

2014 年度

博士学位論文

環境ストレス因子が身体に与える影響について

Analysis about the influence by which an environmental
stress factor gives it to a body

中部大学大学院

応用生物学研究科 応用生物学専攻

田村 青鳥

目次

	ページ
略語表	3
第一章 緒言	4
第二章 結果	8
第一節 低周波騒音曝露によるマウスの平衡感覚への悪影響	8
第二節 低周波騒音曝露による内耳前庭の形態異常	15
第三節 低濃度有害重金属曝露マウスの皮膚、肝臓、腎臓における ヒ素、マンガン測定結果	19
第三章 考察	25
第四章 実験方法	33
第一節 低周波騒音曝露実験で使用した試薬と機器	33
第一項 実験動物	34
第二項 騒音曝露実験	34
第三項 行動解析	34
(1) ローターロッド	35
(2) 平均台歩行試験	35
(3) 強制水泳試験	35
(4) 歩行パターン解析	36

第四項	前庭免疫組織染色	36
第五項	ヒラメ筋 NADH-tetrazolium (NADH-TR) 染色	37
第六項	統計計算	38
第二節	低濃度有害重金属曝露実験で使用した試薬と機器	38
第一項	実験動物	38
第二項	飲水投与と臓器の採取	39
第三項	灰化方法	39
第四項	統計計算	39
参考論文		40
謝辞		48
研究業績		49

略語表

As	arsenic
Asp	aspartic acid
DAB	diaminobenzidine
FFT	Fast Fourier Transform
HE	hematoxylin-eosin
HFN	high frequency noise
HRP	horseradish peroxidase
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
LFN	low frequency noise
Mn	manganase
NADH	nicotinamide adenine dinucleotide (還元型)
NADH-TR	nicotinamide adenine dinucleotide- tetrazolium
OCT	Optimal Cutting Temperature
Ox-PC	oxidized phosphatidylcholine
QOL	Quality of Life
SPL	Sound pressure level

第一章 緒言

我々は古来より生活水準の向上を目指し、自然環境を資本に産業活動を発展させてきた。しかし、産業活動の発展は同時に自然環境に対し大きな負担を与える結果をもたらした。その負担は自然環境が本来持っている自己修復性を上回り、環境ストレス因子となって我々の健康に悪影響を与え、疾患発症の原因となっている。

我々の健康に悪影響を与える環境ストレス因子には、大気汚染、水質汚染（有機物汚染、重金属汚染等）、紫外線、騒音等多岐に渡る。大気汚染物質による健康被害は、喘息の発症、呼吸器機能の低下、アレルギーの発症などが特に有名であるが (Ji, X et al., 2015)、新たな大気汚染物質による健康被害として、PM 2.5 の曝露による肺機能の低下について報告されている (Chen CH et al., 2014)。また、水質汚染物質による健康被害は神経障害、肝障害、腎障害 (Perez Aguilar RC et al., 2014)、ガンの発症 (Chen K et al., 2014; Rahman MM et al. 2009; Celik I et al., 2008) 等が報告されている。紫外線による健康被害としては、皮膚ガンの発症 (Coelho SG et al., 2014; Kim MJ et al., 2014) が特に有名である。また、騒音による健康被害としては、騒音性難聴の発症が報告されている (Alagramam, KN et al., 2014)。騒音性難聴は工場や飛行場での作業に従事している人々の職業病として知られていたが、近年ポータブルミュージックプレーヤーの普及に伴

い、若年層を中心に騒音ストレスにさらされる機会が増え、騒音性難聴患者の増加が予想される。このような健康被害を予防するため、世界各国では環境ストレス因子の基準値を設け注意喚起を行っているが、疾患の発生機序と予防策が確立されていない環境ストレス因子が存在する。本研究では、そのような環境ストレス因子である低周波騒音、重金属汚染に注目した。

低周波騒音は、工場等の重機、家庭の冷蔵庫や換気扇、風力発電施設等から発生しており (Table 1) 、0.1 kHz 付近の周波数の音を特徴とする、ヒト及びマウスも認識困難な (Heffner HE et al., 2007) 音である。我々は低周波音に日常的に曝されており、ヒトの平衡感覚等に何らかの影響を与える事が示唆されているが (Takigawa H., 1988) 、その具体的な発症機序は明らかとなっておらず、予防法も確立されていない。本研究では、低周波騒音が平衡感覚に与える影響を明らかにし、予防策の確立を目的とした。

次に本研究では重金属汚染に注目した。アジア地域を中心とする発展途上国では、100 万を超える井戸がヒ素等の重金属に汚染され、1 億人以上もの人々が毒性を持つレベルのヒ素に曝され、深刻な問題となっている (van Geen et al., 2013) 。また、過去の報告では、バングラデシュの飲用井戸水ではヒ素汚染と共に、マンガン汚染も起きている事を報告している (Frisbie SH et al., 2009) 。ヒ素の健康被害は皮膚障害、神経障害、発癌等、様々な症状を引き起こすが、特に

皮膚は皮膚黒色症の他に、ボーエン病や基底細胞癌、扁平上皮癌を発症することが知られている (Frisbie SH et al.,2005, 2009) 。また、マンガンは神経障害をもたらし、パーキンソン様症状を引き起こす事が報告されている (Wan C et al., 2014; Yousefi, Babadi, V et al., 2014) 。これらの健康被害に関する研究はこれまでに動物実験等を用いた曝露実験など、数多く実施されてきたが、これらの従来の研究は、実際の井戸水よりはるかに高い濃度での曝露実験が多く、飲用井戸水に含まれる濃度と同レベルでの単独・複合曝露実験を行い、体内分布を報告した報告はほとんど無い。そこで、本研究では、飲用井戸水に含まれるレベルでのヒ素、マンガンの単独・複合曝露実験を行い、体内分布の変化を解析する事を目的とした。

電気機器	100 Hz の騒音レベル (dB SPL)
4°C フリーザー	65.3 ± 4.8
-30°C フリーザー	66.1 ± 4.5
-80°C フリーザー	69.9 ± 2.9
製氷機	61.8 ± 1.0
ドラフト	75.5 ± 0.7

Table 1. 実験室内の電気装置から発生する低周波騒音レベル

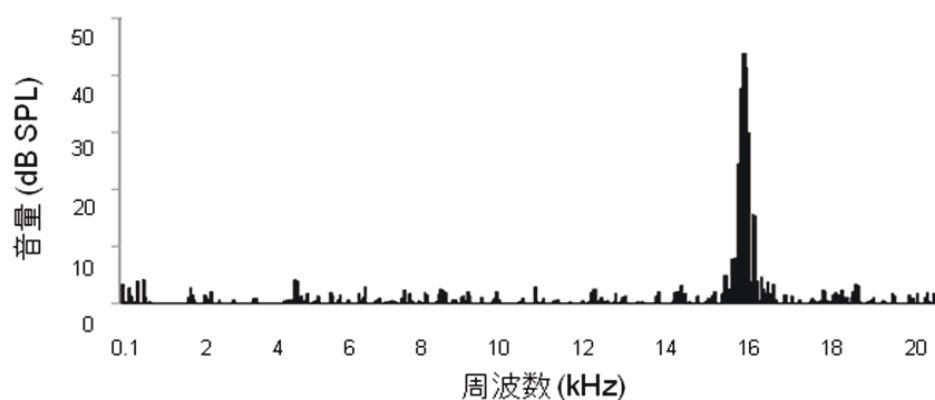
FFT 騒音測定器を用いて、騒音レベル (±; 標準偏差) を 5 回測定し、平均値を算出した。騒音レベルは騒音源から約 20 cm の距離を置いて測定した。Table 1 の電気機器が設置されていない 5 つの実験室内における 100 Hz の低周波騒音のバックグラウンドレベル (±; 標準偏差) は、35.7 ± 2.7 dB SPL であった。

第二章 結果

第一節 マウスへの低周波騒音曝露による平衡感覚への影響

騒音曝露による周波数特異的な平衡感覚への影響を解析するため、6週齢のICR系統野生型マウスに、低周波騒音(0.1 kHz, Fig. 1B)、高周波騒音(16 kHz, Fig. 1A)を1か月間、70 dB SPLで曝露した。騒音曝露後、ローターロッドを用いた行動解析を行い、マウスにおける低周波騒音曝露による平衡感覚への影響を解析した。騒音曝露前は、騒音曝露群、非曝露群におけるローターロッドの歩行時間の有意な差は観察されなかった(Fig. 2A)。騒音曝露後、低周波騒音曝露群は、非曝露群と比較してローターロッドの歩行時間の有意な低下を示した(Fig. 2B)。対照的に、高周波騒音曝露群は、非曝露群と比較してローターロッドの歩行時間に有意な差は見られなかった(Fig. 2B)。また、低周波騒音曝露群の平均台歩行試験は、非曝露群と比較して有意な平衡感覚異常を示した(Table 2)。そして、低周波騒音曝露群の強制水泳試験においても、非曝露群と比較して水泳能力の有意な低下を示した(Table 3)。さらに、低周波騒音曝露群は歩行パターン解析において、歩行パターンの乱れが観察され(Fig. 3A, right panel, arrows)、歩幅が有意に減少した(Fig. 3B)。なお、低周波騒音曝露群は、非曝露群と比較して、体重に有意な変化は見られなかった(Fig. 4)。

(A)高周波音 (HFN: 16 kHz)



(B) 低周波音 (LFN: 0.1 kHz)

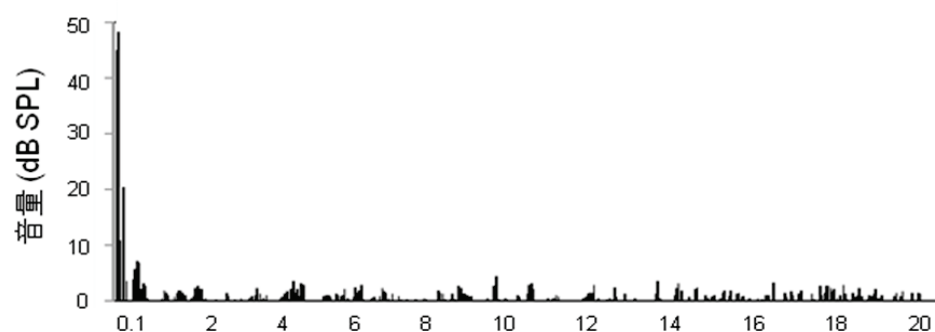


Fig. 1. 本研究で用いた騒音の周波数分布

本研究で用いた (A) 高周波騒音 (HFN ; 16 kHz) 、(B) 低周波騒音 (LFN; 0.1 kHz) の周波数分布 (±; 標準偏差) を示した。スピーカーから約 10 cm の距離を置き、防音室内にて FFT 騒音測定器を用いて 5 回騒音レベルを測定し、平均値を算出した。低周波騒音の発生していない防音室内のバッググラウンドは、スピーカーからの騒音レベルを差し引いて算出した。(A) HFN 、(B) LFN の総音量を FFT 分析を行わない騒音測定器を用いて測定したところ、双方ともに 70 dB SPL であった。

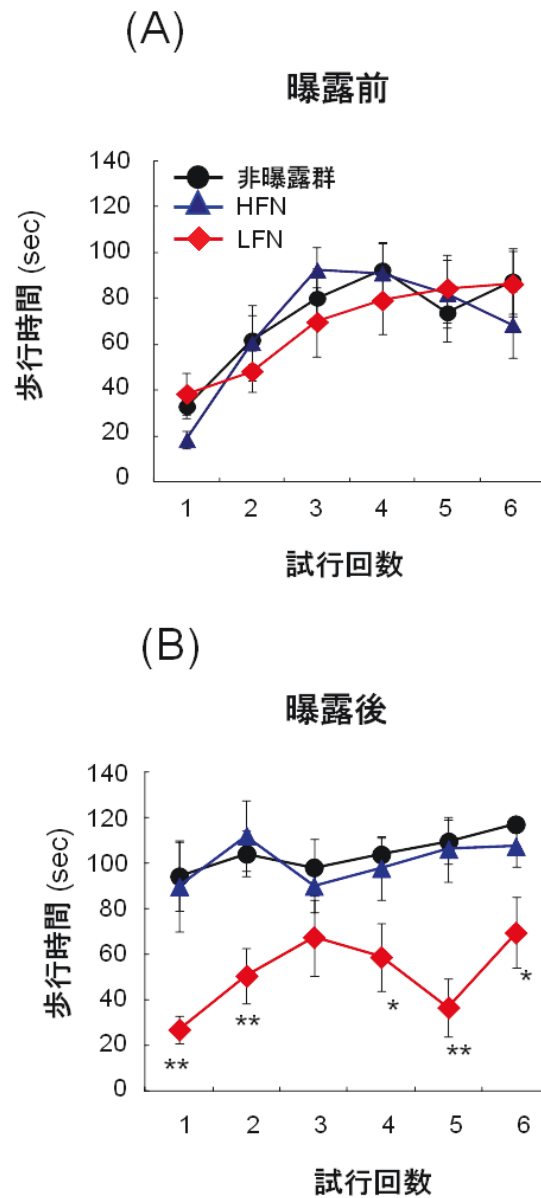


Fig. 2. 低周波騒音曝露はローターロッドの成績に影響する

騒音曝露前 (A)、曝露後 (B) の非曝露群 (●)、高周波騒音曝露群 (HFN ; ▲) 及び低周波騒音曝露群 (LFN ; ◆) の 30 rpm 定速モードにおけるローターロッド歩行時間 (平均 ± 標準誤差、n=7) を測定した。非曝露群との統計的有意 (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$) は、Mann-Whitney U test にて算出した。

	非曝露群	低周波曝露群
失敗	0	10
成功	12	2**

Table 2. 低周波騒音曝露群の平均台歩行試験

非曝露群及び、低周波騒音曝露群の平均台歩行試験を行った。Table 2 には、平均台の歩行に「失敗」した個体数及び、平均台の歩行に「成功」した個体数を示した。統計的有意 (** $p < 0.01$) は、カイ二乗検定にて算出した。

	非曝露群	低周波曝露群
失敗	0	7**
成功	17	10

Table 3. 低周波騒音曝露群の強制水泳試験

非曝露群及び、低周波騒音曝露群の強制水泳試験を行った。鼻先を常に水上に出していたマウスを「水泳成功」とし、鼻先が水中に沈んだマウスを「水泳失敗」とした。Table 3には、水泳に「成功」または「失敗」した個体数を示した。統計的有意 (** $p < 0.01$) は、カイ二乗検定にて算出した。

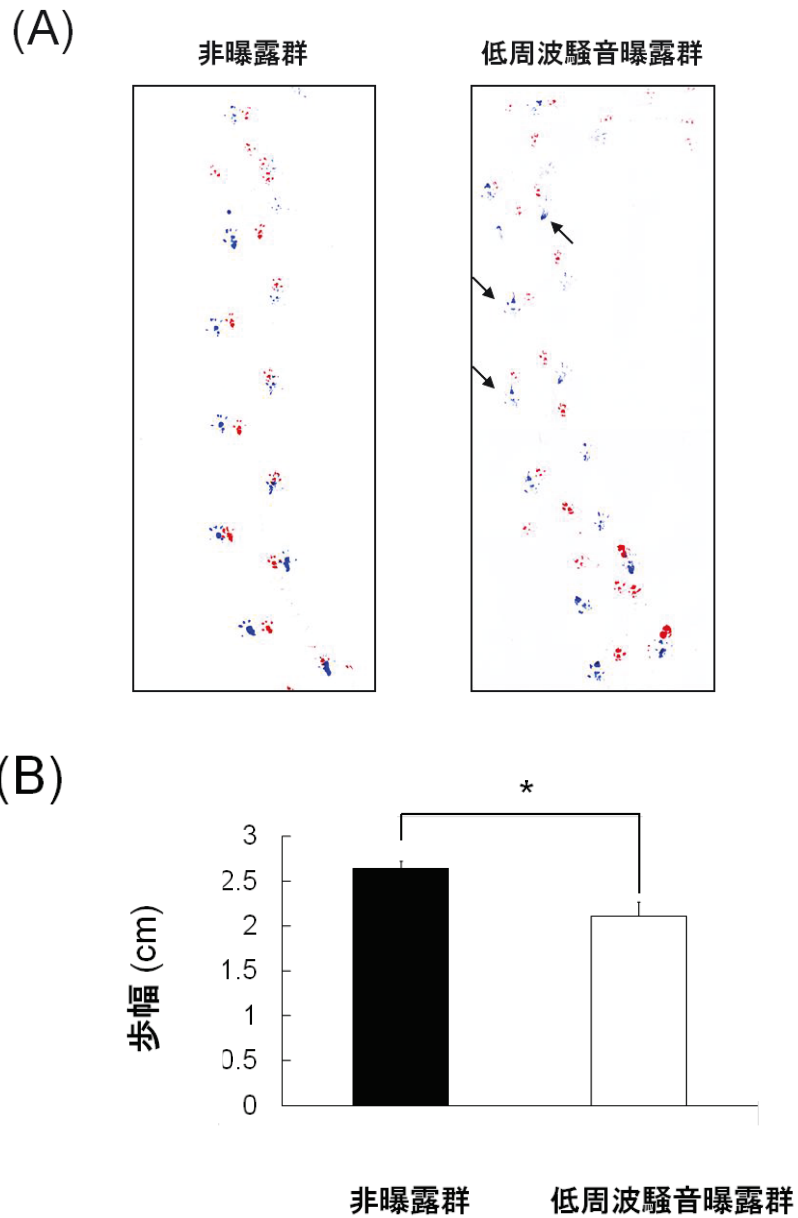


Fig. 3. 低周波騒音曝露は歩行パターンに影響する

(A) 低周波騒音曝露後、前足に赤色、後ろ足に青色のインクを付け、紙を敷いた箱の中を歩行させた。低周波騒音曝露群は、歩行パターンの乱れが観察された (矢印部)。(B) 4 匹のマウスを用いて、歩幅 (平均 ± 標準誤差) を定量化した。統計的有意 (*, $p < 0.05$) は、Mann-Whitney U test にて算出した。

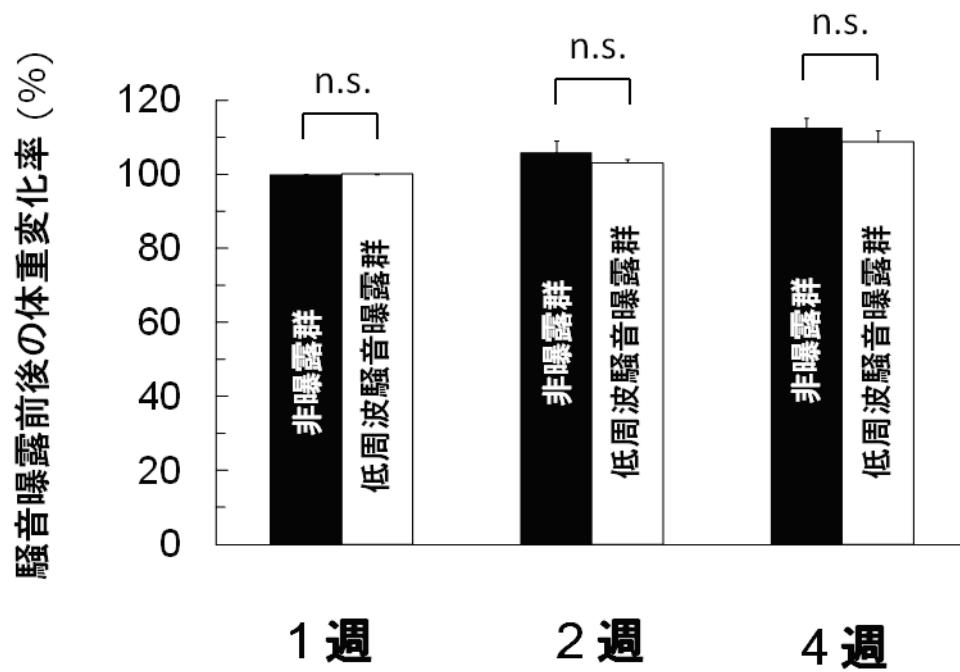


Figure 4. 低周波騒音曝露は体重には影響しない

低周波騒音曝露期間 1 週、2 週、4 週の体重 (平均 ± 標準偏差) を測定した。非曝露群と低周波騒音曝露群で体重に有意な変化は見られなかった (n.s.)。

第二節 低周波騒音曝露による内耳前庭の形態異常

次に、騒音曝露後の ICR 系統野生型マウスの内耳前庭の形態解析を行った (Figs. 5,6)。前庭 I 型有毛細胞のマーカであるカルビンディン D28k 抗体 (Zakon et al., 1998) を用いた免疫組織染色では、非曝露群と比較して (Fig. 5A, arrows, 5B) 低周波曝露群の前庭有毛細胞数の減少が観察された (Fig. 5B)。さらに、低周波騒音曝露群の前庭の酸化ストレスレベルを解析した。酸化リン脂質抗体 (Itabe et al., 1994; Akishima et al., 2005)、D- β -Asp 抗体 (Fujii et al., 2002) の 2 種類の酸化ストレスマーカーを用いた免疫組織染色では、非曝露群と比較して、低周波騒音曝露群は前庭の辺縁部において、強い陽性像が観察された (Fig. 6)。一方、筋肉、小脳、あるいは前庭等の器官は、協調的に平衡感覚を制御する (Matsumura et al., 2006)。ヒラメ筋と小脳を対象にした光学顕微鏡レベルの形態解析では、非曝露群と比較して、形態異常は観察されなかった (Fig. 7)。

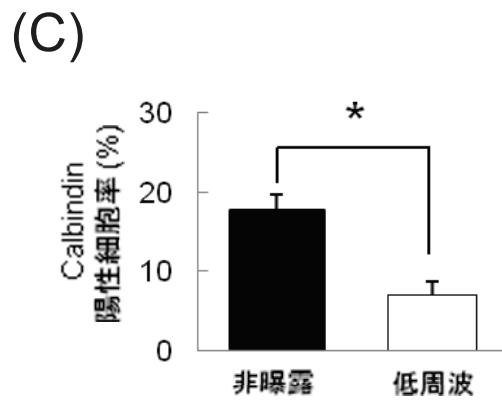
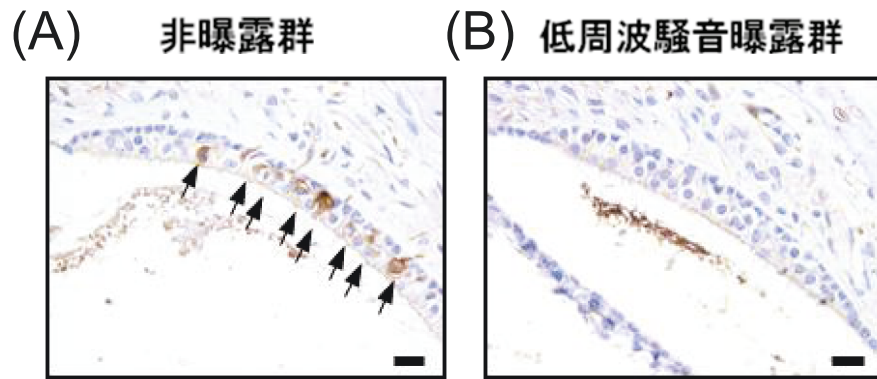


Fig. 5. 低周波騒音曝露群は前庭有毛細胞数が減少している

カルビンディン D28k 抗体を用いた内耳前庭の免疫組織染色の結果を示した。(A) 非曝露群、(B) 低周波騒音曝露群である。スケールバーは 20 μm である。(C) カルビンディン陽性細胞率 (平均 \pm 標準誤差) を半定量化した ($n=3$)。統計的有意 (*, $p < 0.05$) は、Mann-Whitney U test にて算出した。

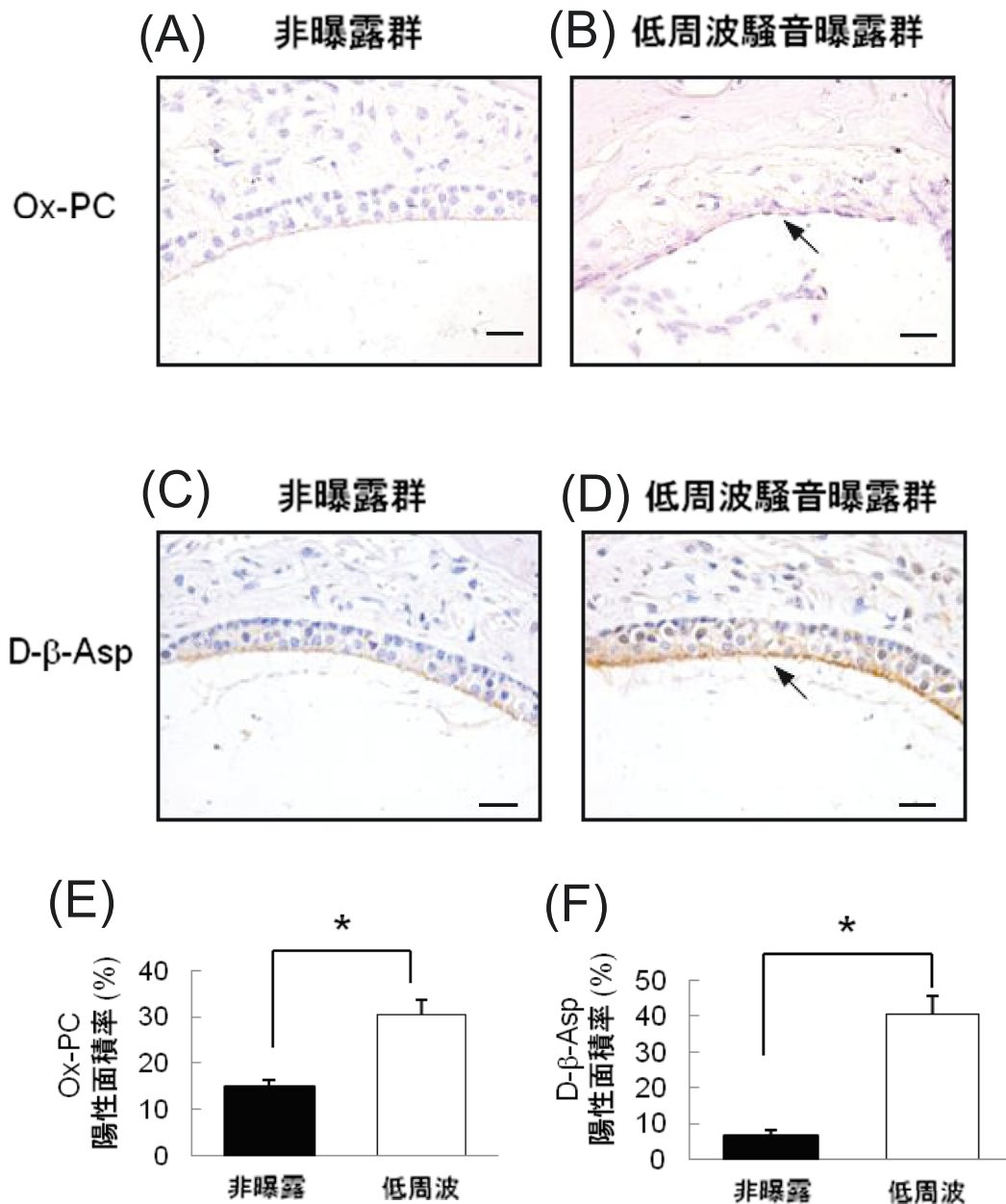


Fig. 6. 低周波騒音曝露群は前庭の酸化ストレスレベルが上昇している
 (A, B) Ox-PC 抗体 (DLH3) を用いた内耳前庭の免疫組織染色の結果を示した。(C, D) D-β-Asp 抗体を用いた内耳前庭の免疫組織染色の結果を示した。(A, C) 非曝露群、(B, D) 低周波騒音曝露群である。スケールバーは 20 μm である。非曝露群と比較して、低周波騒音曝露群は強い陽性シグナルが観察された (B, D 矢印部)。(E) Ox-PC 抗体、(F) D-β-Asp 抗体陽性面積を半定量化した (n=3)。統計的有意 (*, $p < 0.05$) は、Mann-Whitney *U* test にて算出した。

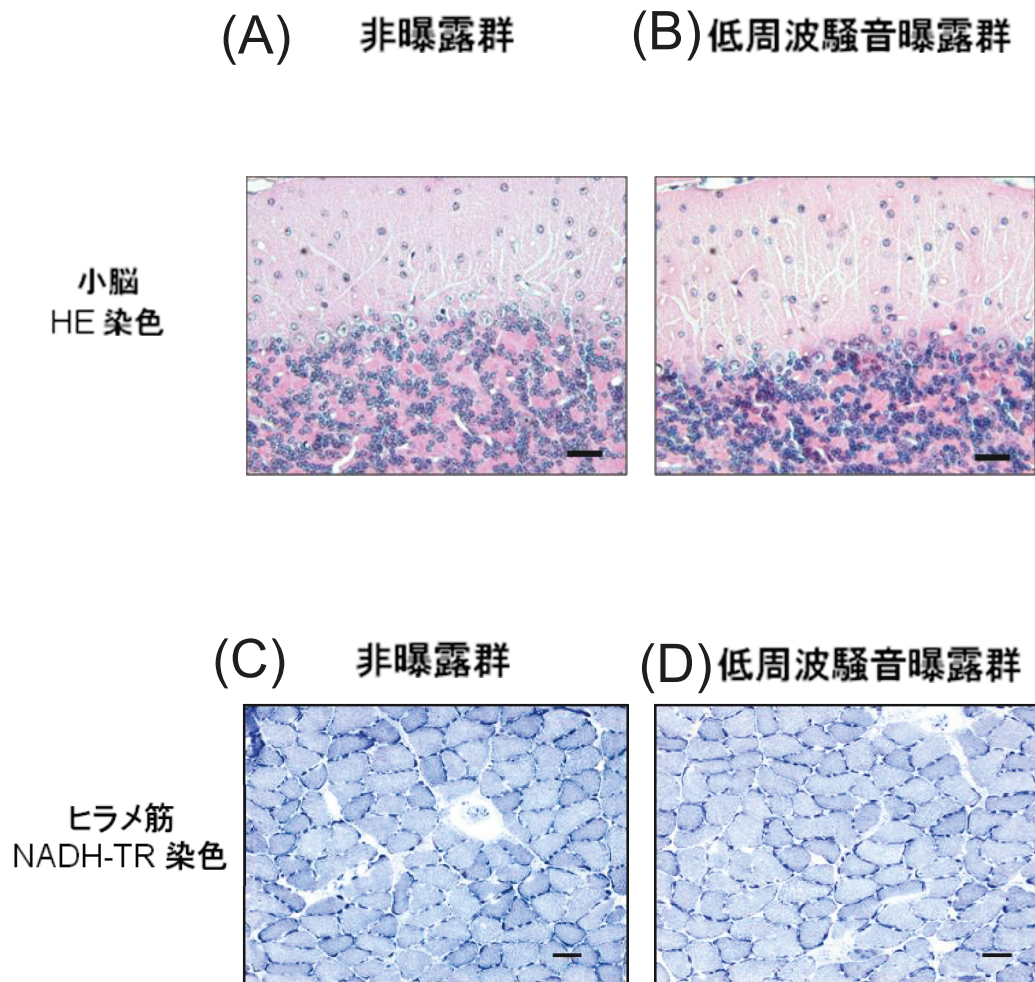


Fig. 7. 低周波騒音曝露群の小脳、ヒラメ筋の形態学的解析

(A, B) 低周波騒音曝露群の小脳ヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色 (5 μm のパラフィン切片) の結果を示した。(A)非曝露群、(B) 低周波騒音曝露群である。(C, D) 低周波騒音曝露群のヒラメ筋 NADH-TR 染色の結果を示した。(C)非曝露群、(D) 低周波騒音曝露群である。スケールバーは、(A, B) 20 μm 、(C, D) 50 μm

第三節 低濃度有害重金属曝露マウスの皮膚、肝臓、腎臓におけるヒ素、マンガ ン測定結果

飲用井戸水に含まれるレベルの低濃度の有害重金属の体内分布を解析する
為に、8 週齢の野生型ヘアレスマウスに低濃度有害重金属（ヒ素、マンガ
ンを 2 ヶ月間飲水投与した (Table 4) 。飲水投与終了後、マウスの各臓器を採取、
灰化し、ICP-MS を用いて体内分布を解析した。

<皮膚>

ヒ素 30 μM 単独投与群のヒ素含有量は、非投与群と比較し、有意に上昇し
た。マンガ 300 μM 単独投与群は有意な差は見られなかった。ヒ素 30 μM ・
マンガ 300 μM 複合投与群のヒ素含有量は、ヒ素 30 μM 単独投与群と比較し、
有意に上昇した (Fig. 8A) 。マンガ 300 μM 単独投与群のマンガ含有量は、
非投与群と比較し、有意に上昇した。ヒ素 30 μM 単独投与群に有意な差は見ら
れなかった。ヒ素 30 μM ・マンガ 300 μM 複合投与群のマンガ含有量は、
マンガ 300 μM 単独投与群と比較し、有意に低下し、非投与群と比べ、有意
な差が見られない (Fig. 8B) 。

<肝臓>

ヒ素 30 μM 単独投与群のヒ素含有量は、非投与群と比較し、有意に上昇したが、マンガン 300 μM 単独投与群は有意に低下した。ヒ素 30 μM ・ マンガン 300 μM 複合投与群は、ヒ素 30 μM 単独投与群と有意な差は見られなかった (Fig. 9A) 。 マンガン 300 μM 単独投与群のマンガン含有量は非投与群と比較し有意な上昇が見られたが、ヒ素 30 μM 単独投与群は有意に低下した。ヒ素 30 μM ・ マンガン 300 μM 複合投与群のマンガン含有量は、非投与群に対し有意に上昇しているが、マンガン 300 μM 単独投与群と有意な差ではない (Fig. 9B) 。

<腎臓>

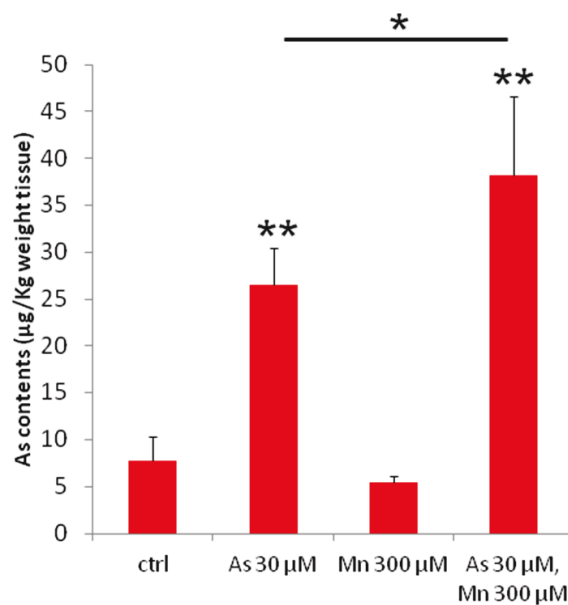
ヒ素 30 μM 単独投与群のヒ素含有量は、非投与群と比較し、有意に上昇したが、マンガン 300 μM 単独投与群は有意な差は見られなかった。ヒ素 30 μM ・ マンガン 300 μM 複合投与群は、非投与群に対し有意に上昇しているが、ヒ素 30 μM 単独投与群と有意な差は見られなかった (Fig. 10A) 。 マンガン含有量はこの条件においても有意な差は見られなかった (Fig. 10B) 。

As (μM)	0	30	0	30
Mn (μM)	0	0	300	300

Table 4. 低濃度有害重金属投与実験における飲水投与条件

低濃度有害重金属の飲水投与条件を示した。重金属はヒ素 (=As)、マンガン (=Mn) を投与した (n=5)。

(A)



(B)

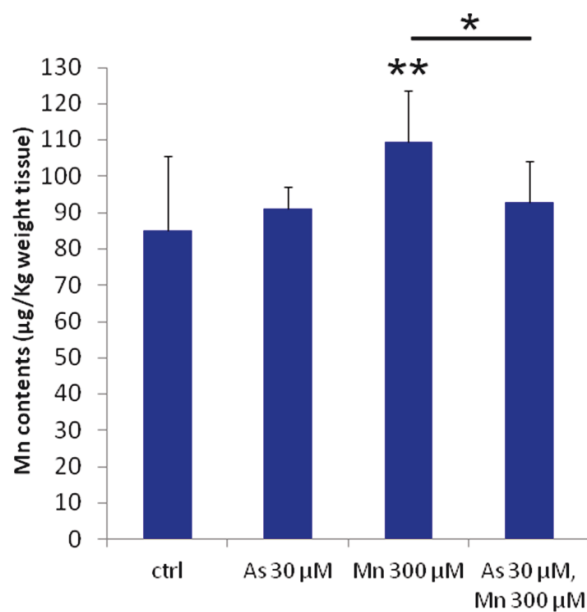
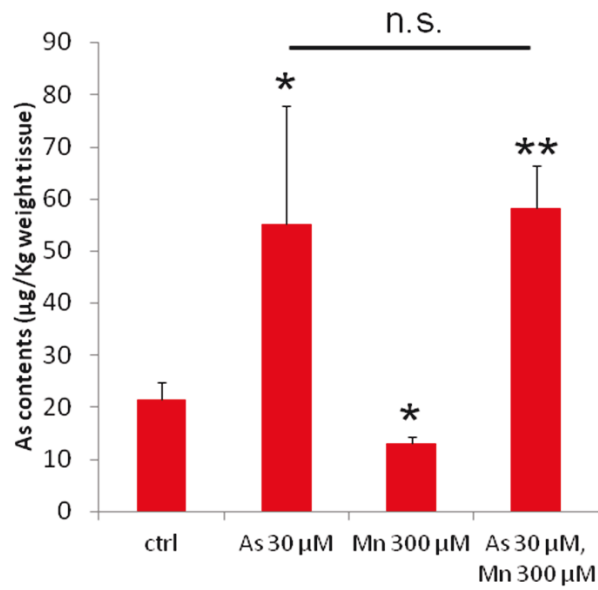


Fig. 8. 皮膚におけるヒ素、マンガン含有量測定結果

ヒ素、マンガン曝露群の皮膚におけるヒ素、マンガン含有量 (平均 ± 標準偏差) を ICP-MS を用いて測定した (n=5)。(A) ヒ素含有量 (B) マンガン含有量である。統計的有意 (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$) は、t-test にて算出した。

(A)



(B)

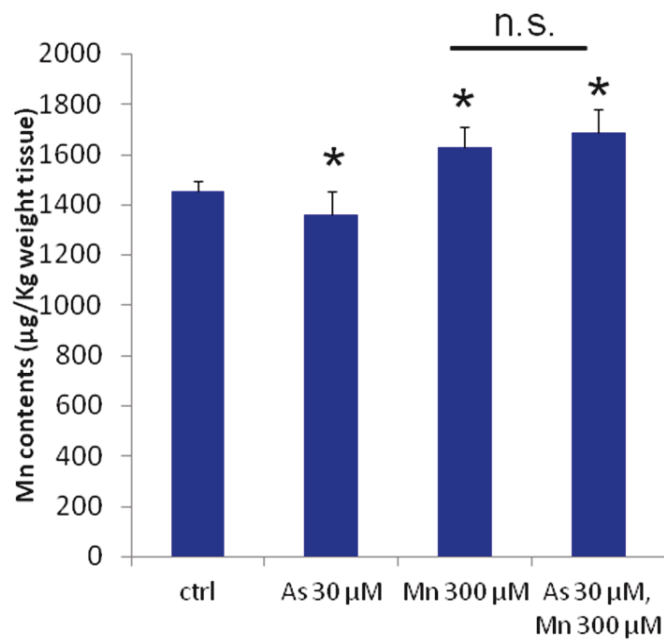


Fig. 9. 肝臓におけるヒ素、マンガン含有量測定結果

ヒ素、マンガン曝露群の肝臓におけるヒ素、マンガン含有量 (平均 ± 標準偏差) を ICP-MS を用いて測定した (n=5)。(A) ヒ素投与群 (B) マンガン投与群である。統計的有意 (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$) は、t-test にて算出した。

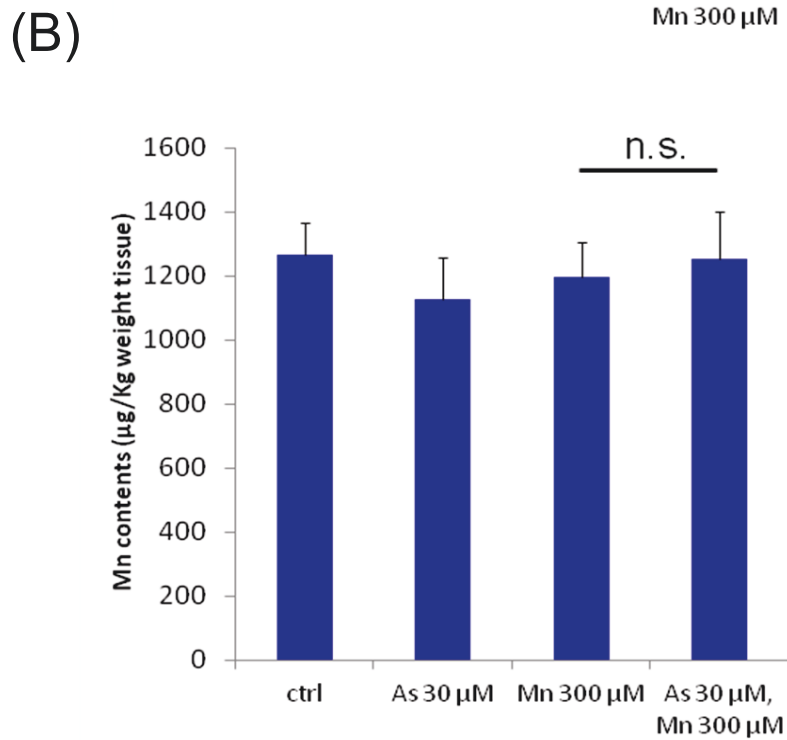
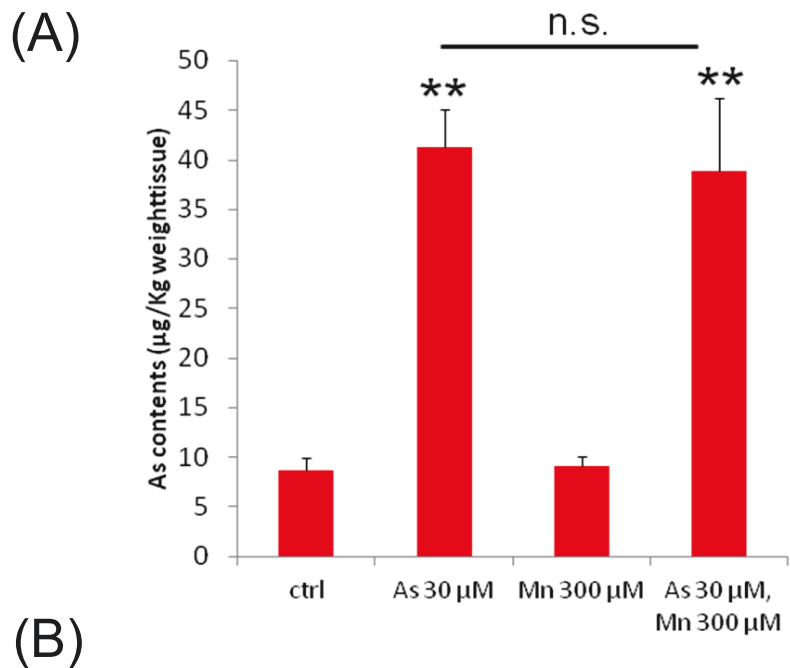


Fig. 10. 腎臓におけるヒ素、マンガン含有量測定結果

ヒ素、マンガン曝露群の腎臓におけるヒ素、マンガン含有量 (平均 ± 標準偏差) を ICP-MS を用いて測定した (n=5)。(A) ヒ素投与群 (B) マンガン投与群である。統計的有意 (*, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$) は、t-test にて算出した。

第三章 考察

我々の身の回りから発生している騒音ストレスは、産業労働衛生上深刻な問題となっている (Ohgami N et al., 2011)。騒音はさまざまな周波数から成っているが、工場等の重機、車のエンジン、家庭の冷蔵庫、クーラーの室外機、換気扇等から発生する 0.1 kHz 付近の周波数を特徴とする低周波騒音は、ヒトには認識する事が困難である。ヒトを対象にした過去の調査報告によると、低周波騒音曝露は平衡感覚異常等の健康障害のリスクを高める可能性が指摘されているが (Schust, 2004; Takigawa et al., 1988)、低周波騒音が誘発する平衡感覚異常の原因は全く分かっていなかった。本研究により、低周波騒音をマウスに曝露すると、高周波騒音の曝露時と比較して、平衡感覚異常が見られる事が明らかとなった (Figs. 2-3, Table 2-3)。

本研究のローターロッドの歩行時間は、非曝露群と高周波騒音曝露群間で有意な差は観察されなかった。過去の研究では、高周波騒音は我々の身体に侵入する際、減弱するのに対し、低周波騒音は、減弱せずに我々の身体に侵入する事を報告している (Gerhardt et al., 1996)。この事から、低周波騒音は高周波騒音と比較し、マウスの体内に減弱せずに侵入し、平衡感覚に悪影響を及ぼしている可能性が考えられる。

過去の報告では、平衡感覚の認識には筋肉、小脳、前庭が協調的に働いてい

るとの報告がある (Matsumura et al., 2006) 。そこで、本研究では筋肉、小脳形態解析を行ったが、異常は観察されなかった (Fig. 7) 。また、体重にも有意な差は観察されなかった (Fig. 4) 。一方、内耳前庭の形態解析では、低周波騒音の曝露によりマウスの内耳前庭の有毛細胞の数の減少に伴い (Fig. 5) 、内耳前庭の酸化ストレスレベルが上昇した (Fig. 6) 。この結果から、低周波騒音による影響は筋肉、小脳と比較し、内耳前庭において影響を受けやすい可能性が考えられる。過去の報告から、アミノグリコシド系抗生物質であるゲンタマイシンの投与により内耳前庭の酸化ストレスレベルの上昇が見られ、形態異常が惹起されたとの報告がある (Al Deeb S et al., 2000) 。さらに、内耳前庭有毛細胞に対する過酸化水素曝露実験において、内耳前庭有毛細胞の細胞死が見られた (Tanigawa T et al., 2008) 。つまり、内耳前庭有毛細胞は、酸化ストレスによる影響を受けやすく、低周波騒音曝露マウスの平衡感覚異常は内耳前庭のダメージにより惹起されたものと考えられる。細胞膜はリン脂質が主要な構成要素である。酸化ストレスマーカーである酸化リン脂質抗体を用いた本研究の形態解析の結果から (Fig. 6) 、内耳前庭有毛細胞の細胞膜に傷害が生じている可能性が考えられる。更に本研究では D- β -Asp 抗体 (Fujii et al., 2002) を用いた形態解析を行った。D- β -Asp 抗体 は、D 型アミノ酸を網羅的に調べるポリクローナル抗体である。D 型アミノ酸は生体には存在しないと考えられていたが、アルツハ

イマー病などの加齢性疾患において、D 型アミノ酸が沈着する事が報告されており、D-β-Asp 抗体は加齢による酸化ストレスマーカーとして使用されている (Fujii et al., 2002) 。D-β-Asp 抗体を用いた本研究の形態解析では (Fig. 6) 、低周波騒音曝露群において強い陽性像が観察されている。低周波騒音曝露群の内耳前庭において、D 型アミノ酸の沈着が生体に対し、どのような影響を与えるかについては、現時点では明らかとなっていない。更なる生理学的、生化学的解析が必要である。

内耳は前庭の他、コルチ器官も含んでいる。コルチ器官は、音刺激を電気刺激へ変換する外有毛細胞と内有毛細胞の 2 種類の細胞を持っている。この細胞からの刺激は聴神経から、聴覚皮質へと伝わり音を認識する (Lalwani et al., 2008) 。従って、低周波騒音は内耳前庭に影響を与え、平衡感覚異常を引き起こすだけではなく、コルチ器官にも影響し、聴覚にも影響を及ぼす可能性も考えられる。今後、更なる行動解析と聴覚実験を行う事が必要である。

過去の報告では、内耳内リンパ液には高濃度のカリウムと低濃度のカルシウムが存在し、カルシウム結合タンパク質であるカルビンディン D28K の働きにより内耳内リンパ液のカルシウム濃度が維持されているとの報告がある (Yamauchi et al., 2010) 。哺乳類の内耳において、カリウム濃度とカルシウム濃度のバランスは聴神経への情報伝達に重要である。更に過去の研究において、

ラットのカルビンディン D28K 陽性神経細胞の減少に伴い、小脳の酸化ストレスレベルが上昇しているとの報告がある (Patel et al., 2012)。これらの過去の報告と、本研究の形態解析の結果から、低周波騒音の曝露によるカルビンディン D28K 陽性細胞の減少が内リンパ液のカリウム、カルシウム濃度のバランスに影響を与えている可能性が考えられる。

次に本研究では、ヒトに健康被害を及ぼす環境ストレス因子である重金属にも注目した。東南アジア地域を中心とする発展途上国では数百万もの井戸においてヒ素等の重金属に汚染され、1億人以上の人々がヒ素に曝された生活を送っている (van Geen A et al., 2013)。従来の報告では飲用井戸水に含まれるレベルよりはるかに高い濃度で曝露実験を行い、その毒性を報告している例がほとんどであり、また、飲用井戸水に含まれる濃度での重金属の複合汚染による毒性および体内分布を報告した例はほとんど存在しない。バングラデシュにおける飲用井戸水の汚染について論じた過去の報告では (Frisbie et al., 2009)、ヒ素とマンガンの汚染状況には正の相関関係がある事を示している。そこで、本研究ではヒ素とマンガンに注目し、複合投与実験を行った。本研究により、飲用井戸水に含まれる濃度での重金属の曝露による体内分布の変化を明らかにした。

Table 4 に示した条件でヒ素、マンガンを飲水投与実験を行い、皮膚、肝臓、腎臓の元素測定を行ったところ、組織ごとに体内蓄積パターンに違いがある事が明らかとなった。

皮膚において、ヒ素、マンガンを複合投与群は、非投与群、ヒ素 30 μM 単独投与群と比較しヒ素の有意な上昇が見られた。一方、ヒ素、マンガンを複合投与群は、マンガンを 300 μM 単独投与群と比較しマンガンは有意に低下し、非投与群と有意な差が見られなかった (Fig. 8)。この結果は、皮膚においてのみ見られ、肝臓、腎臓ではこのような結果は見られなかった (Fig. 9,10)。この結果より、ヒ素、マンガンの複合曝露はお互いの皮膚への蓄積に影響を及ぼしていることを示唆している。特にヒ素濃度はマンガンの複合曝露により上昇しており、ヒ素による皮膚毒性がヒ素単独曝露よりも上昇している可能性を示唆している。ヒ素のフッ素の複合投与実験を行った過去の報告では (Liu S et al., 2013)、ヒ素とフッ素の拮抗作用によりヒ素の毒性症状が低下したとの報告があり、ヒ素、マンガンについても複合投与することによりお互いの毒性に何らかの影響を与える可能性がある。飲用水のヒ素汚染やマンガンを汚染がもたらす健康被害は様々な研究が行われ、その作用機序等が明らかにされつつある。しかし、ヒ素とマンガンを複合的に汚染されている水を飲用水として利用しているという最近の報告 (Frisbie et al., 2009) と、本研究による、複合汚染が体内のヒ素やマン

ガンレベルに影響を及ぼすという新たな結果は、飲用水の重金属汚染による健康被害リスクを考える場合に、単独の元素に着目するのではなく、様々な複合汚染を念頭に置き、リスク評価を行うことが重要である。

<解決していない問題とその解決方法について>

～低周波～

本研究により、低周波騒音曝露が内耳前庭にダメージを与え、平衡感覚に悪影響する事が明らかとなったが、そのメカニズムについては明らかとなっていない。内耳前庭の形態解析の結果は、低周波騒音曝露により内耳前庭の酸化ストレスレベルの上昇を示していたことから、実際に酸化ストレスによって内耳前庭有毛細胞の減少が生じるかどうか、生化学的実験、抗酸化剤の投与実験等、更なる追加実験が必要である。本研究では、平衡感覚を司る内耳前庭に焦点を絞っており、今後の研究では低周波騒音曝露群の内耳前庭以外の臓器や器官の変化を解析する予定である。更に低周波騒音曝露条件、特に曝露時間の検討を含め、複数条件での低周波騒音曝露実験を行う必要がある。

日本における騒音規制は、音量に関する規制は存在するが、周波数に注目した規制は行われていない。ヒトの可聴域は約 0.2-20 kHz であり(Heffner et al., 2007)、0.1 kHz 付近の低周波騒音をヒトが認識する事は困難であるため、身体

に不調をきたしても適切な診療を受ける事が出来ない可能性がある。早急に周波数に関する騒音規制も整えた方が良いと思われる。低周波騒音は我々の身の回りの生活家電（クーラーの室外機、冷蔵庫、換気扇等）から発生している。低周波騒音をカットする生活家電、防音壁等の開発を行い、防御方法を確立する必要がある。

～重金属～

本研究のヒ素、マンガンの飲用井戸水に含まれるレベルの飲水投与実験において、複合投与によりお互いの毒性症状に影響を与える可能性が示唆されたが、今後はそのメカニズムを明らかにする必要がある。ヒ素は酸化ストレスレベルの上昇に関与する事から、皮膚、肝臓、腎臓の形態解析実験、また、酸化ストレスレベル測定実験等の生化学実験を行う必要がある。一方、マンガンは神経に作用し、パーキンソン様症状を引き起こす事から脳の形態解析等を行う必要がある。また、体内に本来含まれる元素、特に必須微量元素等の蓄積に影響を及ぼしている可能性があり、間接的にそれらの機能を阻害又は活性化している可能性がある。このため、ヒ素やマンガン以外の元素動態を測定し、その影響を解析する必要があると考えられる。重金属の身体への毒性は価数によって異なる場合がある。このため、他の価のヒ素、マンガンの複合投与実験も行い、元素動態の測定と毒性の解析を行う必要がある。

本研究では、低周波騒音による平衡感覚異常、重金属複合投与による疾患発症のリスク変化について解析した。今後更なる解析を行い、疾患の発生机序の解明と予防策の確立へ貢献したいと考えている。

第四章 実験方法

第一節 低周波騒音曝露実験で使用した試薬と機器

騒音曝露実験で使用したスピーカー (Sound Stimulator DPS-725) は、ダイヤモンドメディカルシステム株式会社より購入した。また、騒音レベルは株式会社アコーの FFT 騒音測定器 (Type 6224) を使用した。

ローターロッド解析では、Ugo Basile のローターロッドトレッドミルを使用した。強制水泳試験のビーカーは、HARIO の透明のガラス製ビーカーを使用した。お湯は Electrolux のポッドを使用した。

免疫組織染色で使用した rabbit anti-calbindin D28k 抗体は、Chemicon の抗体を使用した。また、rabbit anti-D-beta-アスパラギン酸抗体は、京都大学の藤井紀子先生よりご供与いただいた。各抗体の陽性シグナルの検出には、Vector の VECTASTAIN ABC kit 、DAKO の Envision kit/HRP (diaminobenzidine; DAB) を使用した。そして、酸化リン脂質に対するモノクローナル抗体は昭和大学の板部洋之先生よりご供与いただいた。ブロッキングバッファーは、DAKO の Goat IgG を使用した。一次抗体は、Jackson ImmunoResearch の Goat Fab-anti mouse IgG 抗体を使用した。アルカリホスファターゼの標識には、AbD serotec のアルカリホスファターゼ標識 goat anti-mouse IgM 抗体を使用した。陽性シグナルの検出は、DAKO の New Fuchsin substrate system を用いて行った。

NADH-tetrazolium (NADH-TR) 染色を行うヒラメ筋の包埋は Sakura Finetechnical の OCT 包埋剤を使用した。

<第一項 実験動物>

ICR 系統野生型マウスを使用した。本研究における全ての実験は、中部大学における動物実験委員会の承認を受け（承認番号：2210038）、日本政府が規定する実験動物管理規定に則って実験を行った。

<第二項 騒音曝露実験>

マウスは、防音室 (Yamaha, Co., Japan) 内でスピーカーから約 10-20 cm 程の距離をおき、70 dB SPL で 1 ヶ月間常時曝露した。音響出力は、騒音レベル測定器を使用し定期的にモニタリングした。マウスは 23 ± 2 °C の一定温度、12 時間の明暗サイクルで specific pathogen-free (SPF) 条件下で飼育された。マウスはグラムスケールで週ごとに体重測定した。

<第三項 行動解析>

平衡感覚の測定は過去の報告 (Ko et al., 2005; Mariño et al., 2010; Zhao et al., 2008) に従って行った。以下、実験手順を記す。

(1) ローターロッド

低周波騒音曝露前にローターロッドトレッドミルを用いてローターロッド解析を行った。マウスは同様の体重の個体を使用した。ローターロッド解析は 30 rpm の定速モードで行った。ローターロッドトレッドミル上でマウスが歩行不可能となった時、タイマーを止め、歩行できた時間 (秒) で記録した。ローターロッド解析は 5 分間の間隔をおき、6 回試行した。

(2) 平均台歩行試験

平均台歩行試験は、両端に 2 つの発泡スチロールの乗降場を取りつけた直径 2.4 cm の丸棒 (木製) の上をマウスに歩行させて行った。初めて平均台歩行試験を行うマウスは、初めに 5 cm 程の歩行練習をした後、30 cm 歩行させた。この試行を 3 回連続して行った。

(3) 強制水泳試験

強制水泳試験は過去の報告に従って行った (Deron et al., 2007)。30 °Cのお湯を 1.5 L 入れた 2 L ビーカー内で、マウスに 5 分間水泳させた。鼻先を常に水上に出しているマウスを水泳成功、鼻先が水中に沈んだマウスを水泳失敗とし、マウスの個体数をそれぞれ記録した。

(4) 歩行パターン解析

歩行パターン解析は過去の報告に従って行った (Ko et al., 2005) 。マウスの前足に赤のインク、後ろ足に青のインクを付け、Whatman paper を敷いた 14 x 44 cm の箱の中にマウスを配置し、歩行させた。同じ側の手と足の跡の距離を歩幅として測定した。

<第四項 前庭免疫組織染色>

ブアン溶液による灌流固定の後、マウスから採取した三半規管付きの内耳を 3 日から 1 週間の間、ブアン溶液に 4 °C で浸した。rabbit anti-calbindin D28k 抗体 (1:150) (Ohgami et al., 2010) 、 rabbit anti-D-beta-アスパラギン酸抗体 (D-β-Asp) 抗体 (1:100) (Fujii et al., 2002) を用いた免疫組織染色は、5 μm のパラフィン連続切片に対して行った。VECTASTAIN ABC kit 、 Envision kit/HRP (DAB) は陽性シグナルを検出するために使用した。酸化リン脂質に対するモノクローナル抗体 (Ox-PC; 20 μg/ml; DLH3) (Itabe et al., 1994) を用いた免疫組織染色は、凍結切片を用いて行った (Akishima et al., 2005) 。凍結切片を 0.3 % 過酸化水素で 20 分間室温処理後、ブロッキングバッファー (20 μg/ml of ヤギ IgG (DAKO) in PBS) を加え、室温で 1 時間インキュベートし、Goat Fab-anti mouse IgG 抗体 20 μg/ml にて一次抗体反応を行った。一次抗体反応後、凍結

切片をさらにアルカリホスファターゼ標識 goat anti-mouse IgM 抗体 (1:200 in 2% skim milk in PBS) でインキュベートした。The DAKO New Fuchsin substrate system は、陽性シグナルを検出するために使用した。免疫組織染色によって得られた陽性シグナルは、過去の報告例 (Ohgami et al., 2010; Ohgami et al., 2011a) に従って WinROOF (version 6.2) を用いて定量化した。まず、陽性有毛細胞数を前庭における総有毛細胞数と区別した。各マウスの内耳前庭において 5 ヶ所ピックアップし、100-150 個の細胞を解析した。解析した前庭の陽性領域は、解析した全領域で割り算した。低周波曝露群、非曝露群の各群において 3 ~ 4 匹のマウスの前庭をこの解析に使用した。

<第五項 ヒラメ筋 NADH-tetrazolium (NADH-TR) 染色>

頸椎脱臼した直後に、マウスからヒラメ筋を採取し、液体窒素存在下でソペントラン内に即時に浸した。OCT 包埋剤 による包埋後、6 μm の連続凍結切片で形態解析した。組織切片は 0.06 M Tris-HCl (pH 7.4) 、0.5 mM beta-NADH 、0.6 mM ニトロブルーテトラゾリウム溶液に 37°C 、30 分間インキュベートした。次に、組織切片を 30、60、90、60、30%のアセトンの順番で 1 時間ずつインキュベートした。組織切片内のランダムに選んだ 5 つの場所にある約 500 ~ 1000 個の繊維を観察した。

＜第六項 統計計算＞

コントロールとの統計的有意 (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$) は the Mann-Whitney U test (Figs. 2-5)、カイ二乗検定 (Table 2, 3) にて算出した。

第二節 低濃度有害重金属曝露実験で使用した試薬と機器

マウスの飲水投与試薬は、Wako のメタ亜ヒ酸ナトリウム、SIGMA の塩化マンガン (II) 4 水和物を使用し、調整した。灰化は関東化学株式会社の濃硝酸、Wako の過酸化水素を使用して行った。各種元素の含有量は、Simazu の ICP - MS 機器を使用して測定した。

＜第一項 実験動物＞

野生型ヘアレスマウスを使用した。マウスは中部科学資材株式会社より購入した。本研究における全ての実験は、中部大学における動物実験委員会の承認を受け（承認番号：2610016）、日本政府が規定する実験動物管理規定に則って実験を行った。

<第二項 飲水投与と臓器の採取>

マウスは 23 ± 2 °C の一定温度、12 時間の明暗サイクルで specific pathogen-free (SPF) 条件下で飼育し、Table 4 に示した条件で2カ月間飲水投与した。飲水投与終了後、マウスを頸椎脱臼させ、体内の各種臓器を採取した。採取した臓器は精密天秤で重量を測定し、-80 °Cで冷凍保存した。

<第三項 灰化方法>

50 ml チューブに採取した臓器を入れ、3 ml の濃硝酸を加え1晩静置し、80 °C 時間加熱した。加熱後、3 ml の過酸化水素を加え1晩静置し、再度80 °C で3時間加熱した。その後、Milli-Q を4 ml 加えた。

<第四項 統計計算>

統計的有意 (**, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$) は、t-test にて算出した。

参考論文

Akishima, Y., Akasaka, Y., Ishikawa, Y., Lijun, Z., Kiguchi, H., Ito, K., Itabe, H., Ishii, T., 2005. Role of macrophage and smooth muscle cell apoptosis in association with oxidized low-density lipoprotein in the atherosclerotic development. *Mod. Pathol.* 18, 365-373.

Alagramam, KN., Stepanyan, R., Jamesdaniel, S., Chen, DH., Davis, RR. 2014. Noise exposure immediately activates cochlear mitogen-activated protein kinase signaling. *Noise Health.* 16:400-9.

Al Deeb, S., Al Moutaery, K., Khan, H.A., Tariq, M., 2000. Exacerbation of iminodipropionitrile-induced behavioral toxicity, oxidative stress, and vestibular hair cell degeneration by gentamicin in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* 22, 213-220.

Celik, I., Gallicchio, L., Boyd, K., Lam, TK., Matanoski, G., Tao, X., Shiels, M., Hammond, E., Chen, L., Robinson, KA., Caulfield, LE., Herman, JG., Guallar, E., Alberg, AJ. 2008. Arsenic in drinking water and lung cancer: a systematic review. *Environ Res.* 108:48-55.

Chen, CH., Chan, CC., Chen, BY., Cheng, TJ., Leon, Guo, Y. 2014. Effects of particulate air pollution and ozone on lung function in non-asthmatic children. *Environ Res.* 137C:40-48.

Chen, K., Liao, Q.L., Ma, ZW., Jin, Y., Hua, M., Bi. J., Huang. L. 2014. Association of soil arsenic and nickel exposure with cancer mortality rates, a town-scale ecological study in Suzhou, China. *Environ Sci Pollut Res Int*.

Coelho, SG., Valencia, JC., Yin, L., Smuda, C., Mahns, A., Kolbe, L., Miller, SA., Beer, JZ., Zhang, G., Tuma, PL., Hearing, VJ. 2014. UV exposure modulates hemidesmosome plasticity, contributing to long-term pigmentation in human skin. *J Pathol*.

Deron, R.H., Nicolas, G., Martin, S., Richard, R., Ulrich, M., Jerold, C., 2007. Sphingosine 1-Phosphate (S1P) Signaling Is Required for Maintenance of Hair Cells Mainly via Activation of S1P2. *J. Neurosci.* 27, 1474-8.

Dougherty, J.D., Welsh, O.L., 1966. Environmental hazards. Community noise and hearing loss. *N. Engl. J. Med.* 275, 759-765.

Frisbie, SH., Mitchell, EJ., Mastera, LJ., Maynard, DM., Yusuf, AZ., Siddiq, MY., Ortega, R., Dunn, RK., Westerman, DS., Bacquart, T., Sarkar, B. 2009. Public health strategies for western Bangladesh that address arsenic, manganese, uranium, and other toxic elements in drinking water. *Environ Health Perspect.* 117, 410-6.

Frisbie, SH., Mitchell, EJ., Yusuf, AZ., Siddiq, MY., Sanchez, RE., Ortega, R., Maynard, DM., Sarkar, B. 2005. The development and use of an innovative laboratory method for measuring arsenic in drinking water from western Bangladesh. *Environ*

Health Perspect. 113, 1196-204.

Fujii, N., Tajima, S., Tanaka, N., Fujimoto, N., Takata, T., Shimo-Oka, T., 2002. The presence of D-beta-aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294, 1047-1051.

Gerhardt, K.J., Abrams, R.M., 1996. Fetal hearing: characterization of the stimulus and response. *Semin. Perinatol.* 20, 11-20.

Guthrie, O.W., 2008. Aminoglycoside induced ototoxicity. *Toxicology* 249, 91-96.

Heffner, H.E., Heffner, R.S., 2007. Hearing ranges of laboratory animals. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 46, 20-22.

Henderson, D., Bielefeld, E.C., Harris, K.C., Hu, B.H., 2006. The role of oxidative stress in noise-induced hearing loss. *Ear Hear.* 27, 1-19.

Itabe, H., Takeshima, E., Iwasaki, H., Kimura, J., Yoshida, Y., Imanaka, T., Takano, T., 1994. A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides. *J. Biol. Chem.* 269, 15274-15279.

Ji, X., Han, M., Yun, Y., Li, G., Sang, N. 2015. Acute nitrogen dioxide (NO₂) exposure enhances airway inflammation via modulating Th1/Th2 differentiation and activating JAK-STAT pathway. *Chemosphere*. 120:722-8.

Kim, MJ., Woo, SW., Kim, MS., Park, JE., Hwang, JK. 2014. Anti-photoaging effect of aaptamine in UVB-irradiated human dermal fibroblasts and epidermal keratinocytes. *J Asian Nat Prod Res*. 3:1-9.

Ko, D.C., Milenkovic, L., Beier, S.M., Manuel, H., Buchanan, J., Scott, M.P., 2005. Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. *PLoS Genet*. 1, 81-95.

Kuo, A.D., Donelan, J.M., 2010. Dynamic principles of gait and their clinical implications. *Phys. Ther*. 90, 157-174.

Lalwani, A.K., Gürtler, N., 2008. Sensorineural Hearing Loss, The Aging Inner Ear, and Hereditary Hearing Impairment, in: Lalwani, A.K. (Ed.), *CURRENT Diagnosis & Treatment in Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, second edition. McGraw-Hill, New York, pp. 683-704.

Liu, S., Guo, X., Zhang, X., Cui, Y., Zhang, Y., Wu, B. 2013. Impact of iron precipitant on toxicity of arsenic in water: a combined in vivo and in vitro study. *Environ Sci Technol*. 47, 3432-8.

Mariño, G., Fernández, A.F., Cabrera, S., Lundberg, Y.W., Cabanillas, R., Rodríguez, F., Salvador-Montoliu, N., Vega, J.A., Germanà, A., Fueyo, A., Freije, J.M., López-Otín, C., 2010. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *J. Clin. Invest.* 120, 2331-2344.

Matsumura, B.A., Ambrose, A.F., 2006. Balance in the elderly. *Clin. Geriatr. Med.* 22, 395-412.

Ohgami, N., Ida-Eto, M., Sakashita, N., Sone, M., Nakashima, T., Tabuchi, K., Hoshino, T., Shimada, A., Tsuzuki, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Jijiwa, M., Asai, N., Hara, A., Takahashi, M., Kato, M., 2012. Partial impairment of c-Ret at tyrosine 1062 accelerates age-related hearing loss in mice. *Neurobiol. Aging* In press.

Ohgami, N., Ida-Eto, M., Shimotake, T., Sakashita, N., Sone, M., Nakashima, T., Tabuchi, K., Hoshino, T., Shimada, A., Tsuzuki, T., Yamamoto, M., Sobue, G., Jijiwa, M., Asai, N., Hara, A., Takahashi, M., Kato, M., 2010. c-Ret-mediated hearing loss in mice with Hirschsprung disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 13051-13056.

Ohgami, N., Kondo, T., Kato, M., 2011. Effects of light smoking on extra-high-frequency auditory thresholds in young adults. *Toxicol. Ind. Health* 27, 143-147.

Patel, RS., Rachamalla, M., Chary, NR., Shera, FY., Tikoo, K. 2012. Cytarabine induced cerebellar neuronal damage in juvenile rat: correlating neurobehavioral performance with cellular and genetic alterations. *Toxicology* 293: 41–52.

Perez, Aguilar, RC., Honoré, SM., Genta, SB., Sánchez, SS. 2014. Hepatic fibrogenesis and transforming growth factor/Smad signaling activation in rats chronically exposed to low doses of lead. *J Appl Toxicol.* 34:1320-31.

Rahman, MM., Ng, JC., Naidu, R. 2009. Chronic exposure of arsenic via drinking water and its adverse health impacts on humans. *Environ Geochem Health.* 1:189-200.

Samson, J., Sheeladevi, R., Ravindran, R., 2007a. Oxidative stress in brain and antioxidant activity of *Ocimum sanctum* in noise exposure. *Neurotoxicology* 28, 679-685.

Samson, J., Sheeladevi, R., Ravindran, R., Senthilvelan, M., 2007b. Stress response in rat brain after different durations of noise exposure. *Neurosci. Res.* 57, 143-147.

Schust, M., 2004. Effects of low frequency noise up to 100 Hz. *Noise Health* 6, 73-85.

Takigawa, H., Hayashi, F., Sugiura, S., Sakamoto, H., 1988. Effects of infrasound on human body sway. *Journal of Low Frequency Noise and Vibration* 7, 66-73.

van, Geen., Bostick, BC., Pham, TK., Vi, ML., Nguyen-Ngoc, M., Phu, DM., Pham, HV., Radloff, K., Aziz, Z., Mey, JL., Stahl, MO., Harvey, CF., Oates, P., Weinman, B., Stengel, C., Frei, F., Kipfer, R., Berg, M. 2013. Retardation of arsenic transport through a Pleistocene aquifer. *Nature*. 501,204-7.

Wallenius, M., 2004. The interaction of noise stress and personal project stress on subjective health. *J. Environ. Psych.* 24, 167–177.

Wan, C., Ma, X., Shi, S., Zhao, J., Nie, X., Han, J., Xiao, J., Wang, X., Jiang, S., Jiang, J. 2014. Pivotal roles of p53 transcription-dependent and -independent pathways in manganese-induced mitochondrial dysfunction and neuronal apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 281:294-302.

Yamauchi, D., Nakaya, K., Raveendran, NN., Harbidge, DG., Singh, R. 2010. Expression of epithelial calcium transport system in rat cochlea and vestibular labyrinth. *BMC Physiol* 10: 1.

Yousefi, Babadi, V., Sadeghi, L., Shirani, K., Malekirad, AA. Rezaei, M. 2014. The toxic effect of manganese on the acetylcholinesterase activity in rat brains. *J Toxicol.* 2014:946372.

Zakon, H., Lu, Y., 1998. Weisleder, P. Sensory cells determine afferent terminal morphology in cross-innervated electroreceptor organs: implications for hair cells. *J. Neurosci.* 18, 2581-2591.

Zhao, X., Jones, S.M., Yamoah, E.N., Lundberg, Y.W., 2008. Otoconin-90 deletion leads to imbalance but normal hearing: a comparison with other otoconia mutants. *Neuroscience* 153, 289-299.

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なご指導を頂きました、中部大学大学院 応用生物学研究科 応用生物学専攻 生命人間科学分野 伊藤 康彦先生、名古屋大学大学院 医学系研究科 環境労働衛生学 加藤 昌志先生、大神 信孝先生、矢嶋 伊知朗先生、熊坂 真由子先生、大沼 章子先生に深く感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり、内耳前庭の形態解析で共同研究頂きました、昭和大学 薬学部 生物化学教室 板部 洋之先生、京都大学 原子炉実験所 放射線生命科学研究部門 藤井 紀子先生に深く感謝申し上げます。

平成 27 年 2 月 24 日

中部大学大学院

応用生物学研究科 応用生物学専攻 生命人間科学分野

田村 青鳥

研究業績

< 主著論文 >

Tamura H, Ohgami N, Yajima I, Iida M, Ohgami K, Fujii N, Itabe H, Kusudo T, Yamashita H, Kato M. Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. PLoS ONE, 7(6):e39807, 2012.

< 共著論文 >

1. Ohgami N, Iida M, Yajima I, **Tamura H**, Ohgami K, Kato M. Hearing impairments caused by genetic and environmental factors. Environ Health Prev Med, 2013. 18(1):10-5.

2. Yajima I, Kumasaka YM, **Tamura H**, Ohgami N, Kato M. Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells. J Dermatol Sci, 2012. 68(3):172-8.

3. Ohgami N, Hori S, Ohgami K, **Tamura H**, Tsuzuki T, Ohnuma S, Kato M. Exposure to low-dose barium by drinking water causes hearing loss in mice. Neurotoxicol, 2012. 33(5):1276-83.

4. Ohgami N, **Tamura H**, Ohgami K, Iida M, Yajima I, Kumasaka YM, Goto Y, Sone M, Nakashima T, Kato M. c-Ret-mediated hearing losses. Int J Clin Exp Pathol, 5(1):23-8, 2012.

5. Yajima I, Kumasaka YM, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, **Tamura H**, Kawamoto Y, Kato M. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT signaling in malignant melanoma progression and therapy. Dermatol

Res Prac, 354191, 2012.

6. Yajima I, Kumasaka YM, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, Ohgami N, **Tamura H**, Yamanoshita O, Kawamoto Y, Furukawa K, Kato M. Molecular network associated with MITF on skin melanoma development and progression. J Skin Cancer, 2011:730170, 2011.

<学会発表>

1. 田村青鳥、矢嶋伊知朗、熊坂真由子、大沼章子、神保佳奈、大神信孝、内藤久雄、加藤昌志. 低濃度有害重金属の飲水投与における体内分布についての解析. 第 84 回日本衛生学会学術総会. 岡山県 岡山コンベンションセンター
2014 年 5 月.

2. 田村青鳥, 大神信孝, 加藤昌志. 低周波が平衡感覚に与える影響の解析. 第 82 回日本衛生学会学術総会. 京都 京都大学 2012 年 3 月.

3. 田村青鳥, 大神信孝, 加藤昌志. 環境ストレスによる内耳性難聴の解析. 第 81 回日本衛生学会学術総会. 東京 昭和大学 2011 年 3 月.