ミニ特集 環境毒性学クロストーク—分子から集団・社会まで—

物理的環境ストレスが誘発する内耳障害

大神 信孝^{*1,2}, 押野 玲奈^{*1}, 二宮 裕将^{*1}, 李 香^{*1}, 加藤 昌志^{*1}

^{*1} 名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

^{*2} 中部大学次世代食育センター

Impairments of Inner Ears Caused by Physical Environmental Stresses

Nobutaka OHGAMI^{*1,2}, Reina OSHINO^{*1}, Hiromasa NINOMIYA^{*1}, Xiang LI^{*1} and Masashi KATO^{*1}

^{*1}Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine

^{*2}Nutritional Health Science Research Center, Chubu University

Abstract The inner ears contain the organ of Corti, vestibule and semicircular canal. The organ of Corti is crucial for hearing, while the vestibule and semicircular canal play important roles in maintaining balance. Exposure to noise at excessive levels is known to cause damages of the inner ears, resulting in noise-induced hearing loss. On the other hand, noise levels (dB) are used for the evaluation of health risks by exposure to noise, although noise consists of sound with broad frequencies (Hz). Thus, information about the frequency-dependent effect of noise on health is largely unknown. In this review, we first introduce noise-induced hearing loss caused by exposure to audible noise. We then describe the imbalance in mice exposed to low-frequency noise (100 Hz).

Key words: low-frequency noise (低周波騒音), hearing loss (難聴), imbalance (平衡感覚異常), inner ear (内耳), neurodegeneration (神経変性)

はじめに

騒音は音量（デシベル；dB）と周波数（ヘルツ；Hz）により表される物理的環境因子である。ヒトの可聴域（20～20,000 Hz）とマウスの可聴域（1,000～40,000 Hz）は部分的に重なるが、騒音性難聴が誘発される聴覚障害のリスクは主にヒトの可聴域音の音量により評価されている。近年、エコキュートや風力発電、あるいは空調機器の室外機など様々な機器から発生している低周波騒音が社会問題となっている。しかしながら、周波数の要素も加えて評価した騒音の健康リスクの情報は限られている。本稿では、内耳機能に影響を与える物理的環境因子

として騒音を取り上げ、騒音が誘発する健康リスクについて筆者らの実験研究の成果もまじえて紹介したい。

内耳の構造

側頭骨内に存在する内耳は、聴覚に必須の蝸牛、および平衡感覚に重要な前庭や半規管から成る感覚器である(1)。蝸牛の内部には中央階と呼ばれる管状の渦巻き構造が存在し、その管内にコルチ器が存在する。蝸牛の外観はカタツムリの殻状の骨包と呼ばれる硬組織につつまれた形態を呈する(図1)。骨包の内部に存在するコルチ器は主に三つの構成部位から成る。一つ目は絨毛を持つ有毛細胞であり、メカノトランスダクションと呼ばれる音刺激の電気信号への変換に重要な役割を持つ。有毛細胞の他、支持細胞や蓋膜も存在し、それらが協調的に機能して音を受容している。二つ目は血管条であり、有毛細胞のメカノトランスダクション機能に必須の内リンパ電位の維持に重要な役割を担っている。血管条は、辺縁細胞、中間細胞と呼ばれる色素細胞、基底細胞の3層

受付 2016 年 8 月 23 日, 受理 2016 年 9 月 15 日
Reprint requests to: Nobutaka OHGAMI, PhD
Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan
TEL: +81(52)744-2123, FAX: +81(52)744-2124
E-mail: nobugami@med.nagoya-u.ac.jp

から成る構造を持ち、その中に多数の血管が存在する。三つ目は、有毛細胞からの電気信号を伝導するラセン神経節である。ラセン神経節の周囲にはシュワン細胞が包むように存在し (2)、シュワン細胞に発現するコネキシンなどのノックアウトマウスでは、脱髄により先天性難聴の表現型を呈する。これらの部位のうち、どれか一つの部位の機能が失われるだけでも、内耳は重度の機能低下を招き、聴覚障害を発症する事が示されている (3)。蝸牛は上からみて頂回転から基底回転までらせん状に回転した構造をもつ。そのらせん状構造に沿って、前述したコルチ器が存在する。コルチ器には二種類の有毛細胞が存在するが、フラスコ様の形状をもつ内毛細胞は一列に、円柱様の形状をもつ外毛細胞は三列で、基底回

転から頂回転にいたるまで整然と配置されている。基底回転部のコルチ器は高音域の音を、頂回転部は低音域の音の認識に重要である事が知られている。加齢性難聴の典型的な症状として高音域から聴力が低下していく事が知られているが、加齢性難聴を発症したマウスは基底回転部のコルチ器の構成細胞から欠落していく事が知られている (4)。内毛細胞には *otoferlin* と呼ばれるタンパク質が発現しており、この分子が核となって神経化学物質がリボン状に束ねられた「リボンシナプス」という特有のシナプス構造で神経化学物質を開口分泌し、膨大な音情報を中枢神経系に伝達している事が報告されている (5)。外毛細胞は遠心性の聴神経系とシナプスを形成する。一方、内耳には前庭窓と呼ばれる穴があり、前庭窓が入り口となっている内耳の空洞は前庭と呼ばれ、蝸牛と半規管の間に存在する。前庭窓は耳小骨 (アブミ骨) で蓋をされており、その近傍に蝸牛窓が存在する。前庭は主に卵形嚢と球形嚢から構成され、内リンパ液が充填されており、膜迷路をつうじて各々半規管と蝸牛管につながっている。卵形嚢と球形嚢は平衡感覚に重要な感覚器であり、それぞれ平衡斑と呼ばれる部位が存在する (図 1)。平衡斑は有毛細胞、耳石と耳石膜から構成され、卵形嚢の平衡斑は垂直方向に、卵形嚢の方は水平方向に配置されている。これらの配置方向により、我々は平行方向や垂直方向の直線的な重力や加速度を感じている。有毛細胞の絨毛の先端にはゼラチン状の耳石膜が存在し、その膜に基石様の耳石が保持されている特有の形態を呈している。耳石は炭酸カルシウムとカルシウム結合タンパク質により構成されている (6)。

騒音性難聴の現状

大音量の騒音に曝露される機会は、工場や重機を扱う現場で働く労働者に限らず、近年のポータブルミュージックプレイヤーなどの普及に伴い、若者に限らず多くの人で増加している (7)。騒音に曝露された結果、騒音性難聴が誘発される事は知られているが、上述した背景などにより患者数は増加傾向にあり、現時点でも世界で数億人にのぼると推計されている (1)。騒音性難聴は急性と慢性の難聴に分類される。急性の騒音性難聴は射撃音や爆音、雷などの衝撃音により誘発される。一方、慢性騒音性難聴は比較的低レベルの音が長期間曝露される事により誘発され職業性難聴とも呼ばれる。そのリスクが増大する騒音レベルの閾値は、85 dB 以上 (等価騒音レベル) とされている (6)。8 時間以上、85 dB の騒音に連続して曝露されると、内耳の聴神経系に器質的影響を与え、聴覚に不可逆的な影響を与える (permanent threshold shift; PTS)。一方、85 dB の騒音でも短時間で一時的な騒音曝露による聴覚障害は可逆的である事が知られている (temporary threshold shift; TTS) (8)。PTS も TTS も主たる障害部位は内耳である。米国での調査によると、4,000 万人以上の労働者が騒音性難聴のリスクが増

図 1 マウスの内耳。(A) 実体顕微鏡下で撮影したマウスの内耳。(B) サリチル酸メチル処理法 (25) で透明化した内耳。球形嚢と卵形嚢の部位に平衡斑が観察される。Scale bars: 500 μ m.

大するレベルの騒音に日常的に曝露されており、実に労働者の 4 人に 1 人の割合で職業性難聴が発症すると推計している (8)。しかしながら、個人レベルで騒音性難聴を予防する方法として、耳栓やイヤーマフなど騒音を物理的に遮音する方法は広く実用化されているものの、それ以外には有効な予防方法はなく、一旦騒音によって発症した騒音性難聴を治療することは難しい状況である。

騒音性難聴の実験研究

騒音性難聴の標的臓器は内耳であるが、ヒトレベルで病理解析を実施するのは実質不可能であるため、実験動物に騒音を曝露する実験研究が実施されている。過去の研究によると、騒音性難聴が発症した内耳コルチ器では、有毛細胞において酸化ストレスが上昇し、神経変性が誘発される事が示されている (9-12)。騒音曝露で酸化ストレスが上昇する理由としては以下の説が提唱されている。有毛細胞で音刺激を電気信号に変換する際に多量のエネルギーを要する事が知られている (9)。エネルギーの供給源の一つは細胞内のミトコンドリアの電子伝達系であるが、好氣的呼吸で酸素が消費される際の副産物として「スーパーオキシド」も産生される。この副産物の産生が騒音による酸化ストレス上昇の一因であると考えられている (9)。つまり、音量が小さい場合は、スーパーオキシドが産生されてもグルタチオンや抗酸化酵素などによりレスキューされる一方、音量が大きい場合は、大音量を処理する有毛細胞のエネルギー消費量も増大し、副産物のスーパーオキシド産生量も増加する。その結果、抗酸化酵素による処理が追いつかなくなり、酸化ストレスが増大すると考えられている (9)。過去の報告によると、グルタチオンレベルを制御する sirtuin3 を過剰発現させたトランスジェニックマウスが騒音性難聴に耐性を示す事が報告されている (13)。また、神経変性予防に有効な事が報告されている nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) の前駆体の nicotinamide riboside (NR) のマウスへの腹腔内投与が、上述した sirtuin3 依存的に騒音性難聴に予防効果を示す事、更に騒音曝露後の投与でもレスキュー効果を示す事が報告されている (13)。その他、有毛細胞のペルオキシソームの抗酸化活性は騒音に対する内耳の防御機構に重要である事が示されている (14)。ヒトを対象にした試験では、n-acetyl cysteine (NAC) などの抗酸化物質のヒトへの投与による騒音性難聴の予防試験が進められている (15)、今後上述した分子を標的にした予防試験も実施されていく事が予想される。

低周波騒音の現状

低周波騒音は 100 Hz 以下の周波数を持つ騒音と定義される。低周波騒音の周波数はヒトの可聴域 (20 ~ 20,000 Hz) に部分的に含まれるが、マウスの可聴域 (1,000 ~ 40,000 Hz) には全く含まれない (図 2)。このことから、

図 2 ヒトとマウスの可聴音の周波数域と低周波騒音

基本的に低周波騒音に曝されているか認識しにくく、我々は無意識に低周波騒音に曝されている可能性がある。一方、低周波騒音はエコキュートや風力発電、あるいは空調機器の室外機など様々な機器から発生しており、それらの機器の近傍に居住する住民が体調不良を訴えており、社会問題となっている。屋内においても、フリーザー、エアコンや換気扇等から 100 Hz の周波数をピークとする低周波騒音が約 70 dB の音量で発生している (16)。つまり、我々は日常生活の中で低周波騒音に曝されている可能性がある。しかしながら、低周波騒音の具体的な健康リスクについては情報が限られている。一方、低周波騒音は高周波波域の音と比較して減衰しにくい物理的性質を持ち、上述した可聴域騒音を遮音できるイヤーマフや耳栓などでは低周波騒音を遮音出来ない。重く分厚い材質のものなら遮音できる可能性はあるが、今の所、ヒトが装着可能な、低周波騒音の遮音に有効な耳栓などの防護品は実用化されていない。工場などで使用する大型機器からも低周波騒音は発生する為、低周波騒音の曝露を軽減する事が重要であるが、日本では低周波騒音の健康リスク評価法もなく、環境基準値も設定されていないのが現状である。

低周波騒音による平衡感覚障害の実験研究

ヒトを対象にした平衡感覚の生理機能測定として、重心動揺、足踏み検査、眼振検査などが挙げられる。マウスを対象にした実験研究では、ローターロッド、平均台歩行試験、強制水泳試験、歩行パターン解析、姿勢反射試験などの行動解析と平衡感覚の感覚器である前庭や半規管膨大部の病理解析を組み合わせて平衡感覚を評価している (17-20)。過去の実験研究によると、Espin と呼ばれる細胞骨格系タンパク質をノックアウトした遺伝子改変マウスでは、平衡感覚に重要な前庭の有毛細胞の絨毛構造が維持できない事が報告されている (21)。また、有毛細胞の絨毛の先端部に乗っている耳石の形成異常を示す Nox3 ノックアウトマウスは重度のバランス障害の

表現型を示し (22), 細胞外マトリックスの構成タンパク質 α -tectorin の遺伝子改変マウスでは, 耳石を保持する耳石膜の形態異常を示す事が報告されている (23)。このように, 平衡感覚に重要な感覚器の形成や生理機能に重要な分子は徐々に明らかにされつつある。一方, これまでに平衡感覚障害を誘発する抗生物質などの化学物質は明らかになっているが, 物理的環境因子については殆ど情報がない。また, 前述した可聴域騒音が内耳機能に影響を与え, 騒音性難聴を誘発する事はよく知られているが, 低周波騒音が内耳機能にどのような影響を与えるか分かっていない。そこで, 我々は低周波騒音に注目し, 野生型マウスに同様の低周波騒音 (70 dB, 100 Hz) を 1 ヶ月程度曝露する実験研究を実施した。低周波騒音の曝露条件は我々が実施した環境測定の測定値を参考にした (16)。曝露されたマウスはロータロッド, 平均台試験や歩行パターンの異常, 前庭の有毛細胞の形態異常と酸化ストレスの上昇を伴い, 平衡感覚異常を示す事が示唆された (16)。前述したように, コルチ器の有毛細胞では, 可聴域の音刺激を電気信号に変換する際に必要なエネルギー産生の副産物として, スーパーオキシドが産生されると考えられている (9)。前庭の有毛細胞においても同様の機序で酸化ストレスが上昇されるのかについて, 今後の検討課題である。また, 過去の報告によると, マウスの可聴音域よりも低い周波数の 375 Hz の音刺激により野生型マウスは音驚愕反応を示し, 耳石器の形態異常を示す Nox3 ノックアウトマウスは音驚愕反応を示さなくなる事が報告されており (24), 100 Hz 以下の低周波騒音が直接的に前庭の有毛細胞を刺激するかについても, 今後の興味ある課題である。

おわりに

本稿では, 内耳機能に影響する物理的環境因子として, 可聴域騒音が誘発する騒音性難聴と低周波騒音曝露が誘発する平衡感覚障害の現状と実験研究について, 我々の過去の実験研究も交えて紹介した。紫外線などの物理的環境因子では, 波長域毎の皮膚老化などの健康リスクについて既に報告されている。一方, 騒音の健康リスクについては, 周波数を考慮した情報は未だ限られているため, 今後は, 騒音の周波数も考慮した健康リスク評価を実験研究と疫学研究に実施する事が重要であると思われる。

謝 辞

本研究は, 文部科学省および日本学術振興会より, 新学術領域 (宇宙に生きる, 課題番号: 16H01639) 基盤研究 C (課題番号: 25460178, 16K08343) の科学研究費, 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「生活習慣病予防の科学的食育プログラム確立を目指す基礎栄養科学研究拠点形成」(課題番号: S1201007) の支援を受けて実施された。

利益相反: なし

文 献

- (1) Lalwani AK, Gürtler N. Sensorineural hearing loss, the aging inner ear, and hereditary hearing impairment. In: Lalwani AK (ed), CURRENT Diagnosis & Treatment in Otolaryngology—Head & Neck Surgery, second edition. New York: McGraw-Hill, 2008, 683–704.
- (2) Ohgami N, Ida M, Shimotake T, Sakashita N, Sone M, Nakashima T, et al. c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:13051–13056.
- (3) Ohgami N, Iida M, Yajima I, Tamura H, Ohgami K, Kato M. Hearing impairments caused by genetic and environmental factors. *Environ Health Prev Med* 2012;18:10–15.
- (4) Ohgami N, Ida-Eto M, Sakashita N, Sone M, Nakashima N, Tabuchi K, et al. Partial impairment of c-Ret at tyrosine 1062 accelerates age-related hearing loss in mice. *Neurobiol Aging* 2012;33:626.e25–34.
- (5) Roux I, Safieddine S, Nouvian R, Grati M, Simmler MC, Bahloul A, et al. Otoferlin, defective in a human deafness form, is essential for exocytosis at the auditory ribbon synapse. *Cell* 2006;127(2):277–289.
- (6) 喜多村健, 森山 寛 (編). NEW 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 (改訂第 2 版). 東京: 南江堂, 2007.
- (7) Ohgami N, Kondo T, Kato M. Effects of light smoking on extra-high-frequency auditory thresholds in young adults. *Toxicol Ind Health* 2011;27:143–147.
- (8) Lynch ED, Jonathan K. Compounds for the prevention and treatment of noise-induced hearing loss. *Drug Discovery Today* 2006;10:1291–1298.
- (9) Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear* 2006;27:1–19.
- (10) Yang WP, Henderson D, Hu BH, Nicotera TM. Quantitative analysis of apoptotic and necrotic outer hair cells after exposure to different levels of continuous noise. *Hear Res* 2004;196:69–76.
- (11) Hu BH, Guo W, Wang PY, Henderson D, Jiang SC. Intense noise-induced apoptosis in hair cells of guinea pig cochleae. *Acta Otolaryngol* 2000;120:19–24.
- (12) Hu BH, Henderson D, Nicotera TM. Involvement of apoptosis in progression of cochlear lesion following exposure to intense noise. *Hear Res* 2002;166:62–71.
- (13) Brown KD, Maqsood S, Huang JY, Pan Y, Harkcom W, Li W, et al. Activation of SIRT3 by the NAD⁺ precursor nicotinamide riboside protects from noise-induced hearing loss. *Cell Metab* 2014;20(6):1059–1068.
- (14) Delmaghani S, Defourny J, Aghaie A, Beurg M, Dulon D, Thelen N, et al. Hypervulnerability to sound exposure through impaired adaptive proliferation of peroxisomes. *Cell* 2015;163(4):894–906.
- (15) Kramer S, Dreisbach L, Lockwood J, Baldwin K, Kopke R, Scranton S, et al. Efficacy of the antioxidant N-acetylcysteine (NAC) in protecting ears exposed to loud music. *J Am*

- Acad Audiol 2006;17(4):265–278.
- (16) Tamura H, Ohgami N, Yajima I, Iida M, Ohgami K, Fujii N, et al. Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. *PLoS One* 2012; 7:e39807.
 - (17) Ko DC, Milenkovic L, Beier SM, Manuel H, Buchanan J, Scott MP. Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. *PLoS Genet* 2005;1:81–95.
 - (18) Mariño G, Fernández AF, Cabrera S, Lundberg YW, Cabanillas R, Rodríguez F, et al. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J Clin Invest* 2010;120:2331–2344.
 - (19) Deron RH, Nicolas G, Martin S, Richard R, Ulrich M, Jerold C. Sphingosine 1-phosphate (S1P) signaling is required for maintenance of hair cells mainly via activation of S1P2. *J Neurosci* 2007;27:1474–1478.
 - (20) Zhao X, Jones SM, Yamoah EN, Lundberg YW. Otoconin-90 deletion leads to imbalance but normal hearing: a comparison with other otoconia mutants. *Neuroscience* 2008; 153:289–299.
 - (21) Ebrahim S, Avenarius MR, Grati M, Krey JF, Windsor AM, Sousa AD, et al. Stereocilia-staircase spacing is influenced by myosin III motors and their cargos espin-1 and espin-like. *Nat Commun* 2016;7:10833.
 - (22) Paffenholtz R, Bergstrom RA, Pasutto F, Wabnitz P, Munroe RJ, Jagla W, et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase. *Genes Dev* 2004;18(5):486–491.
 - (23) Legan PK, Lukashkina VA, Goodyear RJ, Kössi M, Russell IJ, Richardson GP. A targeted deletion in alpha-tectorin reveals that the tectorial membrane is required for the gain and timing of cochlear feedback. *Neuron* 2000;28(1):273–285.
 - (24) Jones GP, Lukashkina VA, Russell IJ, Lukashkin AN. The vestibular system mediates sensation of low-frequency sounds in mice. *J Assoc Res Otolaryngol* 2010;11(4):725–732.
 - (25) Honda K, Noguchi Y, Kawashima Y, Takahashi M, Nishio A, Kitamura K. Ex vivo visualization of the mouse otoconial layer compared with micro-computed tomography. *Otol Neurotol* 2015;36(2):311–317.