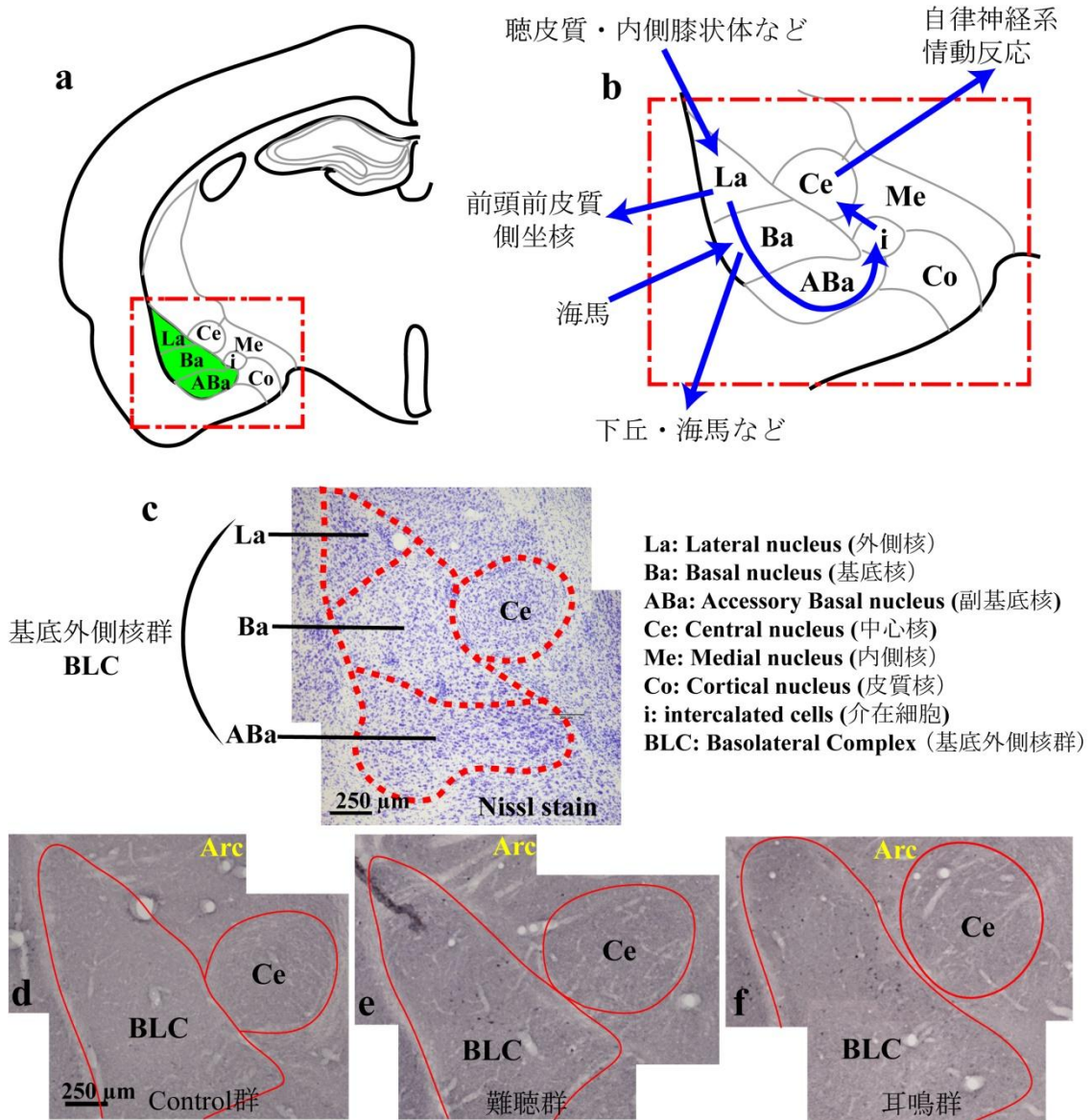


図 32 海馬の染色像



**a**, 左海馬のニッスル染色像。**b**, 左海馬の Arc 免疫染色像。赤枠が Ba と直接連絡する腹側の CA1。黄枠は DG を示す。**c-e**, 各群における腹側 CA1 の強拡大像。明らかにコントロール群 (**c**) において Arc 陽性細胞が少なく、LISW 暴露群 (**d, e**) において多い。**f-h**, 各群における DG の強拡大像。脳の中でも最も神経新生の盛んな場所であり、他部位よりどの群でも Arc 陽性細胞は多い。

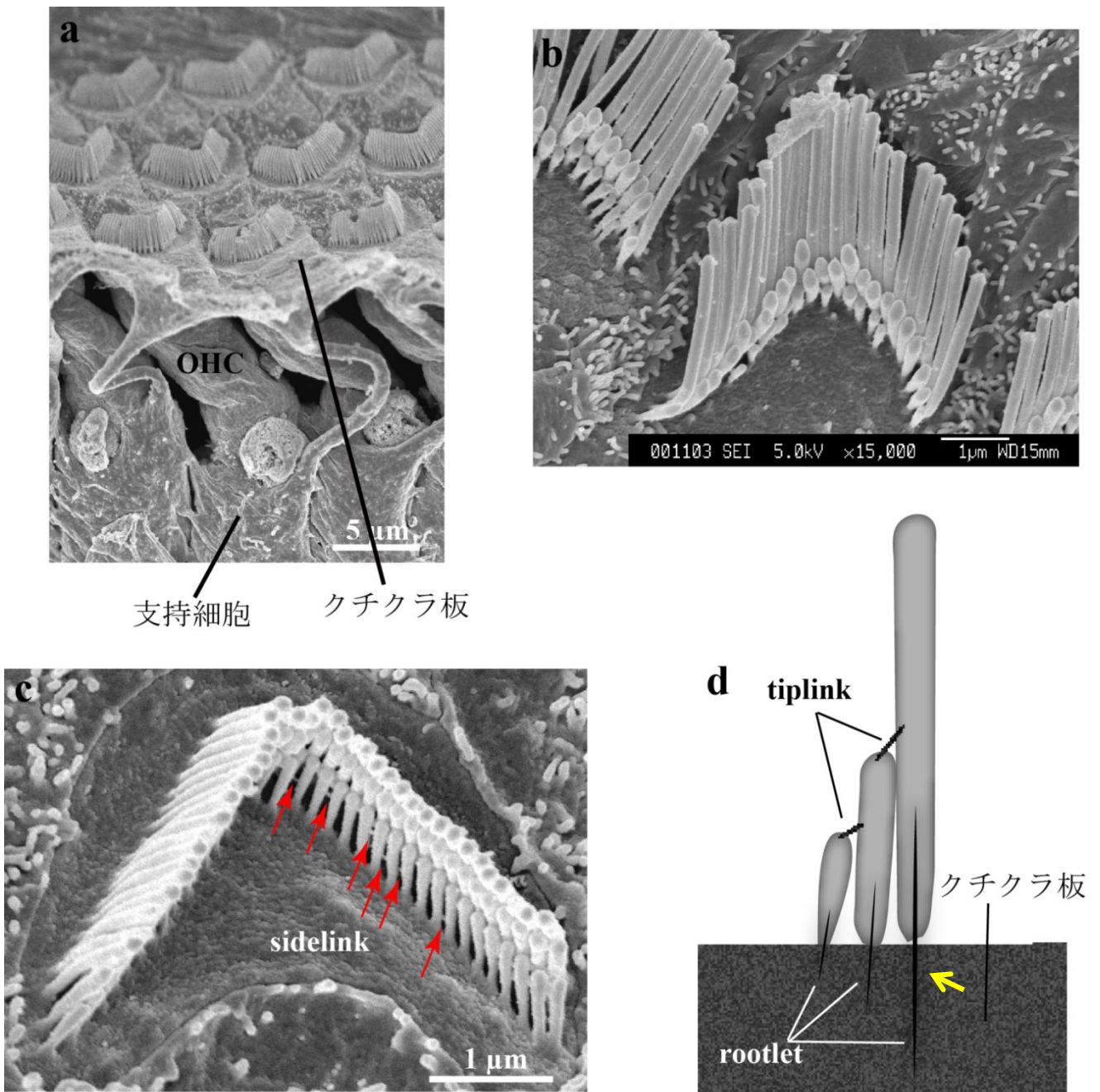
図 33 扁桃体の染色像と区分



**a**, 扁桃体は La、Ba、ABa、Ce、Me、Co、i に区分されるが、聴覚に関わるのは主に La、Ba、ABa からなる BLC と Ce であり、Me、Co は主に嗅覚と関係している。**b**, Au1、MGB などからの投射は主に La に入力する。La からは前頭前皮質や側坐核に出力があるが、Ba を経由して下丘、海馬などに出力したり、Ce まで投射して自律神経系等へ出力したりする。**c**, BLC、Ce のニッスル染色像。**d-f**, **c** と同じ部位における各群の Arc 免疫染色像。Ce は全ての群において Arc 陽性細胞がほとんど存在しない。BLC においてはコントロール群 (**d**) で Arc 陽性細胞数は最も少なく、耳鳴群 (**f**) で最も多い。



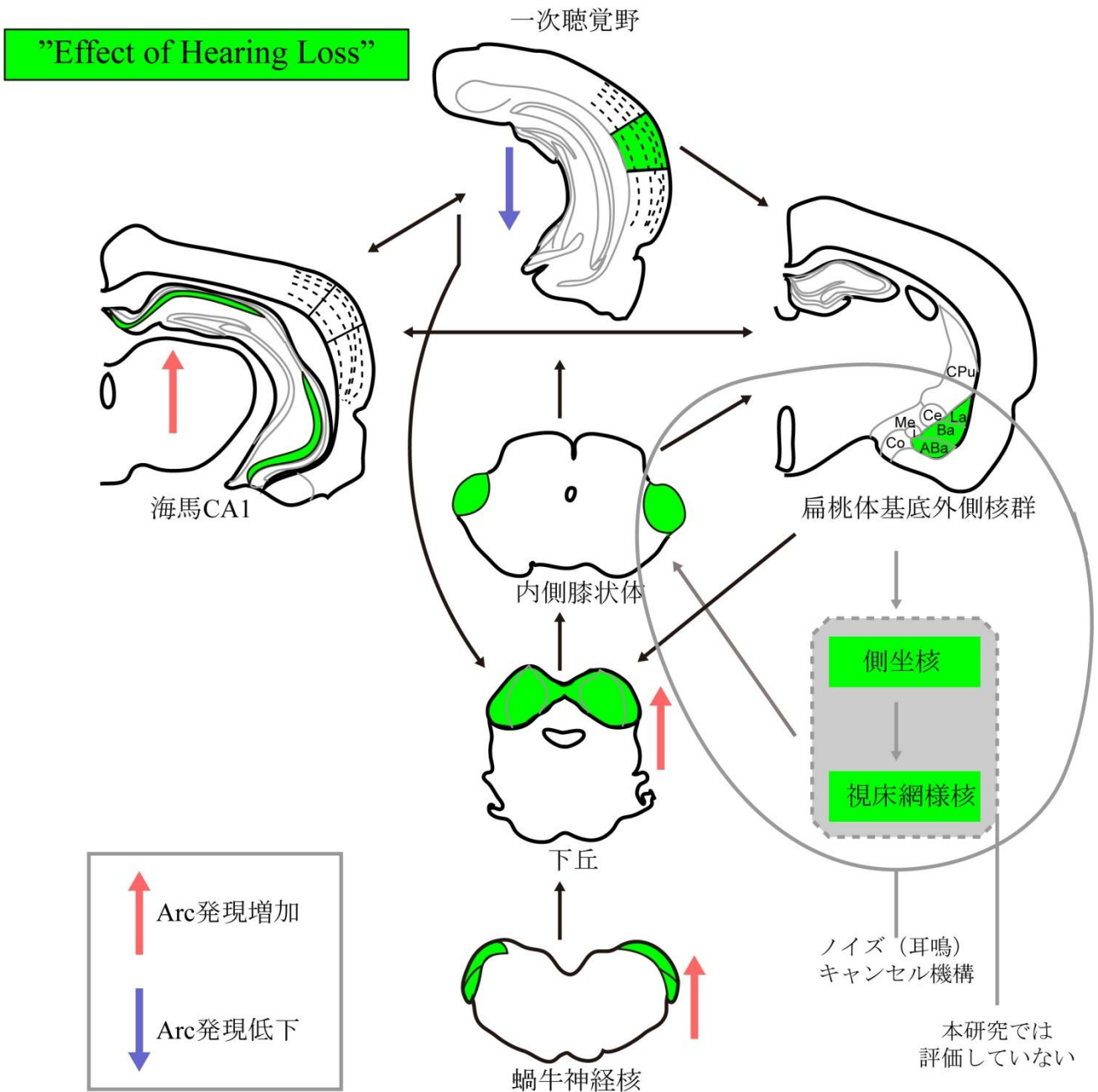
図 34 外有毛細胞 (OHC)の聴毛と tiplink、sidelink の関係



**a**, コルチ器の断面像。支持細胞に包まれた OHC が上方に伸び、クチクラ板上に聴毛が立っている様子がわかる。**b**, 最外側の聴毛が長く、整然と並んでいる。**c**, 赤矢印は **sidelink** を示す。同じ列の隣接する聴毛は **sidelink** で結合している。**d**, 異なる列の隣接する聴毛は頂部にて **tiplink** で結合している。最外側の聴毛が外側へ倒れるということは、**tiplink** が切断され、**rootlet** がクチクラ板表面付近 (黄矢印)で折れていると思われる。

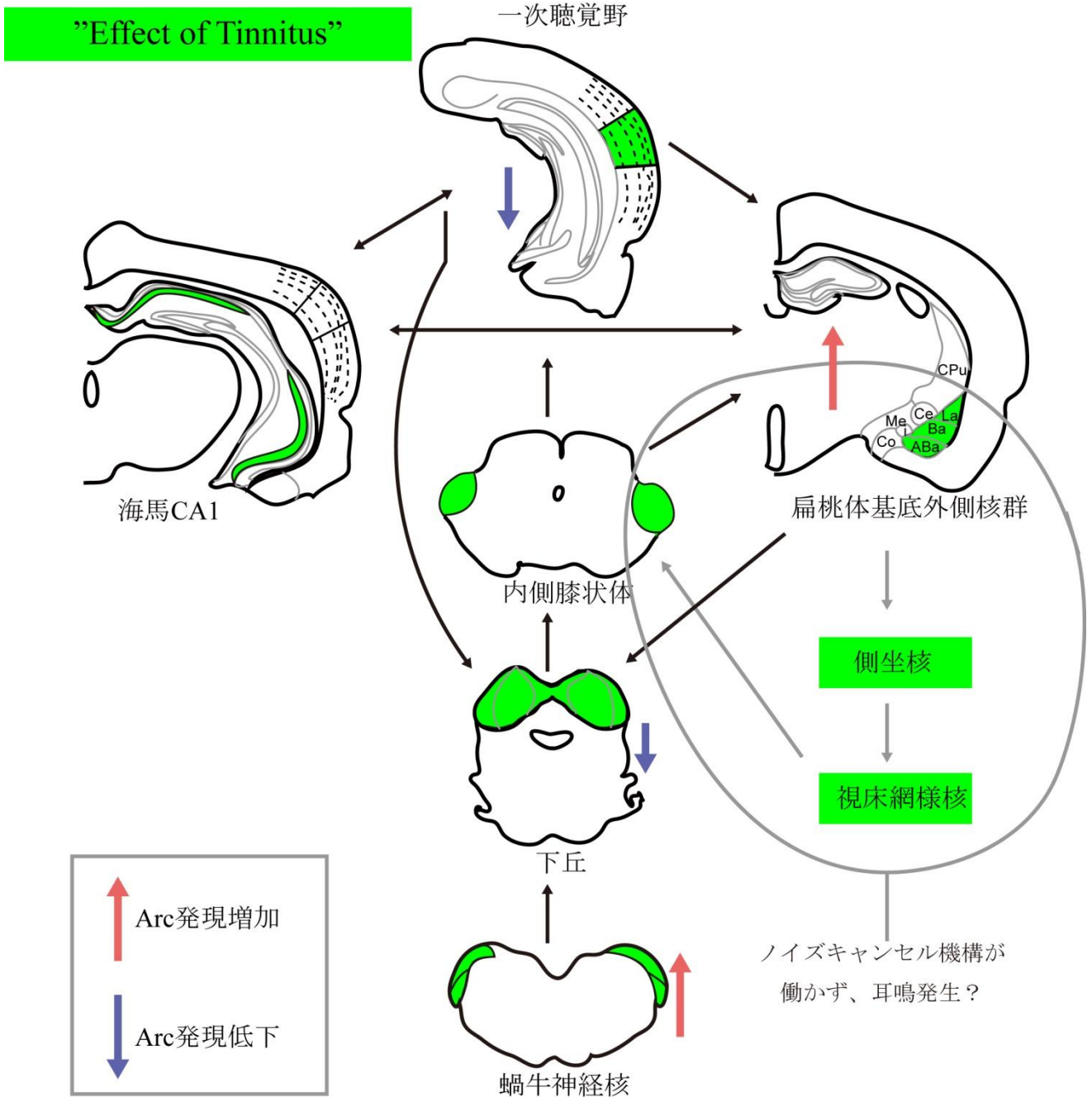


図 35 コントロール群に対する難聴群の Arc 発現の変化 (難聴の影響)



難聴により蝸牛神経核、下丘、海馬 CA1、BLC において Arc 陽性細胞数が増加している。Au1 では逆に減少している。難聴だけでも辺縁系に影響を与えていることが分かる。Ba →側坐核→視床網様核→MGB の経路は thalamo-cortical network の一部で今回未確認だが、ノイズキャンセル機構と言われている。この機構により、耳鳴が抑えられているかもしれない。

図 36 難聴群に対する耳鳴群の Arc 発現の変化 (耳鳴の影響)



難聴群に対する耳鳴群の Arc 発現変化を示している。蝸牛神経核・BLC では Arc 陽性細胞数の増加を認めている。下丘・Au1 においては、Arc 陽性細胞数が減少している。thalamo-cortical network の一部がうまく働かず、ノイズキャンセル機構が機能しないことで耳鳴が発生しているのかもしれない。

## 用語集

ABa: Accessory Basal amygdaloid nucleus: 扁桃体副基底核

ABR: Auditory Brainstem Response: 聴性脳幹反応

Arc: Activity regulated cytoskeleton-associated protein

Au1: Primary Auditory Cortex: 一次聴覚野

Ba: Basal amygdaloid nucleus: 扁桃体基底核

BLC: Basolateral Complex: 扁桃体基底外側核群

Ce: Central amygdaloid nucleus: 扁桃体中心核

CIC: Central Inferior Colliculus: 下丘中心核

Co: Cortical amygdaloid nucleus: 扁桃体皮質核

DCIC: Dorsal Cortex Inferior Colliculus: 背側下丘中心核

DCN: Dorsal Cochlear Nucleus: 背側蝸牛神経核

DG: Dentate Gyrus: 海馬齒状回

DL: Deep Layer

DPOAE: Distortion product otoacoustic emission: 歪音耳音響放射

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

FCL: Fusiform Cell Layer

FMRI: Functional Magnetic Resonance Imaging

GABA: Gamma Amino Butyric Acid:  $\gamma$ アミノ酪酸

GAP: Gap detection test

HL: Hearing Loss: 難聴

IHC: Inner Hair Cell: 内有毛細胞

La: Lateral amygdaloid nucleus: 扁桃体外側核

LISW: Laser-Induced Shock Wave: レーザー誘起衝撃波

MCL: Molecular Cell Layer

Me: Medial amygdaloid nucleus: 扁桃体内側核

MGB: Medial Geniculate Body: 内側膝状体

MGD: Medial Geniculate body Dorsal division: 内側膝状体背側領域

MGM: Medial Geniculate body Medial division: 内側膝状体内側領域

MGV: Medial Geniculate body Ventral division: 内側膝状体腹側領域

OHC: Outer Hair Cell: 外有毛細胞

PBS: Phosphate Buffered Saline

PET: Positron Emission Tomography

PFA: Paraformaldehyde

PPI: Prepulse Inhibition test

SFR: Spontaneous Firing Rate: 自発発火率

SGN: Spiral Ganglion Neuron: ラセン神経節細胞

SPL: Sound Pressure Level

VCN: Ventral Cochlear Nucleus: 腹側蝸牛神経核