

## マウス内耳におけるアドレノメデュリンの発現

分科会長 東野 哲也 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 下 蘭 政 巳・堀之内 謙 一  
河 野 浩 万・小 宗 静 男 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

### [研究要旨]

[目的] マウス内耳蝸牛におけるアドレノメデュリンの mRNA 遺伝子の発現を RT-PCR (reverse-transcriptase polymerase chain reaction) とその局在を immunohistochemistry を用いて検討した。[方法と結果] ウレタン麻醉下にマウスの側頭骨と positive control としてラットの心臓を摘出した。実体顕微鏡下に蝸牛のみを取り出し、マウス蝸牛とラット心臓からそれぞれ RNA を抽出した。逆転写酵素により cDNA を合成し、アドレノメデュリンのプライマーを用い、RT-PCR を施行し、その PCR 産物をアガロースゲル電気泳動したところ、予想されるサイズのバンドが確認された。immunohistochemistry は同じくマウスの側頭骨を取り出し、蝸牛の正円窓と卵円窓から固定液にて灌流固定後、脱灰パラフィン包埋し切片を作成し、脱パラ後抗ヒトアドレノメデュリンと反応させて光顕にて観察した。immunohistochemistry では血管条に陽性所見を認めた。[まとめ] マウス内耳蝸牛においてアドレノメデュリンの mRNA 遺伝子の発現とマウス蝸牛外側壁においてアドレノメデュリン様の免疫活性の存在が示唆された。

### [研究目的]

アドレノメデュリンはラット血小板中の cAMP の増加活性を指標に、ヒト褐色細胞腫組織抽出液より発見された強力な血管拡張性の生理活性ペプチドである<sup>1)</sup>。その後の研究により、その遺伝子構造があきらかになり、副腎髄質以外に、肺、腎、心、血管などでも生合成されていることが明らかとなった<sup>2)</sup>。それに伴い作用に関しても血管拡張作用以外に種々の作用が報告され、最近内耳においてもそれらの作用と拮抗するような生理活性ペプチドの存在が示されている<sup>3,4)</sup>。今回我々はマウス蝸牛におけるアドレノメデュリンの mRNA 遺伝子の発現を RT-PCR を用いて調べさらにその局在を immunohistochemistry にて検討した。

### [研究方法]

RT-PCR: ウレタン麻醉下 (2 mg/Kg i.p.) にマウスを断頭し、マウスの側頭骨をすばやく摘出し、さらに実体顕微鏡下にマウス蝸牛のみを取り出した。positive control としてはラットの心臓を用いた。TRIzol Reagent (Gibco BRL, Life Technologies, Inc.) を用いて、蝸牛と心臓からそれぞれ RNA を抽出した。逆転写酵素により cDNA を合成した。既知ラットのアドレノメデュリン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。

免疫組織染色: 麻醉下にマウス側頭骨を取り出し、蝸牛の正円窓と卵円窓から Zamboni の固定液にて灌流固定後、EDTA 溶液中にて脱灰しパラフィンに包埋し 4 $\mu$ m の切片を作成した。脱パラ後抗ヒトアドレノメデュリンと反応させ、EnVison (DAKO) とインキュベートさせて DAB にて発色光顕的に観察した。

### [倫理面への配慮]

一連の実験は十分な麻醉下に行い、組織採取時も多量の麻醉下で苦痛を与えずに断頭した後に行った。

### [研究結果]

RT-PCR: ラットの心臓とマウスの蝸牛からそれぞれ既知のアドレノメデュリンの gene-specific primer から、予想される同一のサイズのバンド (199 bp) を得た。

免疫組織染色: 蝸牛軸の細動脈及び血管条に陽性所見を認めた。細動脈は血管平滑筋細胞、血管条は辺縁細胞、中間細胞、基底細胞すべてに染色を認めた (図 1)。

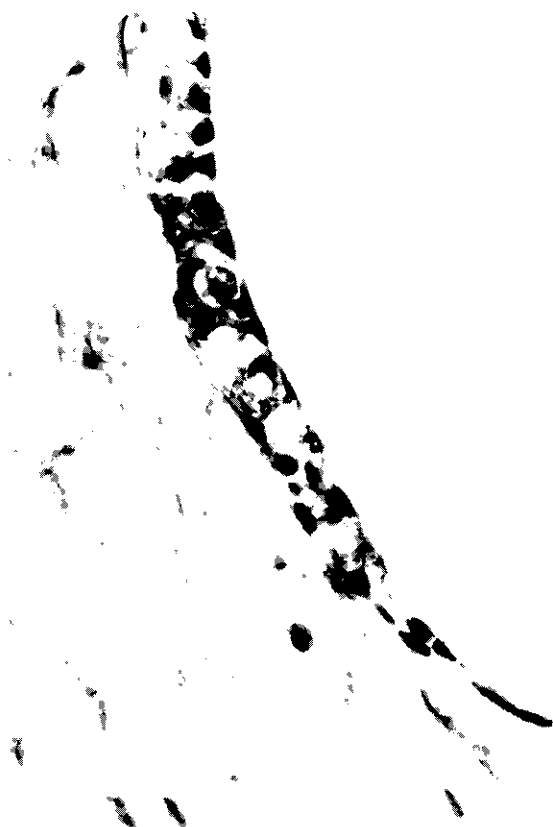


図1 抗アドレノメデュリン抗体による免疫染色（中央階側壁の鼓室階側）。血管条に陽性所見を認める。

### [考 察]

アドレノメデュリンはそのアミノ酸配列で calcitonin gene related peptide (CGRP) に相同性があり、降圧作用などの類似点を考えると両ペプチドは1つのスーパーファミリーに属するものと考えられている<sup>1)</sup>。内耳においても CGRP の局在とその血流調節機能が報告されている<sup>5,6)</sup>。今回、蝸牛の血流調節に中心的な役割を有するとされる蝸牛軸の細動脈平滑筋細胞に陽性所見を認めたことより、本ペプチドが蝸牛血流の調節に直接関わっていることが示唆される。

また最近の研究で、心房性利尿ペプチド<sup>6)</sup>、バソプレッシン<sup>3)</sup>、エンドセリン<sup>4)</sup> など多種の神経ペプチドが内耳機能や神経伝達の調節因子として重要な働きを担っている可能性が示されている。アドレノメデュリンは血管内皮細胞からのエンドセリン分泌抑制作用や下垂体におけるバソプレッシン分泌抑制作用などがあることより、これらの生理活性が内耳液の恒常性維持のためのフィードバックシステムとして作用している可能性が高い。血管条に分布が確認されたことは、内耳液電解質バランスや蝸牛内静止電位の維持にも関与していることが想定される。ア

ドレノメデュリンを含む多数の内因性生理活性物質の相互作用の異常が急性内耳性難聴発症に如何に関わるかが今後の検討課題である

### [参考文献]

- 1) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y, Nakamura S, Matsuo H, Eto T: Adrenomedullin, a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma, *Biochem Biophys Res Commun* 192 (1993) 553-560.
- 2) Asada Y, Hara S, Marutsuka K, Kitamura K, Tsuji T, Sakata J, Sato Y, Kisanuki A, Eto T, Sumiyashi A: Novel distribution of adrenomedullin-immunoreactive cells in human tissues, *Histochem cell Biol*. 112 (1999) 185-191.
- 3) Kitano H, Takeda T, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Kimura H, Tooyama I: Vasopressin and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear, *NeuroReport* 8 (1997) 2289-2292.
- 4) Franz P, Kronberer C, Egerbacher M, Bock P, Stach M, Quint C, Aharinejad S: Localization of Endothelin-1 and Endothelin-3 in the cochlea, *Acta Otolaryngol (Stockh)* 117 (1997) 358-362.
- 5) Carlisle L, Aberdeen J, Forge A, Burnstock G: Neural basis for regulation of cochlear blood flow: Peptidergic and adrenergic innervation of the spiral modiolar artery of the guinea pig, *Hear Res*. 43 (1990) 107-114.
- 6) Quirk S, Seidman D, Laurikainen A, Nuttall L, Miller M: Influence of calcitonin-gene related peptide on cochlear blood flow and electrophysiology, *Am J. Otol.* 15 (1994) 56-60.

### [研究発表]

〈論文発表〉

投稿中

〈学会発表〉

第9回 日本耳科学会総会

### [知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

## マウス蝸牛における Basigin の発現

分科会長 東野 哲也 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 河野 浩万・小宗 静男 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

### 〔研究要旨〕

Basigin は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白で、脳血液関門の主要マーカーとして知られる。蝸牛においても血液内耳関門としての役割が想定されるため、Basigin の蝸牛内発現について RT-PCR 法と免疫染色法を用いて検討を行った。Basigin は、内耳道内蝸牛神経の毛細血管内皮細胞と血管条基底細胞で陽性所見を認めたが、蝸牛軸内及び膜迷路の毛細血管は陰性であった。このことは蝸牛内と脳においては毛細血管のバリアー機構に差があることを示すとともに、Basigin が血管条機能と密接な関係を担っていることが示唆される。

### 〔研究目的〕

蝸牛内の特殊な電解質・電位環境を維持するためには、選択的な物質の輸送メカニズムが必要不可欠であり、以前より血液内耳関門の重要性が指摘されてきた<sup>1)</sup>。血液内耳関門の蝸牛内存在様式に関しては、電顕的研究により解明されてきたが<sup>2)</sup>、近年では分子生物学的な方面からも機能と構造の解明が試みられている。血液脳関門 (BBB) において様々なタンパク質が毛細血管内皮細胞に局在することが報告され、BBB との関係が示唆されているが、蝸牛においても glucose transporter<sup>3)</sup> や P-glycoprotein<sup>4)</sup> の発現に基づいて血液内耳関門との関連性が指摘されている。

Basigin は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白であり、脳、精巣、腎臓、心臓、肝臓、小腸と多くの臓器で同定されており、さまざまな生物学的な機能が示唆されている<sup>5)</sup>。この糖蛋白は、BBB を有しない脳室周囲組織では認められないのに対し、BBB を有する脳毛細血管内皮細胞で特異的に発現すること<sup>6)</sup>、Basigin の発現時期と BBB の形成される時期がほぼ同時期であることから<sup>7)</sup>、BBB 機能との関連が示唆されている。今回我々は、マウス蝸牛における Basigin の発現について検討したので報告する。

### 〔研究方法〕

RT-PCR 法：動物は、ICR 系マウスを用いた。ネブタール深麻酔後、断頭し蝸牛のみを摘出、RNA を抽出後、逆転写酵素により cDNA を合成した。Positive control として脳を用いた。Basigin に特異的なプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物はアガロースゲル電気泳動にてそのサイズを確認した。

免疫染色法：麻酔下に ICR 系ラットをブアン固定液で経心灌流した後、蝸牛を摘出して同固定液にて一晚浸漬した。脱灰後パラフィンに包埋し 4 μm 厚の切片を作成した。脱パラフィン後、坑 Basigin 抗体と反応、リン酸緩衝液で洗浄した後シンプルステイン PO (ニチレイ) と反応させた。DAB にて発色させた標本を光学顕微鏡にて観察した。

### 〔倫理面への配慮〕

組織採取は、多量の麻酔下で苦痛を与えずに断頭した後に行った。

### 〔研究結果〕

RT-PCR 法：予想サイズの産物が得られ、その塩基配列は、既知の Basigin の塩基配列の一部であることが確認された。

免疫染色法：内耳道内蝸牛神経の毛細血管内皮細胞は強陽性であったが、蝸牛軸内では神経、ラセン神経節ともに毛細血管の染色性は陰性であった。蝸牛管側壁においては、血管条、ラセン靭帯の毛細血管は陰性であったが、血管条基底細胞に陽性所見を認めた。(図 1)

### 〔考 察〕

毛細血管における Basigin の発現性において、内耳道内と蝸牛の間に差が認められたことは興味深い。強陽性を示す内耳道内蝸牛神経は、脳の毛細血管と共通した性質を示唆する。これに対し、蝸牛軸を含む蝸牛の毛細血管は染色性が認められず、脳毛細血管と性質を異にするものと考えられる。その意味で

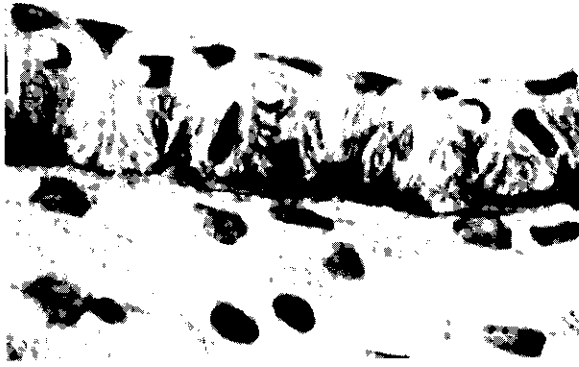


図1 抗Basigin抗体を用いた免疫染色。血管条基底細胞に陽性反応が認められる。

はラセン靭帯の毛細血管が「脳型」とする報告<sup>2)</sup>とは矛盾する結果であった。また、血管条基底細胞に陽性所見が認められたことより、血管条とラセン靭帯間での輸送機能に関係している可能性も示唆される。Basiginの役割については不明な点が多いが、蝸牛における機能の解明が今後の課題である。

### 【結 論】

脳血液関門の主要マーカーであるBasiginは、蝸牛内の毛細血管には発現が認められなかったが、血管条基底細胞に陽性所見が確認された。Basiginの血管条機能への関与が推定される。

### 【謝 辞】

名古屋大生化学第一の門松健治先生の御協力に深く感謝いたします。

### 【参考文献】

- 1) Juhn SK, Rybak LP and Prado S: Nature of blood-labyrinth barrier in experimental conditions. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 90: 135-141, 1981.
- 2) Sakagami M, Matsunaga T and Hashimoto PH: Fine structure and permeability of capillaries in the stria vascularis and spiral ligament of the inner ear of the guinea pig. *Cell Tissue Res* 226: 511-522, 1982.
- 3) Ito M, Spicer SS and Schulte BA: Immunohistochemical localization of brain type glucose transporter in mammalian inner ears: comparison of developmental and adult stages. *Hear Res* 71: 230-238, 1993.
- 4) Saito T, Zhang ZJ, Tsuzuki H, Ohtsubo T, Yamada T, Yamamoto T and Saito H: Expression of P-glycoprotein in inner ear capillary endothelial cells of the guinea pig with special reference to blood-inner ear barrier. *Brain Res* 767: 388-392, 1997.
- 5) Miyauchi T, Kanekura T, Yamaoka A, Ozawa M, Miyazawa S and Muramatsu T: Basigin, a new, broadly distributed member of the immunoglobulin superfamily, has strong homology with both the immunoglobulin V domain and the beta-chain of major histocompatibility complex class II antigen. *J Biochem (Tokyo)* 107: 316-323, 1990.
- 6) Albrecht U, Seulberger H, Schwarz H and Risau W: Correlation of blood-brain barrier function and HT7 protein distribution in chick brain circumventricular organs. *Brain Res* 535: 49-61, 1990.
- 7) Risau W, Hallmann R, Albrecht U and Henke-Fahle S: Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier specific endothelium. *Embo J* 5: 3179-3183, 1986.

### 【研究発表】

〈論文発表〉

Kawano H, Tono T, Kadomatsu K, Muramatsu T, Komune S: Expression of basigin, a member of the immunoglobulin superfamily, in mouse cochlea. submitted.

〈学会発表〉

第10回 日本耳科学会総会

### 【知的所有権の取得状況】

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

# カイニン酸局所投与による一過性聴力障害ラットモデル

分科会長 東野 哲也 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 河野 浩万・小宗 静男 (宮崎医大耳鼻咽喉科)

## 【研究要旨】

ラット蝸牛の蝸牛窓膜上にカイニン酸を投与し、蝸牛電位の変化を観察した。カイニン酸投与2時間後には急激なCAPの低下をきたしたが、投与後3日後には回復傾向が認められ、10日後には閾値はほぼ投与前のレベルにもどった。急性期の光顕像で内毛細胞下の神経終末膨化所見が観察され、一次ニューロン樹状突起レベルで生じたカイニン酸による興奮毒性が示唆された。この難聴モデルが可逆性を示すことから突発性難聴の動物モデルの一つとして検討されるべき病態と考えられた。

## 【研究目的】

蝸牛の求心性神経伝達物質とされるグルタミン酸が過剰になると細胞傷害性に働くことが知られている。グルタミン酸レセプターのアゴニストであるAMPAやカイニン酸を外リンパ灌流したり1)、経蝸牛窓膜的に投与すると2)、急激な活動電位(CAP)の低下をきたして、組織学的には内毛細胞下の神経終末の膨化所見が観察される。Puelら1)は、モット蝸牛におけるAMPA外リンパ灌流による急性のCAP低下が数日で回復することを報告した。またZhengら3)も、チンチラの蝸牛窓膜上にカイニン酸をおくことにより、やはり同様な可逆性の変化が観察されたと報告した。今回我々は、分子生物学的な研究に適したラットにおいても同様の所見が観察されるかどうか検討した。

## 【研究方法】

動物は、体重160-200gのwister系ラットを用いた。Xylazine (6 mg/Kg) 含ケタミン塩酸塩 (40mg/Kg) で麻酔後、posterior approachで骨包開窓し、正円窓膜を明視下とした。20mMカイニン酸生理食塩水溶液を2  $\mu$  l、正円窓膜上に滴下し、30分後に拭き取った。蝸牛電位の測定は、銀ボール電極による蝸牛窓誘導で行った。刺激音は、CAP、summing potential (SP) の測定には、8、12、16、20KHzのtone

bursts (立ち上がり、立ち下がり1 msec、持続時間4 msec)、蝸牛マイクロフォン電位(CM)の測定には、持続時間10msecのtone burstを用いた。外耳道入口部より60cm離れたスピーカーより、開放型音刺激系として検査音を与えた。蝸牛電位の測定は、カイニン酸投与前と投与後2時間、3日目、10日目に行った。蝸牛電位測定後深麻酔し、4%パラホルムアルデヒド+0.5%グルタルアルデヒドで灌流固定、蝸牛を摘出後、同固定液で浸漬固定した。10%EDTA溶液にて脱灰後、JB4で包埋、3  $\mu$  m厚の切片をHE染色して光顕下に観察した。

## 【倫理面への配慮】

一連の実験は十分な麻酔下に行い、組織採取時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに断頭した後に行った。

## 【研究結果】

カイニン酸投与2時間後には、急激なCAPの低下を認めたが、SPはむしろ増大した。明らかなCMの変化は認められなかった。組織学的には、内毛細胞下の神経終末の空胞化所見を認めた。カイニン酸投与3日後にはCAPの回復を認め、10日後のCAP閾値はほぼ投与前のレベルにもどった。(図1)

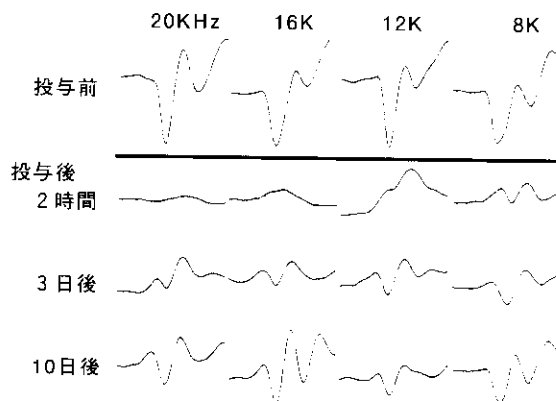


図1 カイニン酸投与前、投与後2時間、3日後、10日後の周波数別蝸電図波形の変化。

### [考察]

モルモットやチンチラを用いたこれまでの報告(1-3)と同様に、ラットでもカイニン酸投与による可逆的なCAPの減少が確認された。このCAP低下が有毛細胞に由来するとされるSPやCMの低下を伴わないことより、蝸牛神経レベルの機能障害として矛盾はない。顕微鏡観察で認められた神経終末の空胞化は、カイニン酸の興奮毒性による一次ニューロン樹状突起レベルの可逆性障害を示す所見と考えられる。

突発性難聴のなかには蝸電図検査でCAPの著しい低下にも関わらずCMが保たれる例やSP/AP比の増大を示す例など、蝸牛神経レベルでの障害が示唆される症例を経験する。このような突発性難聴症例では概して聴力予後が良く、可逆性難聴を呈した本動物モデルと共通の病態が示唆される。

突発性難聴の可逆性を説明するモデルとして「血管条障害」があるが、これではCMの保たれた突発性難聴症例の病態は説明困難である。グルタミン酸の放出・処理機構の異常で引き起こされる蝸牛神経の興奮毒性を本態とする突発性難聴の存在も想定する必要がある。

ラットを用いた今回のモデルは、突発性難聴の一病態を解明する手がかりを与えるものとして期待される。今後、種々の神経栄養因子の治療的効果も含めて、分子生物学的なアプローチを組み合わせる検討を進めていく予定である。

### [結論]

カイニン酸局所投与による可逆性の難聴モデルは、一次ニューロン樹状突起レベルにおけるグルタミン

酸の興奮毒性が関与する突発性難聴のモデルになり得るものと考えられる。

### [参考文献]

- 1) Puel JL, d'Aldin C, Ruel J, Ladrech S, Pujol R: Synaptic repair mechanisms responsible for functional recovery in various cochlear pathologies. *Acta Otolaryngol* 117: 214-8, 1997.
- 2) Pujol R, Lenoir M, Robertson D, Eybalin M, Johnstone BM: Kainic acid selectively alters auditory dendrites connected with cochlear inner hair cells. *Hear Res* 18: 145-51, 1985.
- 3) Zheng XY, Henderson D, Hu BH, McFadden SL: Recovery of structure and function of inner ear afferent synapses following kainic acid excitotoxicity. *Hear Res* 105: 65-76, 1997.

### [研究発表]

〈論文発表〉

なし

〈学会発表〉

なし

### [知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

# 蝸牛内有毛細胞感覚毛と蓋膜との接着状態の検討

分科会員 福田 諭 (北海道大耳鼻咽喉科)

共同研究者 松村 道哉・檜山 繁樹  
千田 英二・柏村 正明  
黒田 努・大渡 隆一郎  
犬山 征夫 (北海道大耳鼻咽喉科)

## 〔研究要旨〕

有毛細胞が脱分極を起こすためには感覚毛が蓋膜と基底板の間に生じる相対的な変位により感覚毛が屈曲する必要がある。外有毛細胞感覚毛は蓋膜に刺さり込むように接着しているために、その剪断力は直接蓋膜より得られていることが知られていた。これに対し、内有毛細胞感覚毛は大部分の高等動物において接着の証拠が認められておらず、その剪断力は周辺の内リンパの環流によって得られると推察されていた<sup>1)</sup>。今回、これまで接着が存在しないとされてきた成熟モルモットにおいて、少なくとも蝸牛の下方2/3に内有毛細胞感覚毛の先端が刺さり込んでいたと考えられる圧痕および直接感覚毛先端が刺さり込んで存在することを走査型電子顕微鏡下で明らかにした。この観察結果は、内有毛細胞感覚毛の剪断力も直接蓋膜から得られることを示唆している。また、これまで内有毛細胞の圧痕の証明が困難であった原因は試料作成の際の蓋膜の変形のためであり、蓋膜観察用の固定方法の工夫により、さらなる研究の進展が期待される。

## 〔研究目的〕

これまでの研究から、外有毛細胞感覚毛は蓋膜にささり込むように接着があることがあきらかにされている。この接着の証明には、走査型電子顕微鏡でささり込む外有毛細胞感覚毛の配列と一致して蓋膜の裏側に残された圧痕を観察する方法が広く用いられている。

一方、内有毛細胞感覚毛に関しては、多くの幼若、成熟高等動物で詳細な研究がなされているにも関わらず、いまだ一致した結論が得られていない。現時点では生後初期の蝸牛の形態変化の時期に内有毛細胞の感覚毛は蓋膜と接着しており、成長の過程で蝸牛が成熟した時点で蓋膜と離れるのではないかとする説<sup>2)3)</sup>が一般的に受け入れられている。しかしな

がら蓋膜の研究に最も用いられているモルモットでは、いまだに成長の段階に関わらず接着を認めたとする報告はない。また成熟ネコ<sup>4)</sup>、ラット<sup>5)6)</sup>、ヒト<sup>7)</sup>の接着の報告も存在し、この部位の接着状態については古くから関心を持たれながらも矛盾に満ちた状態で残されている。

蓋膜は標本作製過程で著しく変形するため、たとえ接着していても観察が困難になっている可能性があり、また高等動物内での内耳構造の種差があるとは考えにくい。今回われわれは、内有毛細胞感覚毛と蓋膜との間の接着が標本作製の過程で失われてしまうのではないかと仮説を立て、聴覚実験に最も普遍的に用いられるモルモットにおいて固定方法の工夫によりこの証明を試みた。

## 〔研究方法〕

プライエル耳介反射正常の体重450～800gの成熟ハートレイ種モルモット10匹を使用し、文献的によく用いられる固定法をA法とし、蓋膜観察用に考案した固定法をB法として、固定法の違いによる走査型電子顕微鏡による見え方の違いを比較した。

## 〔倫理面への配慮〕

実験は十分な麻酔下で行い、断頭も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

## 〔研究結果〕

モルモットの蝸牛は全部で4回転存在し、A法では特に所見を認めなかったが(図1上段)、B法では基底回転から3回転目中央まで、つまり蝸牛全体の下方向約3分の2において、蓋膜の裏側中央に帯状に観察されるヘンゼン条の外側縁に内有毛細胞の感覚毛の配列と一致して一列に並んだ圧痕が観察された(図1下段)。また一部の内有毛細胞感覚毛がちぎれて蓋膜側に残存しており、その感覚毛の先端がしっ

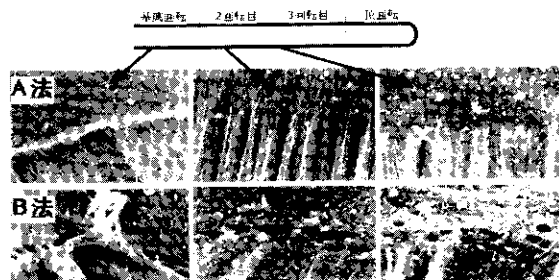


図1 走査型電子顕微鏡による各回転別の固定法による圧痕の見え方の違い。

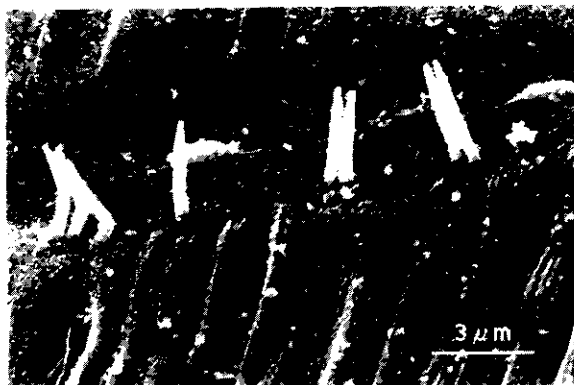


図2 蝸牛2回転目下方の蓋膜下面の拡大図。

ヘンゼン条外側縁に明瞭に配列した圧痕と内有毛細胞感覚毛の一部がちぎれて蓋膜の下面に付着して残存しているのが観察される。残存した感覚毛の先端は明らかに蓋膜に刺さり込んでいる。

かりと蓋膜に刺さり込んでいる像も観察された(図2)。ひとつの内有毛細胞あたりの接着個数は、基底回転下方で11から14個、2回転目下方で9から12個、3回転目下方で2から8個と、頂回転側にいくほど少なくなっていく傾向があった。圧痕の大きさは、250から350nmではほぼ内有毛細胞感覚毛の径と一致し回転別に差は無かった。配列は基底回転では直線的で、2回転目以上ではジグザグであった。深さは基底回転で深く、頂回転側にいくにしたがって浅くなっていく傾向があった。

### [考察]

今回接着の証明に成功したのは、モルモットの蝸牛の下方2/3までである。配列している圧痕の形状や蓋膜側に残存した内有毛細胞感覚毛の形態および対応する部位の感覚毛の配列様式から、感覚毛の最外側の1列だけが接着しているものと思われる。これらの圧痕の深さが上方の回転にいくに従って浅くなり数が減少していく傾向があるのは、接着状態が基底回転側でより強く上方の回転にいくほど弱くなっているため、上方の回転ではより丈の長いもの

けが緩やかに接着しているものと考えられる。頂回転側の1/3の接着に関しては現在証明できなかったが、さらなる固定方法の工夫によって今後接着を証明できる可能性が残されている。しかし、少なくとも蝸牛の下方2/3の範囲において成熟モルモットで圧痕の存在が明らかに証明されたことは、これまで認められなかった主たる原因がアーチファクトのためであり、高等動物種間の種差の存在や成長過程での一時的な接着というこれまでの定説を否定することができる十分な材料になると考える。

### [結論]

固定方法の工夫により、成熟モルモットの蓋膜と内有毛細胞感覚毛が接着していることを明らかに証明した。

### [参考文献]

- 1) Lim DJ (1986): Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear Res* 22: 117-146.
- 2) Lenoir M, Puel JL, Pujol R (1987): Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea. A SEM study. *Anat Embryol* 175: 477-487.
- 3) Rueda J, Cantos R, Lim DJ (1996): Tectorial membrane-organ of Corti relationship during cochlea development. *Anat Embryol* 194: 501-514.
- 4) Hoshino T (1976): Attachment of the inner sensory cell hairs to the tectorial membrane. A scanning electron-microscopic study. *ORL* 38: 11-18.
- 5) Iurato S (1962): Functional implications of the nature and submicroscopic structure of the tectorial and basilar membranes. *J Acoust Soc Am* 34: 1386-1395.
- 6) Ross MD (1974): The tectorial membrane of the rat. *Am J Anat* 139: 449-482.
- 7) Hoshino T (1981): Imprints of the inner sensory cell hairs on the human tectorial membrane. *Arch Otorhinolaryngol* 232: 65-71.

### [研究発表]

〈論文発表〉

松村道哉：内耳蝸牛における内有毛細胞感覚毛と蓋膜との接着状態に関する研究、北海道医学雑誌第76巻第3号 (in press)

Matsumua, M., Fukuda, S., Inuyama, Y., Hiyama, S., Chida, E., Kashiwamura, M., Kuroda, T., Ohwatari, R., Abe, K., Stereocilia of cochlear inner hair cells adhere to the tectorial membrane. (in submitting)



〈学会発表〉

なし

**[知的所有権の取得状況]**

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

# 急性音響外傷における内耳組織転写因子活性の変化（第二報）

分科会員 神 崎 仁（慶應大耳鼻咽喉科）

共同研究者 松 延 毅・小 川 郁

井 上 泰 宏（慶應大学大耳鼻咽喉科）

荻 田 喜代一（摂南大薬学部）

Jochen Schacht（ミシガン大）

## 【研究要旨】

急性音響外傷は急性感音性難聴の代表的なモデルとして利用されていますが、その成立機序、すなわち強大音がどのような機序で蝸牛組織に傷害を与えるかという疑問は現在までほとんど解明されていない。前回われわれは、本報告会において第一報として、モルモットに強大音（115 dB octave band noise centered at 4 kHz, 5 hours）を与え、コルチ器、蝸牛外側壁およびラセン神経節のそれぞれの組織中の転写制御因子活性（AP-1; activator protein-1）を測定した。強大音暴露によりコルチ器および外側壁におけるAP-1活性は有意に上昇した。今回われわれはさらに、AP-1の構成タンパク質の解析を行い、検討を行ったので報告する。

## 【研究目的】

近年において強大音暴露による急性感音性難聴、いわゆる急性音響外傷のメカニズムとしてフリーラジカルの関与が示唆されているが、フリーラジカルなどの酸化ストレスが聴覚路に及ぼす影響、及びそれらが聴覚路の組織を細胞傷害や細胞死に至らしめる過程等、詳細は殆ど不明である。最近になり中枢神経系を中心に酸化ストレスが細胞内の多様な経路を経て最終的には様々なストレス応答タンパクを遺伝子を介して変化させることが報告されている。特に、それらストレス応答タンパクの遺伝子発現の制御はそれらのDNAの上流のプロモーター領域において、DNAの転写制御因子と称される一群のタンパクにより行われることが報告されている。本研究の目的は、聴覚に関与する内耳組織または細胞内における、強大音暴露等の酸化ストレスのシグナル伝達経路の解明、遺伝子発現制御様式の解明、ストレス応答遺伝子の同定、及びそれらをもとにして急性感音性難聴の治療法を追求することにある。

## 【研究方法】

ブライエル反射正常の有色モルモットに対し、PTS（permanent threshold shift）を起こしうる 115 dB の 4 kHz を中心とするオクターブバンドノイズを防音室内で無麻酔下で5時間暴露した。強大音暴露後、直ちに断頭、蝸牛を摘出し顕微鏡下に蝸牛感覚上皮、蝸牛外側壁、及びラセン神経節を分画した後、各組織より細胞核抽出液を調整した。この細胞核抽出液中の転写制御因子の一種である AP-1 の DNA 結合能を、AP-1 のコンセンサス塩基配列を持つ 2 本鎖 DNA プローブを用いたゲル移動度シフトアッセイにより解析した。さらに、AP-1 の DNA 結合能の時間経過を検討した。また、各細胞核抽出物を用い AP-1 の構成タンパク（c-Fos, Fos B, Fos D, c-Jun, Jun B, Jun D）に対する特異的な抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行った。さらに Fra-2 に特異的な抗体を用いたウェスタンブロットイングを行った。

## 【研究結果】

強大音負荷により AP-1/DNA 結合は蝸牛感覚上皮及び蝸牛外側壁において有意に上昇した。ラセン神経節では有意な上昇はみられなかった。種々の AP-1 構成タンパクの特異的な抗体を用いたスーパーシフトアッセイでは、強大音負荷による AP-1/DNA 結合の上昇に Fra-2 が特に関与していることが示唆された。Fra-2 に対するウェスタンブロットイングでは強大音負荷により内耳組織内の Fra-2 の発現が増加することが確認された。

## 【考 察】

急性音響外傷による蝸牛傷害にはフリーラジカル産生が関与しており、一種の酸化ストレスと考えられている。中枢神経系においては、酸化ストレスに反応する種々のいわゆるストレス応答タンパクの発現は遺伝子の転写制御因子により制御されてい

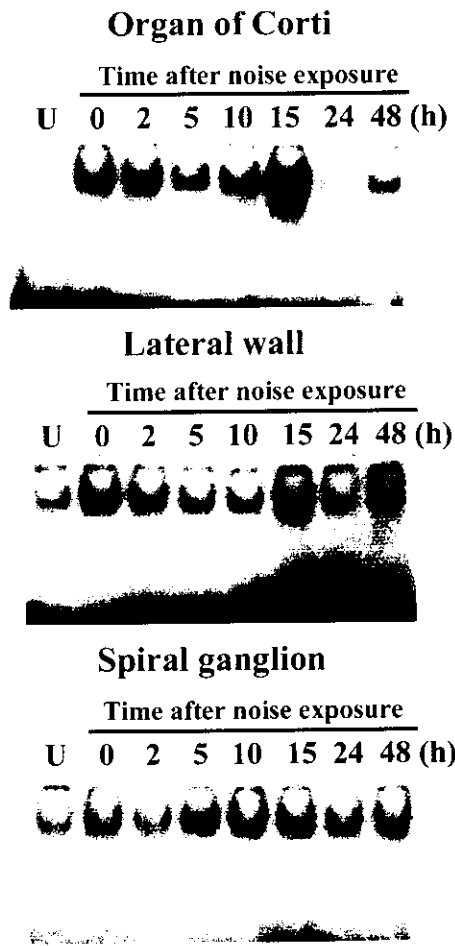


図1 強音曝露後の各蝸牛組織中のAP-1/DNA結合の推移。

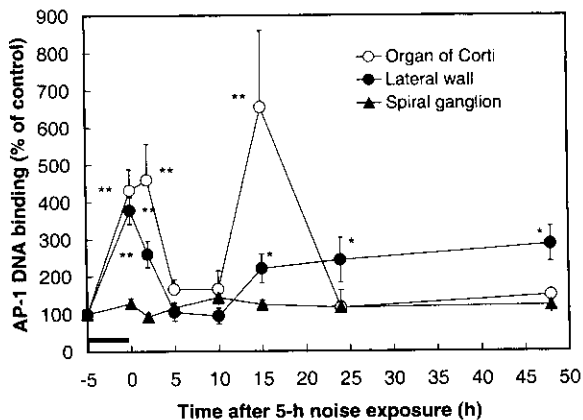


図2 AP-1/DNA bindingの推移をデンストメトリーにより解析しグラフ化した。

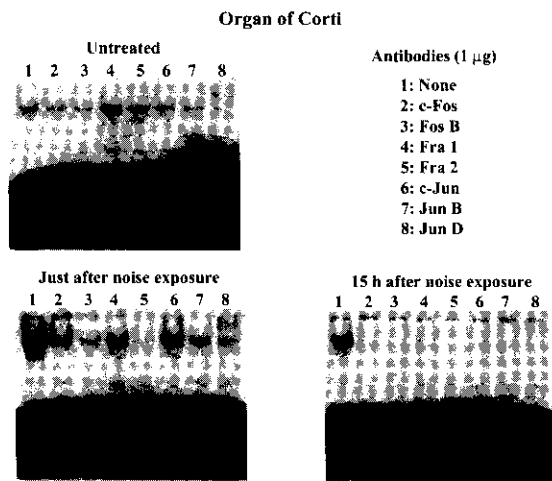


図3 各抗体によるスーパーシフトアッセイ(organ of Corti)。特にFra-2による影響が大きいことが示唆される。

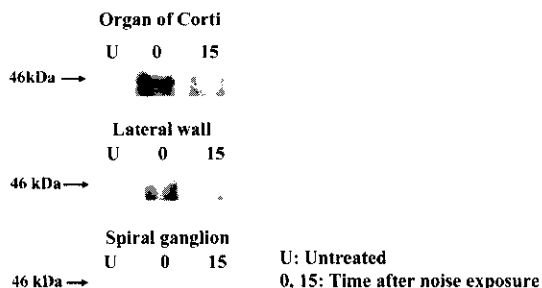


図4 Fra-2に対するウェスタンブロット。強音により、Fra-2の発現が増加している。

ることが報告されている。本研究において、急性音響外傷による蝸牛傷害のメカニズムとして転写制御因子の一つであるAP-1が関与していることが示唆された。ストレス応答のメカニズムには様々なストレス応答伝達経路のクロストークがあり、AP-1上昇の細胞特異性など、今後のさらなる研究が必要である。

[参考文献]

- 1) Curren C., Franza B.R.Jr.,: Fos and Jun, the AP-1 connection. Cell 55:395-397, 1988.
- 2) Ohlemiller K.K., Dungan L.L.: In vivo measurement of cochlear reactive oxygen species (ROS) in mice; effect of noise exposure and cochlear ischemia. Assoc. Res. Otolaryngol. Abstr. 21:518, 1998.
- 3) Yamane H., Nakai Y., Takayama M., Iguchi H., Nakagawa T., Kojima A.: Appearance of free radicals in the guinea pig inner ear after noise-induced acoustic trauma. Arch. Otorhinolaryngol. 252:504-508, 1995.

- 4) Yamasoba T., Schacht J., Shoji F., Miller J.F.: Attenuation of cochlear damage from noise trauma by an iron chelator, a free radical scavenger and glial cell line-derived neurotrophic factor in vivo. *Brain Res.* 815:317-325, 1999.
- 5) Yoneda Y., Ogita K., Inoue K., Mitani A., Zhang L., Masuda S., Higashihara M., Kataoka K.: Rapid potentiation of DNA binding activities of particular transcription factor with leucine-zipper motifs in discrete brain structures of the gerbil with transient forebrain ischemia. *Brain Res.* 667:54-66, 1994.

#### [研究発表]

##### 〈論文発表〉

Ogita K, Matsunobu T, Schacht J: Acoustic trauma enhances DNA binding of transcription factor AP-1 in the guinea pig inner ear. *Neuroreport* (2000) 11: 859-862.

##### 〈学会発表〉

23rd Midwinter Research Meeting, Association for Research in Otolaryngology, St. Peters Beach, FL, 2000.

第73回日本薬理学会定年会

37th Workshop on Inner Ear Biology

第10回日本耳科学会

24th Midwinter Research Meeting, Association for Research in Otolaryngology, St. Peters Beach, FL, 2000

(accepted) .

#### [知的所有権の取得状況]

##### 〈特許取得〉

なし

##### 〈実用新案登録〉

なし

##### 〈その他〉

なし

# グルタミン酸トランスポーター (GLAST) 欠損マウスにおける音響障害

分科会長 暁 清 文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 白馬 伸洋・古賀 健一郎  
渡辺 太志・兵頭 純  
谷口 昌史 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

## 〔研究要旨〕

内耳においてグルタミン酸の再吸収を行うグルタミン酸トランスポーターである GLAST を欠損させたマウス<sup>1)2)3)</sup> (GLAST ノックアウトマウス) を用い、音響暴露前後の鼓室階における外リンパ中グルタミン酸濃度と聴力域値変化を測定するとともに、透過型電子顕微鏡による内毛細胞の形態的变化を観察した。その結果ノックアウトタイプでは音響暴露後、外リンパ中のグルタミン酸濃度の上昇が認められ、聴力域値の有意な上昇も認められた。

## 〔研究目的〕

騒音性難聴の原因の一つとしてグルタミン酸による興奮性神経毒性 (Excitotoxicity) が関与するとされているが、実際に音響暴露時に過剰のグルタミン酸が放出され、それが神経毒性に作用しているかについては現在まで全く研究されていない。GLAST ノックアウトマウスを用い、音響障害による内耳障害をグルタミン酸神経毒性の観点から考察したので報告する。

## 〔研究方法〕

マウスに酸素 50%、笑気ガス 50% の混合ガスにハロセン 3% を加え全身麻酔を施した後、音響刺激用の木箱内に固定し、4000 Hz の純音を用いて、105dB SPL の音響負荷を 30 分間行った。温熱灯により実験中の体温は 36-37°C に保った。ABR の測定にあたってはクリックを用い、5dB ステップで刺激音圧を変化させて測定を行い、音響負荷前後の ABR 域値を求めた。外リンパ中グルタミン酸濃度の測定には微小透析法を用いた。正円窓より透析用プローブを挿入し、鼓室階における外リンパ中のグルタミン酸濃度の測定を行った。グルタミン酸濃度の測定は、三谷ら<sup>4)</sup> による酵素的サイクリング法を用いた。

## 〔倫理面への配慮〕

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

## 〔研究結果〕

ABR 閾値変化の平均を図 1 に示した。音響暴露前のノックアウトタイプにおける平均 ABR 閾値はワイルドタイプと比較し有意に高かった。音響暴露により、ノックアウトタイプではワイルドタイプとほぼ同程度の閾値上昇が認められた。音響暴露後 60 分の時点にて、ノックアウトタイプでは音響暴露直後からの ABR 閾値の回復はあまり認められなかった。音響暴露前後の外リンパ中グルタミン酸濃度変化を図 2 に示した。音響暴露前のノックアウトタイプにお

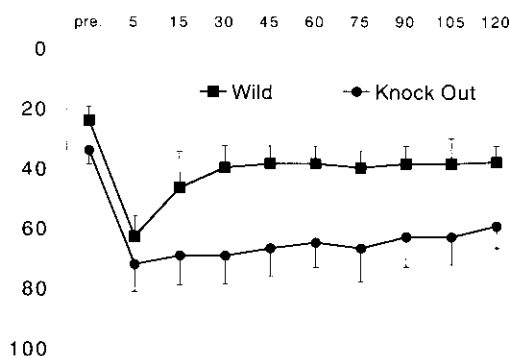


図 1 ABR 閾値の音響暴露前後の経時的変化。

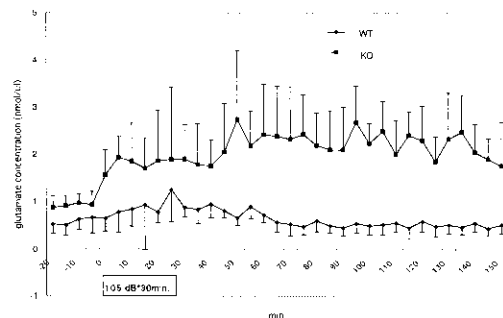


図 2 音響暴露前後の外リンパ中グルタミン酸濃度変化。

ける平均グルタミン酸濃度は0.53pmol/ $\mu$ lであり、ワイルドタイプにおける平均グルタミン酸濃度は0.92pmol/ $\mu$ lと比較し、有意に高かった。音響暴露直後より、ノックアウトタイプではグルタミン酸濃度の急激な上昇が認められたが、ワイルドタイプでは音響暴露によって有意なグルタミン酸濃度の上昇は認められなかった。ノックアウトタイプにおいては、音響暴露後グルタミン酸濃度の上昇は持続し、60分後の時点においてもグルタミン酸濃度は上昇したままであった。音響暴露直後では、ワイルドタイプ、ノックアウトタイプともに内毛細胞における神経終末樹状突起に腫脹変性をきたしていたが、音響暴露後60分の時点ではワイルドタイプの内毛細胞は正常形態への回復を示していた。しかし、ノックアウトタイプの内毛細胞では、音響暴露後60分の時点においてもシナプス間隙における求心系神経終末樹状突起に腫脹変性をきたしたままであった。

### [考 察]

ノックアウトタイプにおける、音響暴露後 ABR 閾値の回復遅延の一因として、トランスポーター不在による高濃度のグルタミン酸が起こす、興奮性神経毒性が関与していることが考えられる。グルタミン酸毒性は、音響障害時ばかりでなく、虚血性内耳障害や、アミノグリシド系や利尿剤による内耳障害時にも、増悪因子として作用していることが明らかにされている<sup>5)6)</sup>。今後は、このトランスポーターの機能を活性化することにより、今まで有効な治療法がなかったこれらの難聴における新たな治療法の確立が期待できる。

### [結 論]

今回の研究により、音響暴露時グルタミン酸を吸収するトランスポーターが欠損した場合、音響暴露による内耳障害が増悪することより、内耳における過剰グルタミン酸の吸収機構が、グルタミン酸毒性に対する内耳保護において重要な役割を持つことが明らかとなった。

### [参考文献]

- 1) Harada T, Harada C, Watanabe M, et al : Functions of the two Glutamate Transporters GLAST and GLT-1 in

the Retina. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 4663-4666, 1998.

- 2) Watase K, Hashimoto K, Kano M, et al : Motor Discoordination and Increased Susceptibility to Cerebellar Injury in GLAST Mutant Mice. Eur J Neurosci 10 : 976-988, 1998.
- 3) Watanabe T, Morimoto K, Hirano T, et al : Amygdala-kindled and Pentylene-tetrazole-induced Seizures in Glutamate Transporter GLAST-deficient Mice. Brain Res 845 : 92-96, 1999.
- 4) Mitani A, Kubo H, Iga K, et al : Anew Enzymatic Cycling Technique for Glutamate Determination in Brain Microdialysates. J Neurochem 54 : 709 ~ 711, 1990.
- 5) Basile AS, Huang JM, Xie C et al N-methyl-D-aspartate Antagonists Limit Aminoglycoside Antibiotic-induced Hearing Loss. Nat Med 2 :1338-1343, 1996.
- 6) Matsuda K, Komune S, Tono T et al : A role of glutamate in drug-induced ototoxicity: in vivo Microdialysis Study Combined with on-line Enzyme Fluorometric Detection of Glutamate in the Guinea Pig Cochlea. Brain Res : 10;852 (2):492-5, 2000.

### [研究発表]

〈論文発表〉

Hakuba N, Koga K, Watanabe F, Gyo K: Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hind brain ischemia in gerbil; J Comparative Neurology418:217-226,2000.

Hakuba N, Koga K, Gyo K, Usami S, Tanaka K: Exacerbation of noise-induced hearing loss in mice lacking the glutamate transporter GLAST.

〈学会発表〉

### [知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

## 低体温による虚血性内耳傷害の保護効果

分科会長 暁 清 文 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

共同研究者 渡 辺 太 志・白 馬 伸 洋  
古 賀 健 一 郎・兵 頭 純  
谷 口 昌 史 (愛媛大学耳鼻咽喉科)

### 【研究要旨】

虚血性内耳障害に対する低体温の効果を検討する目的で、動物を低体温(32度)とした状態で15分間の内耳虚血負荷を行い、虚血前後の蝸電図を経時的に記録するとともに、有毛細胞の組織学的変化を蛍光顕微鏡下に観察した。その結果、常温群に比べ低体温群では機能的および組織学的に虚血後の内耳障害が有意に抑制されていた。このことより虚血中の低体温が内耳循環障害に対して保護効果を持つことが明らかとなった。

### 【研究目的】

実験的脳虚血モデルにおいては虚血中の低体温が虚血・再灌流による神経細胞障害に対して保護効果を持つことが知られており、スナネズミ海馬CA1領域ではわずか5度の体温低下により虚血後の神経細胞死が完全に防御される<sup>1)</sup>。一方、内耳性難聴の原因の一つとして血流障害が挙げられ多くの研究が行われてきたが、虚血後の内耳障害に対する低体温の効果については不明である。我々はこれまでスナネズミを用いて一過性内耳虚血モデルを作成し、その病態について報告してきた。今回、動物を低体温(32度)下に15分間の内耳虚血負荷を行い、再開通7日目までの経時的な蝸電図の測定をするとともに、有毛細胞を蛍光顕微鏡下に観察し、低体温の内耳保護効果について検討したので報告する。

### 【研究方法】

対象および実験方法

実験動物にはスナネズミ(12~16週齢)を使用した。直腸温を37度に維持した常温群と、直腸温を32度に低下させた低体温群の2群において、両側椎骨動脈の血流を15分間遮断することにより内耳に虚血を負荷した。低体温群は血流再開通後20分まで直腸温を32度に維持し、その後復温させた。

実験1:動物の聴力変化の評価には12匹の動物を用いた(低体温群と常温群、それぞれ6匹)。スナネズミの耳後部を切開し、顔面神経管内に蝸電図の記録電極の埋め込みを行い、電極の安定する7日後に虚血操作を行った。蝸電図の測定は虚血前、虚血直後、再開通後30分で行い、さらに翌日を1日目とし1、4、7日目に行った。

実験2:組織採取は虚血後30分、1、4、7日目に行なった。低体温群と常温群ともに、それぞれ4匹(8耳)の動物を用いた。断頭し速やかに蝸牛骨胞を摘出した後に、前庭窓、蝸牛窓を開放し蝸牛頂回転に設けた小孔より4%パラホルムアルデヒドにて局所灌流固定を行った。さらに同液にて2時間浸漬固定後、surface preparationにて基底回転のコルチ器を採取し、rhodamine-phalloidinにて染色後、Hoechst33342による二重染色を行った。PBSにて洗浄後、蛍光顕微鏡にて観察し有毛細胞の脱落細胞割合の定量を行った。

### 【倫理面への配慮】

実験は十分な麻酔下で行い、断頭時も多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

### 【研究結果】

常温群、低体温群ともに虚血後直ちにCAPは消失し、最大刺激音圧(110dB SPL)にても反応は誘発されなかった。血流再開通によりCAPは徐々に回復したが、常温群では虚血前値までは回復せず、再開通7日目において虚血前に比べ約20dBの閾値上昇がみられた。一方、低体温群では再開通後30分において虚血前値まで回復し、7日目まで変化しなかった(図1)。

蛍光顕微鏡による観察では、常温群で虚血後に有毛細胞脱落が徐々に増加する傾向がみられ、再開通7日目の基底回転における脱落細胞の割合は内毛

細胞約30%、外有毛細胞約3%であった。一方、低体温群における脱落細胞の割合は内、外有毛細胞ともに0.3%以下であった(図2)。

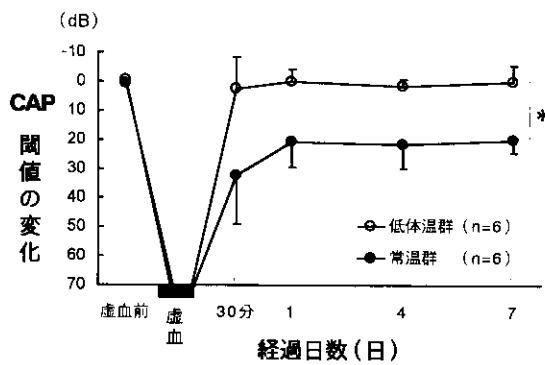
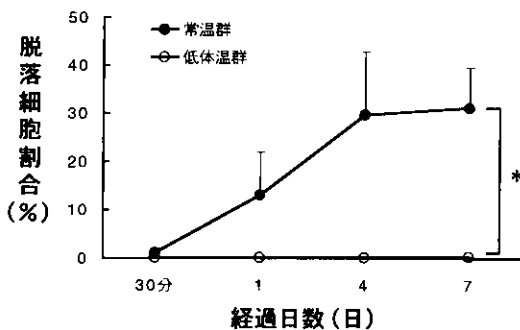


図1 CAP閾値の平均値の経時変化

虚血前のCAP閾値を0dBとし、その後のCAP閾値変化の平均値を示す。垂直線はそれぞれの標準偏差を示している。(\*  $p < 0.01$ , マン・ホイットニのU検定)

## A



## B

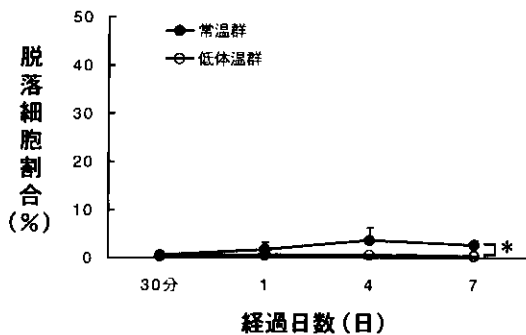


図2 虚血後の有毛細胞の脱落細胞割合

虚血後30分、1、4、7日目における内有毛細胞(A)と外有毛細胞(B)の脱落細胞割合の平均値を示す。各n=8。垂直線はそれぞれの標準偏差を示している。(\*  $p < 0.001$ , マン・ホイットニのU検定)

## [考察]

低体温による脳神経保護効果の作用機序としては代謝の抑制、細胞外興奮性アミノ酸の減少、フリーラジカル産生の減少、細胞内カルシウム流入の抑制などが考えられている<sup>21, 31, 41</sup>。内耳においてもグルタミン酸は神経障害性に働く可能性が論じられており、実際、Lefebvreら<sup>51</sup>は単離ラセン神経節細胞の培養液中に高濃度のグルタミン酸アゴニストを添加すると細胞が変性すると報告しており、またKlinkeら<sup>61</sup>もネコの内耳に高濃度のグルタミン酸を投与するとCAPの振幅が低下したことから、グルタミン酸が内耳に障害性に作用すると結論している。さらにHakubaら<sup>7</sup>はスナネズミを用いた虚血実験において、グルタミン酸アンタゴニストを蝸牛内に投与することにより虚血後の神経障害が防御できることを報告した。内耳における低体温の保護効果の作用機序として、虚血によるグルタミン酸の放出が抑制されている可能性もある。低体温の保護効果には他の機序も関与しているものと考えられるが、その詳細については不明であり今後の研究課題としたい。

## [結論]

虚血性内耳障害に対する低体温の効果を検討する目的で、動物を低体温(32度)とした状態で15分間の内耳虚血負荷を行い、虚血前後の蝸電図を経時的に記録するとともに、有毛細胞の組織学的変化を蛍光顕微鏡下に観察した。その結果、虚血中の低体温により一過性虚血後の内耳障害が機能的および組織学的に防御できることが明らかとなった。

## [参考文献]

- 1) Welsh FA, Sims RE and Harris VA : Mild hypothermia prevents ischemic injury in gerbil hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 10 : 557 ~ 563, 1990.
- 2) Mitani A and Kataoka K : Critical levels of extracellular glutamate mediating gerbil hippocampal delayed neuronal death during hypothermia: brain microdialysis study. *Neuroscience* 42 : 661 ~ 670, 1991.
- 3) Kader A, Frazzini VI, Baker CJ, et al : Effect of mild hypothermia on nitric oxide synthesis during focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 35 : 272 ~ 277, 1994.
- 4) Mitani A, Kadoya F and Kataoka K : Temperature dependence of hypoxia-induced calcium accumulation in gerbil hippocampal slices. *Brain Res* 562 : 159 ~ 163, 1991.
- 5) Lefebvre PP, Weber T, Leprince P, et al : Kainate and



NMDA toxicity for cultured developing and adult rat spiral ganglion neurons: further evidence for a glutamatergic excitatory neurotransmission at the inner hair cell synapse. *Brain Res* 555 : 75 ~ 83 1991.

- 6) Klinke R and Oertel W : Amino acids - putative afferent transmitter in the cochlea? *Expl. Brain Res* 30 : 145 ~ 148, 1977.
- 7) Hakuba N, Koga K, Shudou M, et al : Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbils. *J Comp Neurol* 418 : 217 ~ 226, 2000.

#### [研究発表]

〈論文発表〉

Futoshi Watanabe, Kenitiro Koga, Nobuhiro Hakuba,

Kiyofumi Gyo. : Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell loss after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroscience* 102 : 639 ~ 645, 2001.

〈学会発表〉

第10回 日本耳科学会総会

#### [知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

# Ws/Ws rat の血管条の発達における変化 (透過型、走査型電顕による観察)

分科会長 星野知之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 新木五月・水田邦博  
森田浩史・竹下有 (浜松医大耳鼻咽喉科)

## [研究要旨]

Ws rat は先天性血管条発育不全ラットであり、W-領域の遺伝子異常がある。ホモ接合体では、全体の毛が白色で黒眼、マスト細胞の欠損、メラノサイトの欠損、不妊、貧血、難聴がある<sup>1) 2)</sup>。

今回、Ws rat の蝸牛において血管条の発達の変化を透過型電顕 (TEM)、走査型電顕 (SEM) を使って調べた。その結果、Ws rat の色素のない領域では辺縁細胞の側底膜は生後2週で一旦発達したが、生後2週から3週の間に変性が始まった。生後8週では血管の変性も認められた。

## [研究目的]

ホモ接合体であるWs/Ws ratでの蝸牛の形態的特徴は、色素は全ての回転で消失しているのではなく、基底回転には存在し、中回転では消失しているパターンが多かった。色素のない部分の血管条では中間細胞がなく、この部分の辺縁細胞は薄く、平らで、側底膜の infolding が乏しいと報告されている<sup>3)</sup>。この rat は中間細胞の機能や聴覚の研究に役立つモデルと考えられるが、発達における血管条の変性はまだ調べられていない。今回の研究では、Ws/Ws rat における血管条の発達における変化を TEM, SEM にて検討する。

## [研究方法]

rat にペントバルビタールの腹腔内注射による麻酔のあと断頭し、中耳骨包を摘出した。

### TEM

2.5% グルタルアルデヒドに2時間固定した後、膜迷路を摘出、緩衝液で洗ったのち1% オスミウム酸で後固定した。エタノールで脱水の後、エポキシに包埋した。超薄を行って、二重染色をほどこしTEMで観察した。

### SEM

2% グルタルアルデヒドに一晩固定し、実体顕

微鏡下に血管条を摘出した。2% タンニン酸で処理した後、1% オスミウム酸で後固定した。エタノールで脱水の後、t-ブチルアルコールを用いて、凍結乾燥した。金を蒸着した後、SEMで観察した。

## [倫理面への配慮]

断頭時は多量の麻酔下で苦痛を与えずに行った。

## [研究結果]

色素のある部分と色素のない部分の間には明確な相違が認められた。

生後1週では、辺縁細胞の側底膜はWs/Ws ratの血管条の色素のない部分、色素のある部分、野生種のいずれの標本でも違いはみられなかった。

生後2週では、いずれの標本でも辺縁細胞の側底膜はよく発達していた。Ws/Ws ratの色素のある部分と野生種の血管条では辺縁細胞と中間細胞の間に infolding が発達し、ほぼ成熟の形態を示した。色素のない部分でも辺縁細胞の側底膜はよく発達していたが、infoldingの間には空間が認められた。中間細胞はみられなかった。(図1)

生後3週では、色素のない部分で辺縁細胞の変性がはっきり認められた。側底膜の infolding は萎縮し、辺縁細胞の厚さは減少した。(図2)

色素のない部分とは対照的に色素のある部分での血管条の発達の変化は正常であり、辺縁細胞と中間細胞との間の infolding は発達していった。

生後4週と6週では色素のある部分の血管条は正常、色素のない部分では変性が進んだ。

生後8週と14週では色素のない部分においては側底膜の infolding はかなり消失し、血管条全体も薄くなり、毛細血管の基底膜が肥厚していた。

## [考察]

生後1週では、Ws/Wsの色素のある部分、色素のない部分、野生種での形態的变化は明らかではな



図1 2w Ws/Ws rat, 色素のない部分。辺縁細胞の側底膜はよく発達していた。Bar=2 $\mu$ m

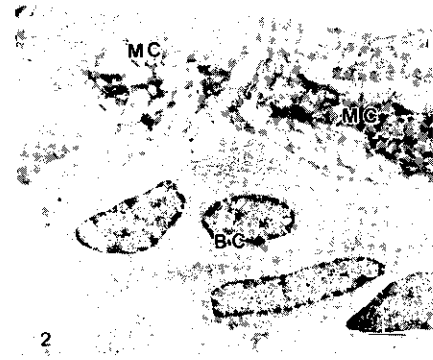


図2 3w Ws/Ws rat, 色素のない部分。辺縁細胞の側底膜は萎縮し、細胞の厚さが減少していた。Bar=2 $\mu$ m

かった。血管条は生後早期では形態的に成熟せず特に辺縁細胞の側底膜は未発達であるため<sup>4)</sup>、変性が明らかでなかったと思われる。

色素のある部分の血管条は生後2週から3週までに成熟した所見を示し、野性種と差はなかった。Rybakらの報告<sup>5)</sup>と比べてもこれは正常と思われた。一方色素のない部分での辺縁細胞の側底膜は生後2週で発達したが、生後3週では萎縮、消失した。同じ遺伝子の異常をもつWv/Wv mouseでも、同様の変性が報告されている<sup>6)</sup>。これらの所見は辺縁細胞の側底膜の infolding が少なくとも一度は発達するが、その後すぐに変性することを示している。この時期は辺縁細胞が中間細胞と密に接触し始める時期であるので、中間細胞が辺縁細胞側底膜の infolding の発達、形態維持に役割を担っている可能性が示唆された。また、生後8週では、毛細血管の変性が認められたが、生後16日で毛細血管の内皮細胞の外表面に中間細胞が接触すると報告があり<sup>6)</sup>、中間細胞がこの時期毛細血管の発達、維持にも重要な役割をはたしていると思われた。

### [結 論]

今回の研究により形態的には中間細胞の血管条不全に対する影響が推察されたが、今後は分子レベルでのどのようなメカニズムがこのような形態を引き起こすのかをさらに研究する必要がある。

### [参考文献]

- 1) Niwa, J., Kasugai, T., Ohno, K., Morimoto, M., Yamazaki, M., Donamae, K., Nishimune, Y., Kondo, K., Kitamura, Y.: Anemia and mast cell devletion in mutant rats that are homozygous at "White spotting (Ws)" locus. *Blood*. 78 : 1936-1941, 1991.

- 2) Tsujimura, T., Hirota, S., Nomura, S., Niwa, Y., Yamazaki, M., Tono, T., Morii, E., Kim, H. M., Kondo, K., Nishimune, Y., Kitamura, Y.: Characterization of Ws mutant allele of rats : a 12-base deletion in tyrosine kinase domain of c-kit gene. *Blood*. 78 : 1942-1946, 1991.
- 3) Hoshino, T., Mizuta, K., Gao, J., Araki, S., Araki, K., Takeshita, T., Wu, R., Morita, H.: Cochlea findings in the white spotting (Ws) rat. *Hear Res*. 140 : 145-156, 2000.
- 4) Rybak, L. P., Weberg, A., Whitworth, C.: Development of the stria vascularis in the rat. *ORL*. 53 : 72-77, 1991.
- 5) Steel, K. P., Barkway, C.: Another role for melanocytes : their importance for normal stria vascularis development in the mammalian inner ear. *Development*. 107 : 453-463, 1989.
- 6) Hilding, D. A., Ginzberg, R. D.: Pigmentation of the stria vascularis. *Acta Otolaryngol. (Stockh)*. 84 : 24-37, 1977.

### [研究発表]

〈論文発表〉

森田浩史：血管条変化でみられる蝸牛有毛細胞の変性. *JOHNS* 16(3)522-523, 2000.

〈学会発表〉

第9回 日本耳科学会総会

### [知的所有権の取得状況]

〈特許取得〉

なし

〈実用新案登録〉

なし

〈その他〉

なし

## 蝸牛限局性障害 多発性障害の検討

分科会長 星 野 知 之 (浜松医大耳鼻咽喉科)

共同研究者 渡 邊 高 弘・竹 下 有  
岩 崎 聡・水 田 邦 博

### 【はじめに】

我々はこれまで光増感反応を用いて蝸牛外側壁に限局性の血流障害を作成し、これによる内耳形態や機能の変化について報告してきた。これらの限局性障害がヒト蝸牛の標本で見られるように多発性、散在性に起こった場合にはどのような形態的变化が起こるかを調べてみることは、ヒトの血管条性難聴を考える上で有用と考えた。そこでモルモット蝸牛第二回転の外側壁に2つの限局性障害を作成して、2障害間にみられる有毛細胞の形態変化を走査型電子顕微鏡 (SEM) で検討した。

### 【対象と方法】

対象としてプライエル反射良好な体重250～300gハートレー系モルモットを用いた。ペントバルビタール30mg/kgを腹腔内に投与して麻酔。頸静脈にカテーテルを留置。ventral approachにて中耳骨包を削開し、蝸牛を露出。光の散乱を防ぐために幅1mmの黒色の紙片を蝸牛第二回転上に置いた。カテーテルからローズベンガル(20mg/kg)を静注したのち、第二回転外側壁に直径1mmに集光した緑色光(波長540nm、照度8000ルクス)を垂直に10分間照射。その直後に最初の障害部から1mm離れた第二回転外側壁上に同様にして障害を作成した。(図1)

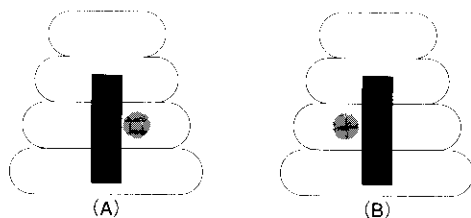


図1 光増感反応による障害作成方法のシエマ  
モルモット蝸牛第二回転上に光の散乱防止の  
為に幅1mmの黒色の紙片を置く。○で示す部  
位に障害を作成 (A)。

その直後に同じ第二回転上1mm離れた部位  
に障害を作成 (B)。

障害作成後、72時間で側頭骨を摘出し、標本を作成。  
SEMで観察した。

### 【結 果】

SEM弱拡大像(図2)で示すように蝸牛第二回転外側壁に2カ所の障害を作成できた。2カ所の障害にはさまれた血管条の辺縁細胞は形態的には正常に見えた。

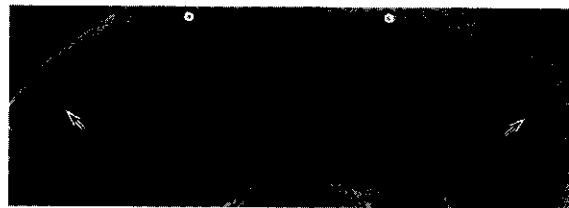


図2 2カ所の限局性血管条障害を作成したモルモット蝸牛第二回転のSEM像。矢印は2つの障害部を示す。(\*)は2つの障害の間に血管条を示すが、辺縁細胞は形態的に正常に見える。

同じ標本を拡大すると2カ所の障害部の間では血管条は正常に見えるが、対応する有毛細胞は比較的軽度だが障害されていた。(図3-A) 障害部の血管条とそれに対応する有毛細胞は両者ともに高度に障害されていた。(図3-B)

2カ所の障害を作成した場合の血管条障害部と血管条非障害部に対応する正常の有毛細胞数を比較した。(表1) 数値はSEM連続写真を用いて内柱細胞10個の長さの中にみられる正常形態を残す有毛細胞数をカウントしたもので、正常値は外有毛細胞は1列に7～8個、内有毛細胞は5～6個である。非障害部では障害部に比べて障害は軽い傾向がみられた。また、外有毛細胞は第2列目が障害されやすい傾向がみられた。

### 【考 察】

これまでの我々の研究では垂直照射による単一の血管条障害ではコルチ器の障害は分節的であり、隣