

マイクロクランプを用いたラット前下小脳動脈閉塞の内耳血流への影響

分科会員 中 島 務 (名大耳鼻咽喉科)

共同研究者 鈴木 亨・岩 垣 俊 憲
日 比 達 也 (名大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

急性感音難聴の原因の一つとして内耳血流障害が考えられるが、解剖学的特殊性から臨床的にそれを証明することは困難で、また新鮮な側頭骨標本を得ることも稀である。従って、内耳血流障害の研究は、動物実験に頼らざるを得ないのが現実である。今回、ラットの前下小脳動脈 (AICA) をマイクロクランプを用いて閉塞し、再現性の良い一過性内耳虚血状態を繰り返し作成し、レーザードップラー(LD)法とマイクロスフェア(MS)法を用いて、血流変化を検討したので報告する。

【方 法】

実験は、Wistar/ST ラット 27 匹を用い、全麻下に気管切開し、自発呼吸下に施行した。左大腿動脈より血圧 (BP) を測定した上で、腹側から気管・食道・頸部筋群を離断剥離し、頭蓋底を露出削開し、脳底動脈と内耳道入口部の中間部の左 AICA を明視下に置いた。左中耳骨胞を開放し、中耳粘膜を除去した上で、蝸牛基底回転外側壁に径 1mm のレーザードップラー血流計(ALF2100)のプロープを設置し、蝸牛血流 (CBF) を測定した。5 分間の BP と CBF の基準値を測定後、マイクロ用鑷子を用いて作製したマイクロクランプを用いて、左 AICA を 1-15 分間繰り返し閉塞し、CBF と BP の変化を経時的に測定し

た。うち 10 匹の動物では、左 AICA を閉塞中に左心室に径 $11.3 \pm 0.3 \mu$ のマイクロスフェア(NEM)を注入し、KCl にて心停止の後に左右の蝸牛を摘出し、左右の CBF 比率及び CBF の蝸牛内分布について検討した。

【結 果】

AICA を閉塞すると、CBF は急激に低下し、閉塞解除とともに基準値を越えて上昇し、ほぼ正確に基準値に回復した (図 1)。27 匹中 10 匹の動物で、AICA 閉塞中に CBF が軽度回復するものを認めたが、基準値にまで回復するものはなかった。今回用いたマイクロクランプでは、極めて再現性が良い一過性の内耳虚血状態を、一匹の動物で 5 ~ 10 回程度繰り返すことが可能であった。AICA 閉塞時の CBF の低下の程度は、基準値の約 25-75%と個体差が大きかった (図 2)。MS 法にて測定した CBF の蝸牛内分布を、部位別 (外側壁、蝸牛軸、ラセン板・コルチ器) 及び回転別に、AICA 閉塞側 (左耳) と非閉塞側 (右耳) とで比較したが、ともに有意差は認めなかった。AICA 閉塞時の CBF 残存率を LD 法と MS 法で測定したところ、両者には強い相関を認めたが、MS 法で CBF 残存率が 0%に近い動物でも、LD 法では約 30%程度の CBF 残存率を認めた (図 3)。さらに 5 匹の動物で蝸牛骨壁内のマイクロスフェア数を測定

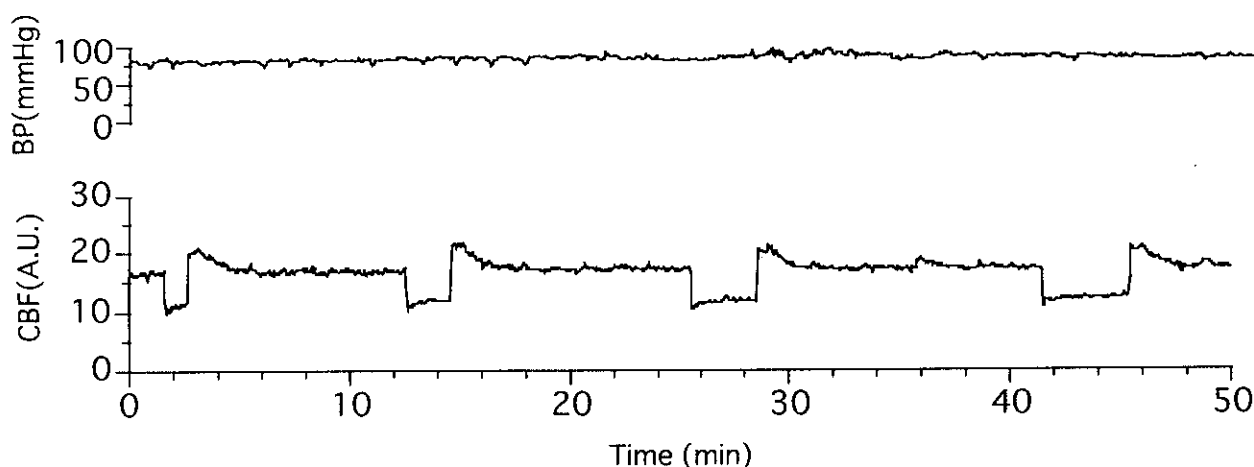
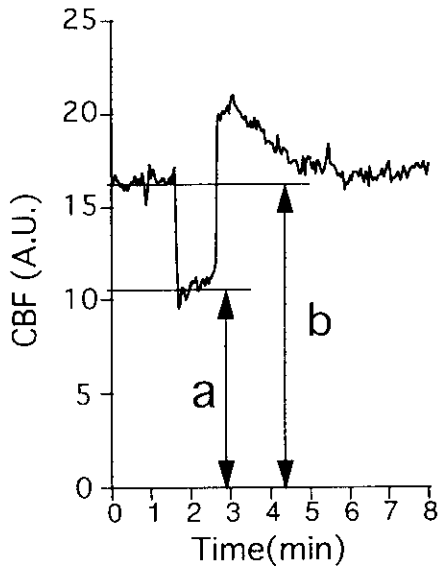


図 1 AICA 閉塞時の BP と CBF の変化

左から 1, 2, 3, 4 分間の閉塞時の CBF の変化を示す。

したところ、蝸牛の 15.1-41.5% (平均 28.7%) に相当するマイクロスフェアが骨壁内に存在していた (表 1)。



$$\frac{a}{b} \times 100 = \text{CBF残存率}(\%)$$

図 2-1 LD 法による CBF 残存率の算出方法
AICA 閉塞時の血流平均値 a を基準値 b で割った値を百分率で表した。

[考 察]

今回の結果で AICA の閉塞に伴う CBF の低下は、基準値の約 25-75% と個体差が認められ、ラットの脳

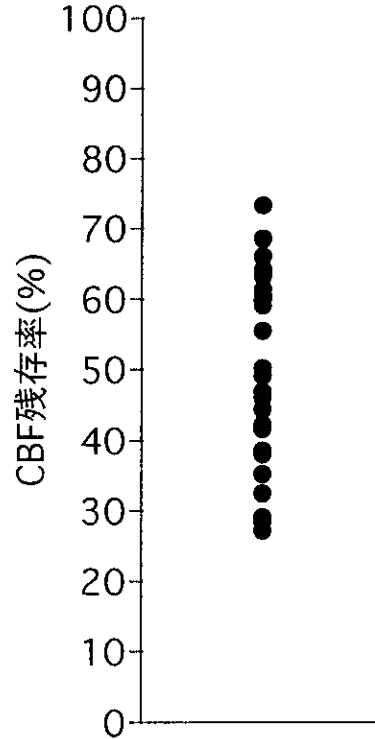


図 2- 27 耳の LD 法による CBF 残存率

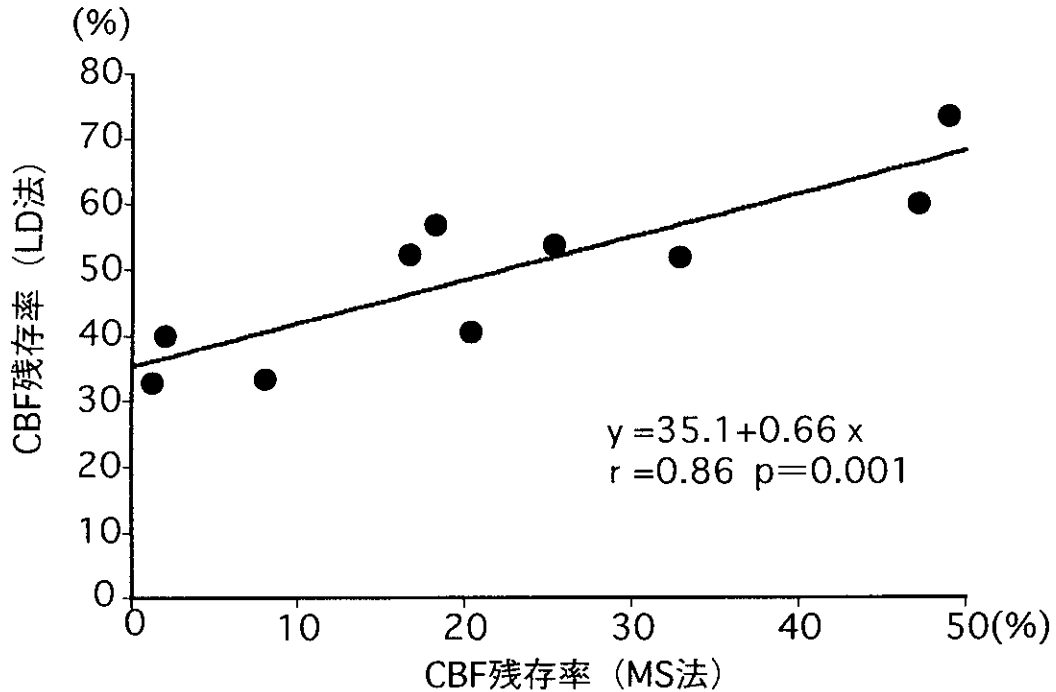


図 3 LD 法と MS 法で測定した CBF 残存率の相関図。
MS 法による CBF 残存率は、左右の蝸牛のマイクロスフェア数の比率から求めた。

表1 蝸牛骨壁内のマイクロスフェア数

動物	左右	蝸牛	蝸牛骨壁	蝸牛骨壁/蝸牛(%)
1	右	477	72	28.1
	左	5	60	—
2	右	354	147	41.5
	左	89	86	—
3	右	213	38	17.8
	左	100	40	—
4	右	259	88	34
	左	52	57	—
5	右	172	60	34.9
	左	56	48	—

底動脈領域の側副血行機能のバリエーションが豊富であることを示すものと考えられた。マイクロランプを用いた今回の方法は、完全に可逆的な一過性の虚血状態を繰り返し作成することができ、虚血時間も自由に設定可能であることから、内耳一過性虚血モデルとしての利用価値は高いと考えられる。

今回、AICA 閉塞時の CBF 残存率を LD 法と MS 法を用いて同時に測定したところ、両測定値間には

強い相関を認めた。これは、両測定法の整合性を示すものと考えられる。一方、AICA 閉塞時の CBF 残存率が、MS 法では 0% に近い動物でも、LD 法では約 30% 認めたことは興味深い点である。以前より、内耳道の神経血管束を切断しても、LD 法での血流信号は 0 にならないことは報告されているが^{1),2)}、その信号源についての明確な説明はなされていなかった。今回 5 匹の動物で、蝸牛骨壁の血流を MS 法で測定したところ、平均で蝸牛の約 30% に相当する血流量が観測され、蝸牛骨壁の血流が、CBF 遮断後に LD 法で測定される残存血流の信号源ではないかと考えられた。

[参考文献]

- 1) Levine RA, Bu-Saba N, Brown MC; Laser-Doppler measurements and electrocochleography during ischemia of the guinea pig cochlea: Implications for hearing preservation in acoustic neuroma surgery. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 102:127-136, 1993.
- 2) 唐 安洲, 宇良政治, 山内昌幸, 野田寛: レーザードップラー血流計を用いた蝸牛血流の計測 耳鼻と臨床 42:373-377, 1996.

光増感反応による限局障害作成蝸牛の蝸牛内電位 (Endocochlear Potential, EP)

分科会長 星野知之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 呉名倉 三津佳・岩崎 聡 (浜松医大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

光増感反応によりモルモットの蝸牛第2回転に限局障害をつくると、直径約0.9mmの変化がおこるが、この障害中心部やその周辺でEPがどのような変化するのかを検討した。形態学的には障害は極めて限局性で、隣接する部位や他の階への影響がほとんどみられないことは昨年までにすでに検討をおこなったが、EPが同じように限局した変化しか示さないのかどうかの検討が必要である。

【対象と方法】

緑色光とローズベンガルとの間の光増感反応によりモルモットの蝸牛に限局障害をつくる手法は平成5年度の本調査研究班の業績報告書に述べた方法と同じである。障害作成に引き続きEPを測定した例では、筋弛緩剤の筋注 (succinylcholine chloride 15mg/kg)のち気管切開し、人工呼吸器で呼吸を管理した。障害作成部の蝸牛骨壁に針を用いて約50-100 μ mの骨孔を作った。先端の直径が2 μ mで150mMのKCl溶液を満したガラスピペットで、先端抵抗が5.6M Ω から29.6M Ω までのものを電極として使用した。電極からの塩化銀線は増幅器 (日本光電 MEZ-8300)に接続し、不感電極は露出した頸筋においた。マイクロマニピュレイタでガラス電極を徐々にすすめ、ラセン靱帯の表面に達したとき0mVに調整、側壁を通過して中央階に刺入し連続的にEPを測定した。

EP測定終了後は断頭し固定液を内耳に環流して固定し組織学的検討をおこない、変性の程度、刺入部位の確認をおこなった。SEMでの観察が主で、一部TEMでも観察した。

実験1 障害部位でのEPの変化はどのようなものであるか。

EPの測定は、障害作成に続いて連続的におこなったものと、障害作成後いったん傷を閉じ、動物をケージに戻し、ある一定期間後に再度傷をひらいてからEPの測定を行ったものとある。連続測定は障害作成後一時間までおこない、後刻測定した

ものは、1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4時間, 3日, 1, 2, 3週間後に計測した

実験2 限局障害は隣接部や別の回転のEPにどのように影響するか。

いくつかの違った条件でEPの測定を行った。(1) 障害作成に引き続き、障害を作った回転とは別の回転でEPを連続的に測定。障害は基底、第2、第3回転につくり、第4回転を除く他の回転でEPを計測した。(2) 障害作成後3日目にEPを計測。A. 第2回転の障害から1mm蝸牛頂側と1mm基底側にはなれた2箇所の障害隣接部 B. 障害は第2回転に作るが、EPの測定は基底回転と第3回転 C. 第3回転に障害を作り、EPの測定を第1回転で行ったもの D. 基底回転に障害を作り、第2回転と第3回転で測定の4種類がある。

【結 果】

実験1

正常の動物 (n=9耳。以下いずれもnは耳数を示す)でのEPの平均は81.4 \pm 0.8mVであった。色素の注入のみか、光の照射のみかのコントロール動物でのEPは80.1 \pm 3.1mVだった。

障害作成に続いて連続して計測した動物 (n=8)でのEPの変化を図1に示す。照射前の84.1mVが徐々に低下し25分で最低値29.8mVとなり、それから回復して一時間後56.3mVとなった。

一時間から2週間までのEPの変化を図2に示す。いったん回復を示したものが、3日目にふたたび低下し21.7mVとなり、一週間ではまた回復して、2週間でコントロールと差のない値になった。

実験2

(1) 障害作成に引き続き計測した蝸牛の別の回転でのEPは、30分間の測定では低下の傾向は見られたが、照射前のEP値との間にどの回転でも有意差のある低下はみられず、障害の影響は現れていなかった (図3)。測定後のSEMの観察では、限局障害作成部位の血管条には変化が見られたが、

EPを測定した別の回転には、変化は見られなかった(図5)。

(2) 3日後の測定では、限局障害の影響が他の部位で測定したEPに現れていた。図4に測定部位と結果を示す。この結果は、光増感反応で作成した限局性の障害部位より上方の回転ではEPは低下をしめし、下方では低下をしめさないことが分かった。障害より1mmはなれた場合、頂側では低下したが基底側では低下はみられなかった。測定部のSEMでの観察では、血管条、ラセン器には限局性的の変性がみられたが、その拡がりは変わるところはなかった。第2回転の障害部位と1mmはなれたEPの電極刺入部間との間は、正常にみえる辺縁細胞が占めていた。

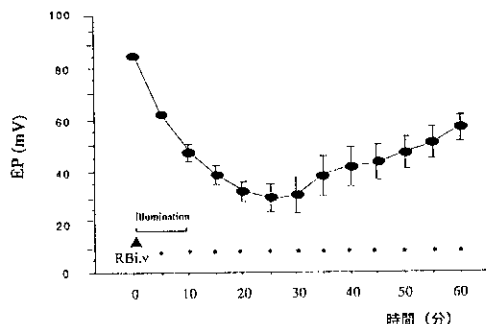


図1 光増感反応障害部位でのEPの変化

障害した血管条の部位で電極を中央階に刺入し中回転でのEPを障害作成前から連続的に1時間計測すると、EPは徐々に低下して25分で最低値となり一時間ではかなり回復するが、障害作成前値にならない。

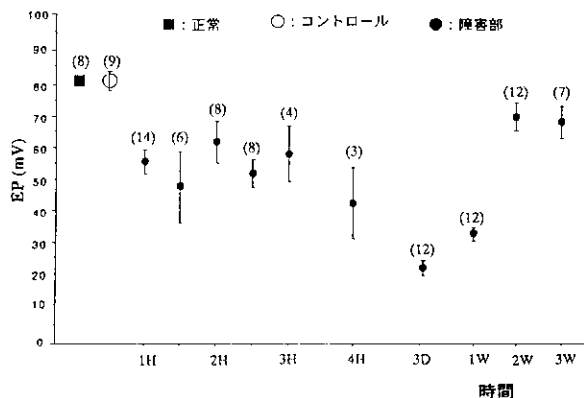


図2 障害作成後1時間から3週間までの障害部EPの経過

いったんある程度回復していたEPは再び低下して3日で最低値となった。2週間ではほぼ前値となり、障害作成前と有意差がなくなるまでに回復を示した。

[考察と結論]

限局障害部位でのEPが徐々に低下することはすでに報告した(Iwasaki et al., 1997)。限局した側壁の障害で起る電氣的勾配は障害の範囲が小さければ代償されるはずである。われわれの作った約1mmの障害の中心部で計測した場合、EPの低下が代償されるかどうか。実際に計測してみると、EP低下がおり、一時間の経過を見ても低下したままであることは、代償が起りにくいことを示している。

障害部位でのEPが2週間でもとの値にもどることが、光増感反応による限局障害でみられることが今回の実験でわかった(Wu et al., 1999)。蝸牛に限局した障害をつくと、それより上方の回転と下方の回転とでは、EPの減少のしかたに差が出てくること

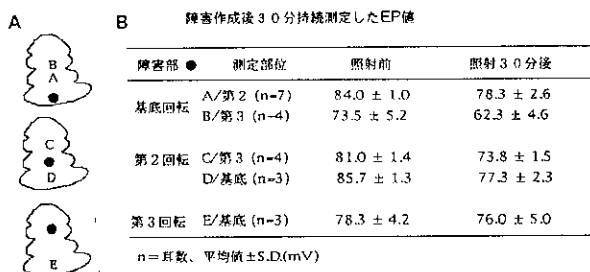


図3 光増感反応障害周辺部でのEPの変化(連続記録)

A: 障害部位を黒丸、EP測定部位をアルファベットで示している。B: EPは30分後までの部位でもやや減少の傾向を示すが、有意の差は見られない。

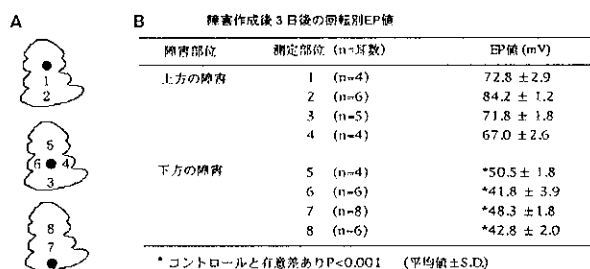


図4 光増感反応障害周辺部でのEPの変化(障害作成後3日)

イラストは蝸牛で、下から基底、第2、第3回転を示す。Aでは蝸牛での障害位置を黒丸で、EP測定部位を数字で示してある。Bは対応する部でのEP値をしめす。障害部位より上方ではEPは減少し、下方では有意の減少は見られない。

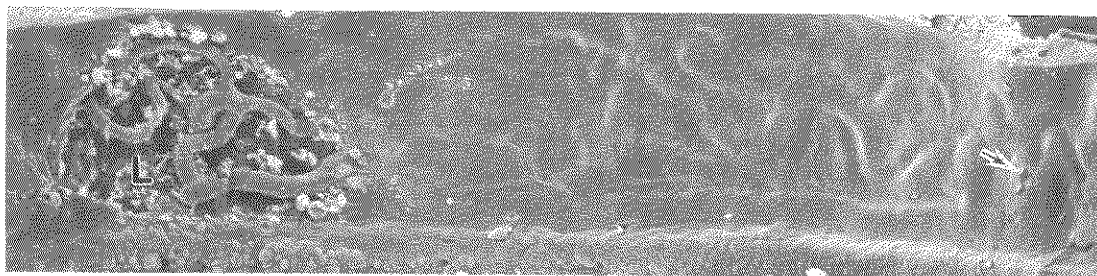


図5 障害部とEP電極刺入部をしめすSEM像(障害作成後3日)

血管条の障害部(L)とEP電極刺入部(矢印)の間には、正常にみえる辺縁細胞(S)がおおっている。

について奥村ら(1996)がすでに報告している。モルモットの外側壁にガラス電極を反復刺入して蝸牛管外側壁に機械的損傷をつくり、別の回転でEPを測定すると、下方の回転に障害をつくり、上方の回転でEPの測定をおこなうとEPは低下するが、上方の回転に障害をつくり下方回転で測定すると、変化がおこらないので、モルモット蝸牛のEP値低下の効果の波及には下方回転から上方回転に向かう方向性が存在するというものである。奥村は上方回転でのEP低下は障害作成後ただちに現われると報告しているが、我々の実験では30分間連続的に記録したがこの間に有意の低下はみられず、3日後の動物で明瞭に認められた。この違いが障害をつくる操作の違いによるものか、他に原因があるのかはさらに検討が必要である。

限局した障害は治癒も拡大することなく限局したままであるのに、EPが2週間でもとの値にもどるので、機能に可逆性があることがわかり、また下方回転の障害は上方回転のEPの低下をきたすことか

ら、障害が起る部位の違いで、さまざまなタイプの機能変化が起ることが示唆される。こうした現象は突発性難聴の臨床病態に一步近づいたものと考えられ、この動物モデルは今後さらに病態の解明するうえで有用である。

[参考文献]

- 1) 星野知之, 岩崎聡, 梅村和夫: 光増感反応を利用した限局性蝸牛障害モデル。急性高度難聴調査研究班平成5年度研究業績報告書 p.27-28, 1993
- 2) 奥村雅史: 蝸牛回転別の蝸牛内直流電位に関する実験的研究。大阪医大雑誌 55: 34-63, 1996
- 3) Iwasaki S, Mizuta K, Gao J, Wu R and Hoshino T: Focal microcirculation disorder induced by photochemical reaction in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 108: 55-64, 1997
- 4) Wu R, Hoshino T and Nagura M: Endocochlear potential in focal lesions of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 128: 103-111, 1999

モルモット蝸牛外側壁限局性障害モデルにおける聴力の検討

分科会長 星野知之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 大蝶修司・岩崎聡
 水田邦博 (浜松医大耳鼻咽喉科)
 梅村和夫 (浜松医大薬理)

【はじめに】

蝸牛外側壁の障害、特に血管条障害によると思われる急性感音性難聴のモデルとして、ローズベンガルと緑色光との光増感反応を利用し、モルモット蝸牛外側壁に限局した障害モデルを作製し、その形態学的変化を昨年の本会にて報告した。今回は同モデルにおける聴力について蝸牛神経複合活動電位 (CAP) 閾値を計測したので報告する。

【方法】

ローズベンガルを静注後白色モルモットの蝸牛第2回転の接線方向に緑色光を10分間照射し、照射前、直後、30分後、24時間後のCAP (4 kHz トーンバースト) を測定した(n=5)。コントロール群では生食を静注し、同様にCAPを測定した(n=5)。

【結果】

30分後まではCAP閾値に変化はなかったが、24時間後にはローズベンガル静注群で有意なCAP閾値の上昇を認めた。

【考察】

緑色光を蝸牛外側壁に垂直に照射した従来のモデルにおいてCAP閾値は30分後に上昇を認めたが、今回のように接線方向に照射した場合はCAP閾値の上昇を認めるまでにさらに長い時間を要した。これは従来のモデルにおいては蝸牛外側壁の障害に加えて蝸牛軸側血管の変性をきたし、そのために有毛細胞の変性をきたしていたものが、今回のモデルにおいては蝸牛軸側血管の変性を認めなかったことから、蝸牛外側壁の障害が2次的に有毛細胞に影響を与えたためと推察された。

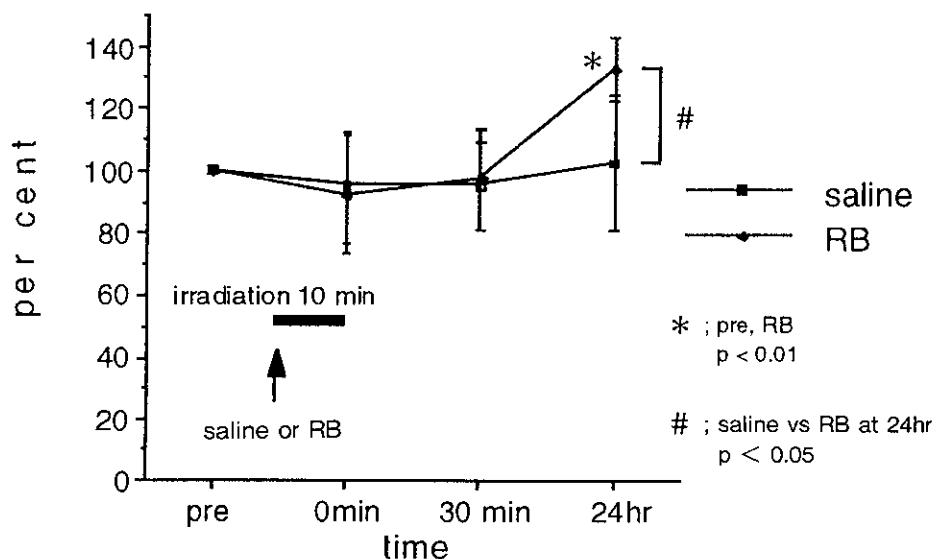


図 4000HzにおけるCAP閾値の時間的変化率

限局性蝸牛血流障害に対する薬剤効果の比較

分科会長 星野 知之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 名倉 三津佳・岩崎 聡・
呉 蓉・水田 邦博 (浜松医大耳鼻咽喉科)
梅村 和夫 (浜松医大薬理)

【はじめに】

蝸牛血流の低下は種々の感音性難聴の一因と考えられており^{1), 2), 3)}, 血流障害の改善が突発性難聴をはじめとする感音性難聴治療の中心となっている^{4), 5)}。現在突発性難聴の治療にはステロイド, ウログラフィン, 循環改善剤などが使用されているが, それら薬剤の蝸牛血流障害に対する効果を検討した報告は少なく, 本来検討されるべき蝸牛内一部に限局した血流障害に対する薬効評価は皆無である。今回我々はモルモット限局性蝸牛血流障害に対し, 突発性難聴の治療に汎用される異なった作用機序の薬剤を投与し, その効果を生理学的, 形態学的に比較したので報告する。

【方 法】

プライエル反射正常の白色モルモットをジアゼパム, フェンタニルにて麻酔, 気切後ヘッドホルダーに頭部を固定し, 自発呼吸下で実験を行った。光増感反応を用いて reactive oxygen species (ROS) を発生させ, 蝸牛第二回転に径約 1 mm の限局性血流障害を作成し, 非接触型レーザー血流計にて血流変化を測定した。このモデルに 10 分間かけてウログラフィン (600 mg/kg), ATP (4 mg/kg), ハイドロコチゾン (50 mg/kg, 100 mg/kg) の各前投与を行い血流障害に対する効果を比較した。測定終了後は走査型電子顕微鏡を用いて形態学的にも障害範囲の比較を行った。

【結果と考察】

ウログラフィン, ATP, ハイドロコチゾン (50 mg/kg, 100 mg/kg) の前投与により蝸牛血流はそれぞれ 122.2 %, 140.5 %, 105.7 %, 104.4 % に変化した。薬剤未投与の血流障害作成により, 蝸牛血流は 30 分後に 65.1 % まで低下したが, 各薬剤投与によりそれぞれ 84.1 %, 89.1 %, 93.1 %, 105.6 % となりハイドロコチゾン (100 mg/kg) は血流低下を有意に抑制した ($P < 0.05$)。形態学的にはハイドロコチゾン (100 mg/kg) の前投与により血管条辺縁細胞の障害範

囲は有意に縮小した (図 1)。このモデルの血流障害を誘導した ROS はミトコンドリア膜や内皮細胞の脂質過酸化を引き起こし細胞破壊や血栓の原因となると考えられている。ハイドロコチゾンは ROS による蝸牛血流障害, 血管条障害を軽減する可能性が示唆されたが, それはハイドロコチゾンの抗脂質過酸化作用⁶⁾によるものであることが推察された。

(対生食 : * $P < 0.01$)

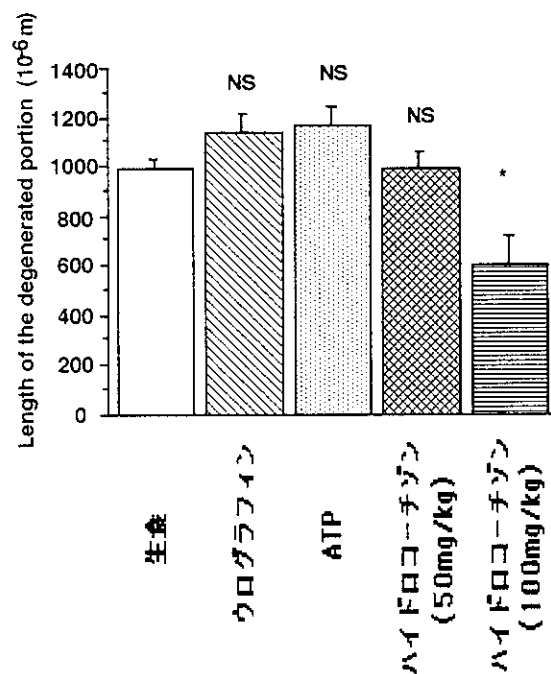


図 1

【参考文献】

- 1) Prazma, J.: Effect of glycerol on cochlea microcirculation. Acta Otolaryngol. (Stockh). 92: 459-461, 1981.
- 2) Johnson, A., Hawke, M., Berger, G.: Sudden deafness and vertigo due to inner ear hemorrhage: a temporal bone case report. J. Otolaryngol. 13: 201-207, 1984.
- 3) Thorne, P.R., Nuttall, A.L.: Laser Doppler

measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear. Res.* 27: 1-10, 1987.

- 4) Brechtelsbauer, P.B., Nuttall, A.L., Miller, J.M.: Basal nitric oxide production in regulation of cochlear blood flow. *Hear. Res.* 77: 38-42, 1994.
- 5) Kallinen, J., Laurikainen, E., Laippala, P., Gr始 man,

R.: Sudden deafness: A comparison of anticoagulant therapy and carbogen inhalation therapy. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 106: 22-26, 1997.

- 6) Otamiri, T.: Oxygen radicals, lipid peroxidation, and neutrophil infiltration after small-intestinal ischemia and reperfusion. *Surgery* 105: 593-597, 1989.

ステロイドホルモン投与および柴苓湯投与による免疫異常モデルマウス(MRL/lpr)の聴力の変化と組織学的変化に対する検討

分科会員 神 崎 仁 (慶應大耳鼻咽喉科)

共同研究者 井 上 泰 宏・小 川 郁
 増 田 正 純・保 谷 則 之
 武 井 聡・志津木 健 (慶應大耳鼻咽喉科)

【はじめに】

ループス腎炎のモデル動物のひとつである MRL/lpr マウス (以下 MRL マウス) は、感音難聴を自然発症することが報告されており、ヒトの自己免疫疾患に伴う難聴のモデル動物になる可能性が考えられている^{1,2)}。

一方、臨床的には免疫異常に伴うと考えられる難聴症例において、ステロイドホルモンやステロイドホルモンと同様の構造をもつ漢方薬である柴苓湯が、聴力改善に効果を示すことが報告されている³⁾。

そこで今回我々は、MRL マウスに柴苓湯およびステロイドホルモンを投与して、ABR 閾値および組織学的変化について検討し、自己免疫疾患に伴う難聴に対する、これらの薬剤の作用について考察した。

【対象と方法】

PSL (15mg/kg 腹腔内) または柴苓湯 (2.8% 混入飼料経口) を 16~18 週齢の MRL マウス各 8 匹に 2 週間投与して、聴力閾値の変化および蝸牛の組織学的変化について検討した。

聴力閾値については日本光電社製の neuropack4 を用い、ネンブタール腹腔麻酔下でクリック音刺激を用いて ABR を測定した。

また、組織学的検討では 8 匹中 2 匹に対して HE 染色を、6 匹に対して抗マウス免疫グロブリン抗体による免疫染色を行った。なお、コントロールとして、6 週齢~20 週齢まで薬剤無添加の飼料を与えた MRL マウス 6 匹を用いた。

【結果】

1) ABR 閾値

クリック音によって誘発した ABR の反応閾値は、薬剤投与前 37.5 ± 6.5 dB, ステロイド投与後 44.2 ± 5.9 , 柴苓湯投与後 40.3 ± 5.0 dB, コントロール群 38.3 ± 6.1 dB と、いずれも 30 から 40 dB 前後であり、統計学的有意差は認められなかった。

2) 組織学的検討

HE 染色像では、ステロイド投与群、柴苓湯投与群、コントロール群ともに蝸牛の構造は正常に保たれており、明らかな変化は認められなかった。また、蝸牛血管条にも、血管炎を思わせるような細胞浸潤は認められなかった。

一方、抗マウス IgG 抗体による免疫染色では、コントロール群すべてのマウスの血管条で IgG が染色されたのに対し、ステロイド投与群および柴苓湯投与群では各々 6 匹中 4 匹のマウスの血管条で IgG が染色されたが、残りの 2 匹においては、血管条に抗マウス IgG 抗体による免疫染色反応が認められなかった (図 1, 図 2)。



図 1 コントロール群の蝸牛 IgG 免疫染色
血管条に IgG の沈着が認められる。

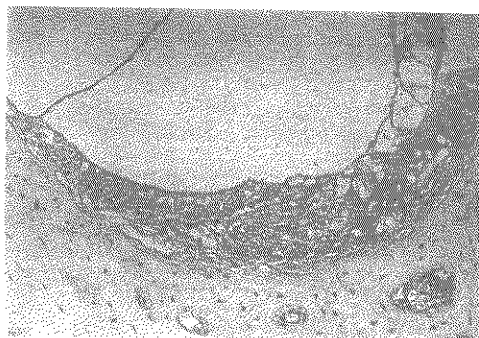


図 2 ステロイド投与後の蝸牛 IgG 免疫染色
6 匹中 2 匹において、血管条の IgG の沈着が認められなかった。同様に、柴苓湯投与群においても、6 匹中 2 匹で IgG は抽出されなかった。

[考案, 結論]

MRL マウスは、胸腺においてアポトーシスを支配する Fas 抗原の異常により、全身性リンパ節腫脹、高免疫グロブリン血症、抗 DNA 抗体などの自己抗体産生を生じるマウスである。これらの変化に伴い、SLE に類似した病像を自然発症することから、ヒトの自己免疫疾患に伴う難聴のモデル動物としてもいくつかの報告がされている。

草刈らは、ABR を用いた聴力の変化と組織学的変化について検討し、20 週齢を過ぎた時点で難聴が生じ、かつ光顕で血管条の萎縮が認められることを報告した。さらに、電顕による検討でも血管条基底膜の肥厚および辺縁細胞の Basal infolding の deposit が認められること、また、酵素組織学的に血管条の Na-K ATPase の活性が低下していることを報告し、IgG の沈着による血管条の機能異常が、難聴の原因ではないかとの考察をしている³⁾。

しかしながら、これまでの我々の検討では、少なくとも 4 週から 40 週齢までの経過観察において、click 音刺激による ABR の閾値には統計学的に有意な変化は認められていない。さらに、今回の実験ではステロイド投与群、柴苓湯投与群の両群ともに、6 匹中 2 匹で抗マウス IgG 抗体による免疫染色反応が認められなかったにもかかわらず、ABR の閾値にはコントロールと比較して、統計学的有意差を認めなかった。したがって、免疫染色における IgG の血管条への沈着それ自体は、難聴の発症と直接の関係がない可能性があると考えられた。

しかしながら、一方で、ステロイドや柴苓湯には

蝸牛の血管条における IgG の沈着を消失もしくは軽減する作用があることが今回の実験から確認された。

一方、免疫異常に伴う難聴を生じると考えられる大動脈炎症候群も、本来は弾性型動脈を侵す疾患であり、蝸牛血管条などの細動脈については血管炎を生じないとされている。したがって、現在のところ、大動脈炎症候群においても蝸牛機能に変化を生じる原因については不明である。しかしながら、これらの難聴に対しては、臨床的にステロイドや柴苓湯が効果を示すことがあることから、難聴の発生には、免疫異常にともなう血管炎以外の何らかの機序があると考えられる。これらの機序の解明のためにも、MRL マウスの難聴発現機序については、さらに検討していく必要があると思われる。

[参考文献]

- 1) Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 356: 314-317
- 2) Kusakari C, Hozawa K, Koike S, Kyogoku M, Takasaka T (1992) MRL/Mp-lpr/lpr mouse as a model of immune-induced sensorineural hearing loss. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl* 101 : 82-86
- 3) Kanzaki J, O-Uchi T, Tsuchihashi N (1993) Steroid-responsive sensorineural hearing loss : combination therapy with predonisolone and Sairei-to. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 55: 24-29

エンドセリンとその受容体の局在および W/W_v マウス血管条毛細血管 Basal lamina の肥厚と IgG 沈着に関する免疫細胞化学的研究

分科会員 牧 嶋 和 見 (産業医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 藤 村 武 之・相 良 哲 哉 (産業医大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

血管条の内リンパの産生と蝸牛管電位の発生には辺縁細胞細胞膜の Na⁺・K⁺ATPase が関与していると考えられているが、神経提由来の血管条中間細胞を欠損した変異体である W/W_v や W_v/W_v マウスを用いた研究によれば、これらの変異体マウスは、蝸牛管電位を発生しない(Steel et al., 1987; Schrott et al., 1990)ことから、中間細胞の蝸牛管電位の発生への関与が問題視されている。

近年、血管作動性ペプチドであるエンドセリン(ET)の血管条における局在や生理活性機能の一つとして Na⁺・K⁺ATPase 活性の調節機序が他の器官で指摘されている。

このような背景から血管条におけるエンドセリンの意義について解明するため、WBB6F1+/+ マウスとその変異体で、中間細胞を欠損した W/W_v マウスを用いて血管条における Na⁺・K⁺ATPase, エンドセリン, およびその受容体局在に関する免疫細胞化学的研究を施行した。

[方 法]

動物には3週令 WBB6F1+/+ マウスと3週令 WBB6F1W/W_v マウスを用いた。

- 1) 光顕試料は4%磷酸緩衝パラホルムアルデヒド液還流固定, アルコール脱水, パラフィン包埋した。
- 2) 電顕試料はKarnovsky液還流固定, 四酸化オスミウム液固定, エタノール脱水, エポン包埋ののち, 超薄切片を電子染色して検鏡した。
- 3) 光顕免疫細胞化学試料は1)の試料を脱パラフィンしたのち, ウサギ抗 ET-1 および ET-3 抗体, ET 受容体検索のためのウサギ抗 ETA 抗体, さらにウサギ抗ラット Na⁺・K⁺ATPase 抗体をそれぞれ一次抗体として, FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体で免疫染色し, 共焦点レーザー顕微鏡で検鏡した。

さらに IgG の免疫染色のために, ビオチン結合ヤギ抗マウス IgG 抗体を用い, LSAB 法で免

疫細胞化学を施行した。

- 4) 免疫電顕試料は間接酵素抗体法では PLP 液固定, OCT compound で包埋, 約 10 μm 厚凍結切片に, 上記一次抗体で免疫染色を施し, 四酸化オスミウム液後固定, エタノール脱水, エポン包埋ののち, 超薄切片を無電子染色で検鏡した。

免疫電顕法では PLP 液固定, 四酸化オスミウム液後固定, エポン包埋したのち超薄切片を作製し, 一次抗体にウサギ抗 ET-1 および ET-3 抗体を, 二次抗体に 15nm の金粒子結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用い, 電子染色を施し, 検鏡した。

[結 果]

光顕観察で, W/W_v マウス血管条は中間細胞の欠損による菲薄化が著名であった。超微形態学的観察で, W/W_v マウスの毛細血管の基底膜 (BL) が +/+ マウスに比べて約 250nm と顕著に肥厚していた。また光顕免疫細胞化学では, その肥厚した BL に IgG の免疫陽性反応が認められた。BL の肥厚と IgG の沈着は生後1週令の W/W_v マウスですでに認められた。

次に Na⁺・K⁺ATPase の免疫陽性反応は, +/+, および W/W_v マウスとも辺縁細胞および毛細血管周囲に認められ, その局在部位に有意差はなかった。また, ET-1, および ET-3 の免疫陽性反応は +/+ マウスでは中間細胞に認められたが, 辺縁細胞の免疫陽性反応は顕著でなかった。ETA の免疫陽性反応は, +/+ マウスの辺縁細胞に局在し, その局在性は同マウスの Na⁺・K⁺ATPase の局在性にほぼ一致した。

W/W_v マウスにおいては, ET-1 および ET-3 の免疫陽性反応は血管条には認められなかった。

免疫電顕で, Na⁺・K⁺ATPase の免疫陽性反応は, +/+, および W/W_v マウスとも辺縁細胞基底陥入部位の細胞膜に局在し, +/+ マウスでは中間細胞膜にも同免疫陽性反応が局在した。

ET-1 と ET-3 の免疫陽性反応は, 間接酵素抗体法では +/+ マウスの中間細胞の細胞膜に加えて, 中間細胞膜と相対する辺縁細胞の細胞膜にも認めら

れた。また中間細胞内のエンドセリンの免疫局在の識別のために用いた免疫金法ではET-1およびET-3免疫陽性金粒子は中間細胞の粗面小胞体、ゴルジ装置および細胞膜近傍の小胞に局在していた。なお、その局在性についてはET-1とET-3に有意差はなかった。

ETAの免疫陽性反応は+/+マウスの辺縁細胞膜、および中間細胞膜に局在した。

W/Wvマウスの辺縁細胞膜にはET-1とET-3の免疫陽性反応は認められなかった。3週令W/WvマウスにおけるIgGの免疫陽性反応は血管条毛細血管の内皮細胞間隙に認められた。

[考 案]

神経堤由来の中間細胞を欠損するW/Wvマウスの血管条毛細血管BLの肥厚と同部位へのIgGの沈着が注目された。また免疫電顕の所見からIgGは主として毛細血管内皮細胞間隙を経てBLに至ることが示され、W/Wvマウスの血管条毛細血管透過性の亢進が指摘された。

同様の所見は聴力障害を伴う自己免疫疾患モデルの一つであるNZB/klマウスの血管条(Sone et al.,1995)や30ヶ月齢スナネズミ(Sakaguchi et al.,1997)でも報告されているが、これらの所見と聴覚障害との因果関係について目下検討中である。

今回の研究は、蝸牛管電位発生に不可欠な Na^+ ・ K^+ ATPaseが蝸牛管電位を発生しないとされるW/Wvマウスの血管条の辺縁細胞膜にも局在することを明らかとした。

近年、血管内皮において、ET-1がETA受容体を介し、プロテインキナーゼCを活性化して細胞

膜の Na^+ ・ K^+ ATPase活性を亢進させるということ(Kawai et al.,1995)が報告されているが、+/+マウス血管条におけるET、およびその受容体に関する免疫細胞化学的所見から、神経堤由来の中間細胞がETを産生・放出する所謂constitutive pathwayの存在が示され、かつ放出されたETが辺縁細胞膜のETA受容体を介するparacrineによって蝸牛管電位発生に不可欠な辺縁細胞膜の Na^+ ・ K^+ ATPase活性化に関与することを示唆している。

従って、W/Wvマウスでは中間細胞欠損により、このような活性化機構がないため、蝸牛管電位が発生しないと考えられる。

[参考文献]

- 1) Steel KP et al : Strial dysfunction in mice with cochleo-saccular abnormalities. *Hear Res* 1987 ; 27 : 11-26.
- 2) Schrott A et al : Deterioration of hearing function in mice with neural crest defect. *Hear Res* 1990 ; 46 : 1-8.
- 3) Sone M et al : A substrain of NZB mouse as an animal model of autoimmune inner ear disease. *Hear Res* 1995 ; 83 : 26-36.
- 4) Sakaguchi N et al : Immunoglobulin deposition in thickened basement membranes of aging strial capillaries. *Hear Res* 1997 ; 109 : 83-91.
- 5) Kawai N et al : Endothelin 1 stimulates Na^+ , K^+ -ATPase and Na^+ -, K^+ -Cl⁻-Cotransport through ETA receptors and protein kinase C dependent pathway in cerebral capillary endothelium. *J Neurochem* 1995 ; 65 : 1588-1596.

難聴モデルマウスの解析

分科会員 喜多村 健 (自治医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 高橋 克昌 (自治医大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

近年のめざましい分子生物学の進歩によって、難聴モデルマウスにおける難聴原因遺伝子が数多く同定されている。マウス難聴遺伝子が単離されると、ヒトとの染色体相同部位の比較により遺伝性難聴の家系や難聴を伴う症候群家系が特定される^{1)~4)}。更にはヒトにおける同遺伝子中の変異が証明され、遺伝性難聴の発症機序が解明される。我々はかねてより、行動異常を伴う自然発生突然変異マウス“Wriggle Mouse Sagami (WMS)”が内耳奇形を伴い、難聴を呈することを報告してきた。今回我々は、交配実験により同マウスの遺伝型式を明らかにし、更なる生理学的・組織学的検討を加え、新しい知見を得た。

[対象と方法]

聴性脳幹反応(ABR)は以下の手順で行った。防音、電氣的に遮閉された暗室にPioneere社製ツイーターを設置、深麻酔したマウスを固定した。Dia Medical社製音刺激装置DPS-725より、立ち上がり、立ち下がり0.1msec、持続1msecの音刺激を70msecの頻度で、周波数と音圧を様々に変えてツイーターより出力した。ステンレス針を電極に用い、マウスの頭頂部を陽極、右耳後部を陰極、左耳後部を接地とした。NEC製のSynapac1100にて100-3000Hzのフィルターを通した誘導波形を500回加算平均した。

交配実験はホモ接合体、ヘテロ接合体、野生型を行動異常の有無と聴性脳幹反応の結果を踏まえて分別し、様々な組み合わせで行った。

組織学的検討のため、各月齢のWMSを深麻酔し、断頭直後に内耳骨包を摘出した。走査電子顕微鏡用標本はグルタルアルデヒドによる固定後、脱灰、エポキシ包埋を経て作成し、CO₂による臨界点乾燥にて作成した。走査電子顕微鏡は、日立製S-4100を使用した。光学顕微鏡標本は、通常のパラフィン切片作成後にH-E染色を施した。

[結果および考察]

ホモ接合体は生後早期より100dB SPL以上の高度

難聴を呈した。対して、ヘテロ接合体は生後1ヶ月までは中等度の難聴(生後2週間においては平均54dB SPL)を呈するが生後1ヶ月でホモ接合体と同等の高度難聴になることが分かった。野生型は今回測定し得た生後1年まで聴力正常であった。よって、WMSにおける行動異常の遺伝型式は劣性遺伝であるが、難聴は優性遺伝であることが明らかになった。

交配実験を行い、上記の遺伝型式を確認した。ヘテロ接合体と野生型(各P1)との交配にて生じた仔(F1)はヘテロ接合体：野生型がほぼ1：1であった($\chi^2=0.05$, $p=0.82$)。F1ヘテロ接合体同士の交配により、ホモ接合体：ヘテロ接合体：野生型がほぼ1：2：1の割合で分離し得た($\chi^2=2.61$, $p=0.27$)。F1野生型同士の交配では野生型しか生じなかった($n=40$)。

組織学的検討では、ホモ接合体において、生後3ヶ月より蝸牛コルチ器の変性が認められた。変性は基底回転より頂回転へと進み、生後6ヶ月においてはほぼ全ての外有毛細胞は脱落し、ラセン神経節細胞は激減した。生後1年では全ての有毛細胞は消失した。前庭では球形嚢において変性が生じ、生後3ヶ月において球形嚢感覚上皮の層が薄くなり、生後6ヶ月においては感覚上皮は全て消失していた。対してヘテロ接合体では、蝸牛コルチ器において生後3ヶ月よりホモ接合体と同様の変性を認めたが、障害の程度は軽度であった。球形嚢においては調べ得た月齢で変性は全く認められなかった。野生型は内耳における組織学的異常は認められなかった。

ヒトにおける遺伝性難聴では、症候群性難聴の多くは劣性遺伝型式であるが、非症候群性難聴は性染色体遺伝(DFN)、劣性遺伝(DFNB)と優性遺伝(DFNA)とに分けられる。優性遺伝型式をもつ難聴モデルマウスはDFNAのモデルになりうると推測される。しかし、劣性遺伝の難聴マウスをモデルとするヒトの難聴家系において、優性遺伝型式を取ることも知られており⁵⁾、同じ遺伝子変異でも種間によって表現型に違いがあることが分かっている。WMSマウスも遺伝型式や表現型の違いを越えて、予測だにできなかったヒト遺伝病のモデルである可能性もある。

遺伝子連鎖解析によって、WMSの原因遺伝子はマ

ウス第6染色体に存在することが疑われている（大沢, 未発表データ）。可能性のある範囲が広く, この部位と相同性のもつヒト難聴家系は今のところ特定されていないが, 今後, 解析が進むにつれて相同部位に一致する家系が特定されるかもしれない。その際はモデルマウスにおける代替実験により, 遺伝子の内耳における発現や難聴の発症機序を明らかにできる。

[参考文献]

- 1) Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Harris R, Balling R et.al. Waardenburg's syndrome patients have mutations in the human homologue of the Pax-3 paired box gene. *Nature* 355: 635-6, 1992
- 2) Tassabehji M, Newton VE, Read AP. Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat Genet* 8: 251-5, 1994
- 3) Weil D, Kussel P, Blanchard S, Levy G, Levi-Acobas F et.al. The autosomal recessive isolated deafness, DFNB2, and the Usher 1B syndrome are allelic defects of the myosin-VIIA gene. *Nat Genet* 16: 191-3, 1997
- 4) Wang A, Liang Y, Fridell RA, Probst FJ, Wilcox ER et.al. Association of unconventional myosin MYO 15 mutations with human nonsyndromic deafness DFNB3. *Science* 280: 1447-51, 1998
- 5) Tamagawa Y, Kitamura K, Ishida T, Ishikawa K, Tanaka H et. al. A gene for a dominant form of non-syndromic sensorineural deafness (DFNA11) maps within the region containing the DFNB2 recessive deafness gene. *Hum Mol Genet* 5: 849-52, 1996

マウス蝸牛における PACAP とそのレセプターの発現

分科会員 東野 哲也 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 下 蘭 政 巳・河 野 浩 万
小 宗 静 男 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

PACAP(Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide)は、視床下部より単離、精製されたペプチドである¹⁾。その後の研究により、PACAPは哺乳類の中樞神経系に広く分布し、細胞内情報伝達系においてcAMPを上昇させる作用があることがわかってきた²⁾。したがって、蝸牛においても neurotransmitter もしくは neuromodulator としての役割を担っている可能性が示唆される。

今回我々はマウス蝸牛における PACAP とそのレセプターの mRNA 遺伝子の発現を RT-PCR を用いて検討したので、報告する。

[方 法]

ウレタン麻酔下(2 mg/Kg i.p.)にマウスを断頭し、positive control としてマウスの脳とマウスの側頭骨をすばやく摘出した。さらに実体顕微鏡下に蝸牛のみを取り出し、TRIzol Reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.)を用いて、蝸牛と脳からそれぞれ RNA を抽出した。逆転写酵素により cDNA を合成した。既知マウスの PACAP³⁾ および PACAP receptor⁴⁾ のプライマーを用い、それぞれ PCR を施行した。その PCR 産物をエチジウムブロマイドで染色し、アガロースゲル電気泳動にて PCR 産物のサイズを確認した。

[結 果]

マウスの脳を positive control として用いて、マウス脳と蝸牛からそれぞれ既知の PACAP の gene-specific primer から、予想される同一のサイズのバンド (530 bp) を得た。さらに既知の PACAP レセプターの gene-specific primer を用いた RT-PCR においても、マウス脳と蝸牛からそれぞれ予想される同一のサイズのバンド (411 bp) が得られた。

[考 察]

最近の研究で、脳に分布する種々の neuropeptide の mRNA が内耳にも発現し、局所の神経伝達や内耳

の機能発現の調節因子として関与している可能性が示唆されている。今回検討を行った PACAP は視床下部から抽出された新しい neuropeptide で、secretin/glucagon/VIP の family peptide として知られている¹⁾。このペプチドは Gs protein の系にリンクし、種々の細胞において細胞内 cAMP を上昇させることにより、生理機能を発現するとされている²⁾。PACAP は vasoactive intestinal polypeptide (VIP) と高い相同性を示すことが知られているが、その cAMP 産生機能は VIP より 1000 倍強力であるとされる⁵⁾。内耳における VIP の発現を確認した Kitano ら⁶⁾ は、内耳液の water balance の調節因子として関与する可能性を挙げている。蝸牛管側壁や内リンパ嚢における PACAP や PACAP レセプターの分布の証明が必要である。

これまでの研究で PACAP receptor には 2 つのサブタイプが知られている。そのうちの Type I は Gq protein の系にもリンクし、細胞内 Ca を上昇させることにより神経系における neuromodulator としての役割が想定されている⁷⁾。蝸牛においても、神経系への関与の可能性が高いと思われるが、今後、形態学的な裏付けが必要である。

近年、中枢神経系における発生過程や病的条件下での神経細胞死が、種々の神経栄養因子により調節されていることがわかってきた。条件によっては neuropeptide が神経保護効果を発揮するとされ、PACAP はその候補と考えられている⁷⁾。内耳における神経保護のメカニズムは十分に解明されていないが、PACAP の役割も検討すべきであろう。

今回の我々の結果は、マウス蝸牛において PACAP およびそのレセプターの mRNA 遺伝子の発現を示したに過ぎない。その機能的意義、蝸牛内局在については現在検討中である。

[文 献]

- 1) Miyata A, Arimura A, Dahl RR, et al: Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem*

- Biophys Res Commun 1989;164:567-574.
- 2) Arimura A, Shioda S: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: neuroendocrine and endocrine interaction. *Front. Neuroendocrinol* 1995; 16 : 53-58.
 - 3) Okazaki K, Itou Y, Ogi K, et al: Characterization of murine PACAP mRNA. *Peptides* 1995;16(7):1295-1299.
 - 4) Hashimoto H, Yamamoto K, Hagiwara N, et al: cDNA cloning of a mouse pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptor. *Biochem Biophys Acta* 1996;1281(2):129-133.
 - 5) Tatsuno I, Gottschall PE, Koves K, et al.: Demonstration of specific binding sites for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in rat astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;168:1027-1033.
 - 6) Kitano H, Takeda T, Suzuki M, et al: Presence of mRNA for vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and its receptor in the rat inner ear. *Hear Res* 1998;121:109-111.
 - 7) Morio H, Tatsuno I, Hirai A, et al: Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide protects rat-cultured cortical neurons from glutamate-induced cytotoxicity. *Brain Research* 1996;741:82-88.

蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察

分科会員 福田 諭 (北大耳鼻咽喉科)

共同研究者 檜山 繁樹・犬山 征夫 (北大耳鼻咽喉科)
阿部 和厚 (同・第三解剖)

【はじめに】

蓋膜は、蝸牛コルチ器の上を覆う膜様の細胞外組織であり、コルチ器有毛細胞の感覚毛が屈曲し、それを契機として有毛細胞が脱分極する過程で、基板板とともに、重要な役割を担っている。蓋膜下面には、外有毛細胞の上部に位置する膜様組織に、感覚毛による圧痕がある。このことは、外有毛細胞感覚毛と蓋膜下面が常に結合していることを証明する¹⁾。蝸牛の周波数選択性は、回転による解剖学的な差から生じると考えられている²⁾。しかしながら、蓋膜と外有毛細胞感覚毛の結合にもその差があるのかは不明である。原子間力顕微鏡 (atomic force microscope, AFM) はカンチレバーで試料表面を走査することでその表面構造を画像化する新しい顕微鏡である³⁾。電子顕微鏡では電子染色や金属蒸着で修飾された試料を観察するが、AFMは試料の導電性を必要としないので、試料表面を直接に画像化することができる。三次元的解像度が高いこと、立体計測が可能であることも特徴である。本研究は、AFMを用いて、圧痕の三次元的超微構造を検討し、蓋膜と外有毛細胞感覚毛の機能的結合様式を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

実験動物に成熟 dd マウスを用いた。化学固定した蝸牛から蓋膜を摘出した。蓋膜を、液中にてポリ-L-リジン処理した硝子に貼り付け、臨界点乾燥し観察した。基底回転、中回転、頂回転の各場所で、30個の圧痕の幅と深さを測定した。統計学的解析には各群間の平均値の比較は one-way ANOVA を用いて、Post-Hoc test として Fisher's PLSD 法を用いた。

【結 果】

蓋膜下面の外有毛細胞上部にあたる膜様組織 Hardesty's membrane には、径 20 から 50nm の粒子像が数珠つなぎに走行しているのが認められた。Hardesty's membrane には外有毛細胞感覚毛と同じ配列を示す W 字型の圧痕が観察された。圧痕の配列は、

基底回転から頂回転に向かうに連れ、W 字型の底辺の角度が鋭角に変化し、外有毛細胞感覚毛の配列の回転による変化と一致した。圧痕を詳細に観察すると、周縁がやや突出するクレーター様の構造を示し、さらに、圧痕の周囲や内側壁は径 20 から 50nm の粒子像からなるのが観察された。前述した粒子像と比べて、圧痕を構成する粒子像は規則的配列を示さず、また密に存在していた。圧痕の幅は、基底回転、中回転、頂回転においてそれぞれ、 267.3 ± 18.9 , 329.9 ± 27.1 , 351.9 ± 23.5 (平均±標準偏差) nm であり、統計学的に各回転で有意差 ($p < 0.01$) を示し、頂回転に行くほど大きくなった。この結果は、外有毛細胞感覚毛が回転に伴って太くなる傾向と一致した。一方、深さは各回転でばらつきがあり、それぞれ、 42.5 ± 14.7 , 47.6 ± 13.1 , 52.3 ± 12.6 nm であり、統計学的に各回転で有意差を示さなかった。

【考 察】

従来 Hardesty's membrane は走査電顕的研究から無構造な膜様組織とされていたが¹⁾、AFMで観察すると、径 20 から 50nm の粒子像から構成されていた。組織化学的研究からこの部位は、感覚毛と蓋膜の結合に関与する糖蛋白などの糖関連物質からなることが知られている⁴⁾。圧痕の粒子像は糖関連物質の配列様式を表し、感覚毛と蓋膜が機能的結合形態を持つことを示している。すなわち、感覚毛が刺さる部位は、糖関連物質が多く、さらに盛り上がり分布し、しっかりと感覚毛を固着させる機能的構築を示す。本研究の立体計測の結果は、蓋膜下面の圧痕が、生理的条件下における外有毛細胞感覚毛と蓋膜の結合様式を表していることを示すとともに、外有毛細胞感覚毛と蓋膜との結合が部位により異なっていることを示す。したがって、この結合は、蝸牛の部位によって異なる周波数選択性に関与していることを示唆する。本研究は、AFMを用いて蓋膜下面の圧痕表面を三次元的に観察し、立体計測することで、外有毛細胞感覚毛と蓋膜の機能的結合様式を明らかにした。

[参考文献]

- 1) Lim, D.J. ; Fine morphology of the tectorial membrane.: Its relationship to the organ of Corti. Arch. Otolaryngol. 1972; 96: 199-215.
- 2) Lim, D.J. ; Functional structure of the organ of Corti: a review. Hear. Res. 1986; 22: 117-146.
- 3) Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. ; Atomic force microscope. Phys. Rev. Lett. 1986; 56: 930-933.
- 4) Munyer, P.D. and Schulte, B.A. ; Immunohistochemical localization of keratan sulfate and chondroitin 4-and 6-sulfate proteoglycans in subregions of the tectorial membrane and basilar membrane. Hear. Res. 1994; 79: 83-93.

Megalin の蝸牛管における局在

分科会長 星野知之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 水田邦博・名倉三津佳
渡辺高弘 (浜松医大耳鼻咽喉科)

[はじめに]

メガリンは以前は gp330 とよばれ、ヒトの membranous nephropathy の動物モデルとして知られる Heymann 腎炎の抗原であり (Farquhar et al., 1995), Saito ら (1994) の分子配列の解析から LDL receptor に属することがわかっている。メガリンは coated pit-mediated endocytosis の signal である NPXY 配列を含んでいて、その ligand として plasminogen, plasminogen activator-inhibitor complexes, lactoferrin, lipoprotein lipase, aprotinin, Ca²⁺ などがある。近年、近位尿細管細胞でメガリンがアミノ配糖体系薬物の取り込みに関与していることが報告された (Hammond et al., 1997)。内耳でも endocytosis や耳毒性、腎毒性の共有という観点からメガリンの存在が期待されたため、超微形態レベルで調べた (Mizuta et al., in press)。

[方 法]

Wistar 系ラットを用いた。固定後、通常の方法で Lowicryl K4M に低温包埋し、超薄切片をニッケルグリッドにひろった。まず切片を 1% BSA/PBS に浸し、抗ラットメガリンのウサギ抗体 (from Dr. Marilyn Gist Farquhar, 新潟大学医学部 腎研究施設 分子病態学分野, 齊藤亮彦先生の御協力による。) 1 μ g/ml に overnight, 4 $^{\circ}$ C で反応させ、洗浄の後、二次抗体 (15nm 金コロイド標識抗ウサギ IgG ロバ抗体) を 1 時間室温で反応させた。ウラン鉛二重染色のあと電顕下に観察した。コントロールは一次抗体の代わりに正常ウサギ抗体を同濃度で用いた。さらに positive control として近位尿細管にも同染色を行った。

[結果と考察]

反応は近位尿細管細胞の brush border 下の endocytic vacuole, 血管条辺縁細胞の頂膜とその下の vesicle, ラセン隆起の上皮細胞と Reissner 膜の epithelial cell のやはり頂膜側に認められた。これに反し血管条中間細胞, 基底細胞, ラセン靱帯の細胞の

膜には反応は認められなかった。また、コルチ器の有毛細胞, 支持細胞にも反応は認められなかった。近位尿細管細胞での分布はすでに免疫染色で報告されているものと一致した。近位尿細管細胞ではメガリンは関連蛋白とともに endosome に向かいそして膜へ帰るというサイクルをしているという (Farquhar et al., 1995)。血管条辺縁細胞や Reissner 膜での endocytosis は報告されており (Hinojosa, 1972; Hunter-Duvar, 1978), メガリンの分布は辺縁細胞と近位尿細管細胞で酷似しているの、辺縁細胞でも同様の働きをしているものと思われる。今後メガリンの役割や病態との関連などの解明が期待される。

[参考文献]

- 1) Farquhar, M.G., Saito, A., Kerjaschki, D. and Orlando, R.A. (1995) The Heymann nephritis antigenic complex: megalin (gp330) and RAP. *J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 35-47.
- 2) Hammond, T.G., Majewski, R.R., Kaysen, J.H., Goda, F.O., Vavar, G.L., Pontillon, F. and Verroust, P.J. (1997) Gentamicin inhibits rat renal cortical homotypic endosomal fusion: role of megalin. *Am. J. Physiol.* 272, F117-F123.
- 3) Hinojosa, R. (1972) Electron microscope studies of the stria vascularis and spiral ligament after ferritin injection. *Acta Otolaryngol. (Stockh.)* 74, 1-14.
- 4) Hunter-Duvar, I.M. (1978) Reissner's membrane and endocytosis of cell debris. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.* 351, 24-32.
- 5) Mizuta, K., Saito, A., Watanabe, T., Nagura, M., Arakawa, M., Shimizu, F. and Hoshino T. Ultrastructural localization of megalin in the rat cochlear duct. *Hear Res.* in press.
- 6) Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A.K.-C. and Farquhar, M.G. (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/ megalin, a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9725-9729.