

三井住友海上福祉財団 研究結果報告書

<研究課題> カロリー制限、レスベラトロール投与による前庭系の加齢性変化抑制に関する基礎的研究

代表研究者 社会保険中央病院耳鼻咽喉科 部長
東京大学耳鼻咽喉科 非常勤講師
牛尾 宗貴

【まとめ】

体平衡に関わる内耳の末梢前庭器は加齢により変性し、平衡障害の一因となると考えられているが、未だ効果的な対処法はない。本研究の目的は、カロリー制限などによる前庭系の老化抑制の可否について、形態学的に検討することである。カロリー制限により、老化により生じる前庭神経節細胞数の減少は抑制されていた。レスベラトロール投与群は検討中であり、今後は形態学的評価に加えて機能的評価も行っていく予定である。

1. 研究の目的

1-1 背景

めまい・バランス障害は高齢者のおよそ4人に1人が自覚する症状で、転倒や骨折の重大な原因のひとつである。体のバランスに関連する内耳の末梢前庭器は加齢により変性することが報告されており、これによって平衡障害が引き起こされると考えられているが、未だ効果的な対処法はない。近年、長寿関連遺伝子といわれるサーチュイン遺伝子発現による寿命の延長、各器官の加齢性変化抑制などの効果が報告されるようになってきており、カロリー制限をはじめとする各種方法を用いた抗加齢研究が

すすんでいる。しかしながら、全身のバランスを司る前庭系の老化と抗加齢については余り研究が行われていない。

1-2 目的

本研究の目的は、カロリー制限やレスベラトロール投与による前庭系の老化抑制の可否について、形態学的に検討することである。

2. 研究方法と経過

2-1 方法（研究全体）

カロリー制限食投与群、通常カロリー食＋レスベラトロール投与群、通常カロリー食投与群に分けた加齢マウス各20匹、若年マウス20匹の末梢前庭器と前庭神経節を含む切片を作成する。次に、①前庭神経節細胞の数、末梢前庭器の感覚細胞数、apoptosisを示唆する変化の有無、②それぞれのTUNEL陽性細胞数、③caspase-3陽性細胞数を比較し、カロリー制限やレスベラトロール投与の影響を形態学的に評価する。

2-2 方法（各段階）

2-2-1 加齢マウスの標本作成：

カロリー制限食(生後2か月より26%制限)を投与した加齢マウス(10ヶ月齢、A群)20匹と通常食を投与した加齢マウス(10

ヶ月齢、B群) 20匹の末梢前庭器(半規管、耳石器)ならびに前庭神経節を含む標本をホルマリン固定し、脱灰処理した。

通常カロリー食+レスベラトロール投与群 30匹 (C群: 飼育中に10匹死亡すると予想) は準備中である。

2-2-2 末梢前庭器ならびに前庭神経節の形態学的変化の評価: パラフィン切片をH-E染色し、形態学的変化を全体的に評価した。また、前庭神経節細胞数は一部を残してカウントした。耳石器ならびに半規管の感覚細胞の数をカウント中である。前庭神経節細胞については、apoptosisの際に生じる cell shrinkage や chromatin condensation の程度を評価するべく TUNEL 染色を行い、TUNEL 陽性細胞数をカウントしている。

2-2-3 末梢前庭器ならびに前庭神経節における DNA fragmentation の検出: TUNEL 染色を行い、各グループの前庭神経節細胞、耳石器ならびに半規管の感覚細胞における TUNEL 陽性細胞数をカウントしている。本染色には DeadEnd Colormeric TUNEL System を用いている。次に、caspase-3 に対する免疫染色を行い、各グループの前庭神経節細胞、耳石器ならびに半規管の感覚細胞における陽性細胞数をカウントしている。本染色には Anti-Active Caspase-3 pAb を用いる。結果はいずれも(陽性細胞数/全体の細胞数)で評価している。

2-2-4 上記で得られた結果の比較検討: ②、③で得られた結果をグループ間で比較し、カロリー制限により前庭系の加齢性変化が抑制されたか否かを評価している。

3. 研究の成果

3-1 加齢マウスの標本作成:

カロリー制限食(生後2か月より26%制限)を投与した加齢マウス(10ヶ月齢、A群)は飼育中に7匹死亡して13匹となり、通常食を投与した加齢マウス(10ヶ月齢、B群)は4匹死亡して16匹となった。

3-2 末梢前庭器ならびに前庭神経節の細胞数の評価: 通常食マウス群(B群)と比較して、カロリー制限食群(A群)の前庭神経節細胞数は多かった。各器官における現在までの報告と同様、カロリー制限は神経細胞の減少を抑制する効果があるためであると考えられる。一部の標本は現在もカウント中である。

3-3 末梢前庭器ならびに前庭神経節における DNA fragmentation の検出: TUNEL 染色を行ったところ、通常食マウス群(B群)とカロリー制限食群(A群)の前庭神経節でみられる TUNEL 陽性細胞数には有意な違いはみられなかった。加齢による細胞の減少は10ヶ月間でもわずかなものである一方、apoptosisにより細胞が TUNEL 陽性となるのは数時間程度であるため、両群に差がみられなかったものと考えられる。耳石器ならびに半規管の感覚細胞における TUNEL 陽性細胞数は現在もカウント中である。

4. 今後の課題

現在も進行しているレスベラトール投与群の評価を終了し、カロリー制限ならびにレスベラトール投与による前庭系の加齢性変化抑制効果についての検討をすすめる。本研究では10ヶ月齢を加齢マウスとしているが、13-15ヶ月齢の方が加齢マウスと

してより理想的ともされている。飼育中の死亡率はより高くなると考えられるが、より長期にわたる飼育で加齢マウスを作成して次の実験とすべきであると考えらえる。

カロリー制限には様々な方法が提案されており、レスベラトロール投与には市販のサプリメントもあるなど、臨床に還元しやすいと思われる。一方、実際の臨床に反映させるためには、非常に長期間かつ大規模な臨床研究が必要となるため大きな困難が伴うが、より短期間で評価できる方法を考案する必要がある。

5. 研究結果の公表方法

国内の学会ならびに国際学会で発表し、英文論文にまとめて報告する。