

## I. 序論

### 2. 虚血による脳神経細胞死とその分子機構

#### 1. はじめに

脳の重量は体重の2%に過ぎないが、心拍出量の約15%の循環血液供給を受けており、全身で消費する酸素の20%、ブドウ糖の65%を消費する。このように巨大な代謝器官である脳は、そのエネルギーをほぼ全面的にブドウ糖代謝に依存しているが、脳組織にはグリコーゲンはずかしか存在せず、エネルギーはほとんど蓄積されていない。このため脳への血流が途絶するとブドウ糖代謝が維持できず、短時間のうちに神経細胞は死滅する。実際、脳血流が数秒間、途絶えるだけで意識がなくなる。脳血流が約10分間途絶えると、細胞内のエネルギーが枯渇し、恒常性（ホメオスターシス）を維持できず、神経細胞の構造は崩壊し急速に細胞死（ネクローシス）に陥る<sup>1)</sup>。一方、不可逆的な急性神経細胞死（ネクロー

シス）ではなく、エネルギー代謝がある程度保たれた軽度虚血による神経細胞死の病態解明も進み、現在、治療法開発とも関連して精力的に研究が行われている<sup>2)</sup>。

#### 2. Ischemic penumbraについて

1977年、Astrupらはヒヒの中大脳動脈閉塞モデルにおいて、体性感覚誘発電位が消失する脳血流閾値（15-20ml/100g/min：正常の30～40%）は、細胞膜が損傷されて細胞外カリウム濃度が急上昇する脳血流閾値（6ml/100g/min：正常の12%）よりも高いことを明らかにし、これら両者の間の血液灌流状態（正常の12%から30～40%の血流状態）を ischemic penumbra と名付けた<sup>3)</sup>。これは「神経機能障害がおこる脳血流低下状態」を虚血と定義し、こ

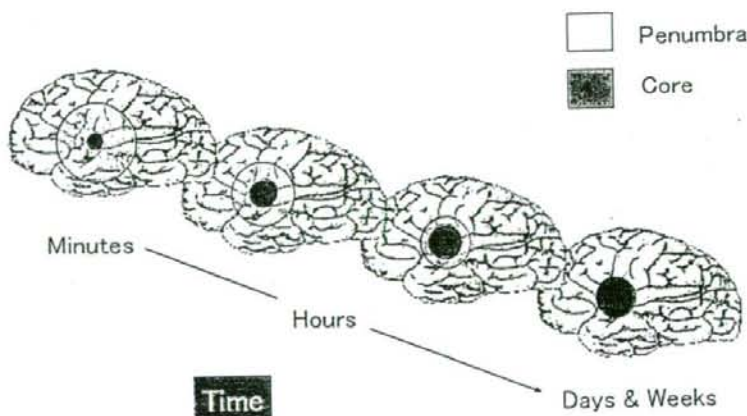


図1 脳梗塞後の障害範囲

虚血周辺部の penumbra 領域は時間経過と共に縮小するが、梗塞中心部の core 領域は増大する。すなわち患者の神経機能は回復し症状は改善するが、梗塞病変は増大する。(Dirnagl<sup>1)</sup>より改図)

れを更に「細胞膜イオンポンプが障害される脳血流閾値」を境として2つの病態に分類するという優れた概念であった。しかしAstrupらの示した脳血流閾値には虚血の持続時間に関する情報が示されていない。すなわち脳虚血による組織障害は、脳虚血の程度と持続時間の双方に依存しており、虚血持続時間が長いほど細胞膜障害がおこる血流閾値は低い。実際、脳血流量が正常の30%にまで低下した場合、当初は電気生理学的障害だけであるが、虚血時間が数時間に長引くと細胞膜損傷が引き起こされる<sup>4)</sup>。その後、ischemic penumbraの概念は「神経機能は障害されているが組織の形態学的構造は保たれている領域」、「そのままでは脳梗塞になるが、再灌流等の方法により脳梗塞への進展を免れうる領域」、「エネルギー代謝は保たれているが、蛋白合成能が障害されている領域」などと様々な定義で捉えられてきた。それぞれの概念が示すischemic penumbraの病態は必ずしも同一ではないが、一般的には「脳梗塞周囲の障害領域で、治療により回復しうる領域」を意味する用語として使用されている。なお、ischemic penumbraの状態にある組織の範囲は虚血早期には広いが、時間と共に回復する部分と死滅する部分とに分かれ、急速に縮小する(図1)。マウスを用いた局

所脳虚血モデルでは約24時間でischemic penumbraは消失する<sup>5)</sup>。

### 3. 脳虚血における神経細胞死のメカニズム

#### 1) 興奮性アミノ酸・カルシウムのoverload

ある程度、エネルギー代謝が保たれた軽度虚血状態における神経細胞死のメカニズムとして、最も重要なのは興奮性アミノ酸・カルシウムによるoverload障害である。高度虚血の場合、エネルギー不全によりATPが枯渇してNa/K ATPaseの機能が停止するため、細胞膜は本来の電位勾配が維持できず脱分極をきたす。その結果、電位依存性イオンチャネルが開放され、細胞内への過剰なCa<sup>2+</sup>の流入に加え、Na<sup>+</sup>や水の流入もおこり、細胞は浸透圧性破壊を受けて細胞死(ネクローシス)に至る。一方、ネクローシスが起こらない軽度虚血の場合、細胞膜の脱分極により、シナプス小胞に含まれたグルタミン酸だけでなく、細胞内の代謝プールに存在するグルタミン酸も大量にシナプス間隙に放出される。さらにグルタミン酸トランスポーターの逆転送によりアストロサイトからもグルタミン酸が放出され、その結果、シナプス間隙には過剰量のグルタミン酸が放出され

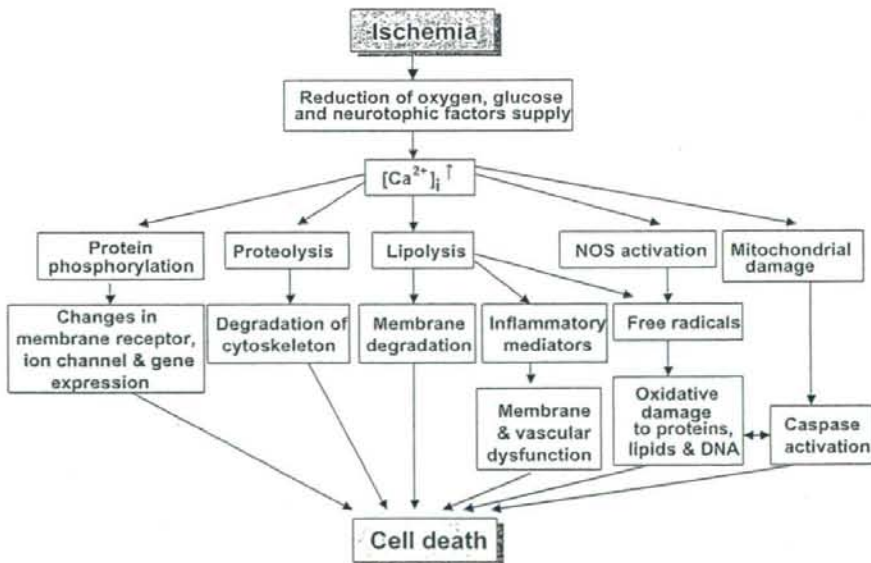


図2 興奮性アミノ酸、カルシウムoverload障害による神経細胞死の分子機構



ることになる。神経細胞のシナプス後膜には3種類のグルタミン酸受容体(NMDA型、AMPA型、代謝型)が豊富に存在しており、このうち2種類のイオン型グルタミン酸受容体(NMDA型、AMPA型)の活性化により $\text{Ca}^{2+}$ と $\text{Na}^{+}$ が細胞内に流入し、 $\text{K}^{+}$ が細胞外に流出する。また代謝型グルタミン酸受容体の活性化によりホスホリパーゼC・IP3系が活性化され、小胞体から細胞質へ $\text{Ca}^{2+}$ が放出され、細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度がさらに上昇する。細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度上昇は蛋白分解酵素(カルパインなど)、ホスホリパーゼA2、NO合成酵素、エンドヌクレアーゼ、さらに転写因子を活性化し、活性酸素産生と蛋白リン酸化を亢進させ、蛋白合成を障害して、細胞死に至ると考えられている(図2)<sup>9)</sup>。

## 2) 活性酸素

虚血部位ではミトコンドリアの電子伝達系の障害や、ホスホリパーゼA2の活性化に伴うアラキドン酸の蓄積、キサンチン脱水素酵素のキサンチン酸化酵素への変換など、活性酸素産生の素地が形成される。虚血時、血管内では好中球が活性化されるとともに、NADPHオキシダーゼからスーパーオキシドが産生され、血管内皮を障害する。その結果、抗凝系を抑制し、血管透過性を亢進させ、脳浮腫をきたして2次性脳障害をもたらす。再灌流時には活性酸素産生の予備状態にあった神経細胞に大量の酸素が供給されるため、活性酸素が爆発的に産生され、細胞膜や細胞質、ミトコンドリアにおける蛋白質、膜脂質、核酸に直接障害を与える。さらに活性酸素は、細胞内・細胞間情報伝達物質としての $\text{Ca}^{2+}$ や、細胞膜から遊離した脂質セラミド、アポトーシス促進遺伝子産物であるBaxなどと共に働いて、ミトコンドリア電子伝達系のATP産生を阻害し、ミトコンドリア膜電位を低下させてアポトーシスを誘導すると考えられている<sup>7)</sup>。

一方、このようなメカニズムの他に、活性酸素は血管内皮を損傷し、血球成分(特に白血球)の活性化、赤血球や血小板凝集による微小血栓の形成、細胞接着分子やサイトカインを介した血管内皮細胞の活性化、白血球の集積浸潤などを通して虚血障害を増悪させる。さらに血流が再開されると急速に浮腫が進

行し、毛細血管を圧迫して微小循環を障害し、虚血後低灌流をきたすことで脳障害を増幅する<sup>9)</sup>。

## 3) 一酸化窒素(NO)

NOは保護作用と障害作用の両方の性質を有しており、虚血時の作用メカニズムは単純ではない。一般に脳組織内のNO濃度が $2\mu\text{M}$ 未満の比較的低濃度の時は保護作用が強く、 $10\mu\text{M}$ 以上の高濃度の場合は障害作用が強いとされている。NOは生体内ではnNOS、iNOS、eNOSと呼ばれる3種類のNO合成酵素(NOS)によって合成される。このうちNOによる組織障害にはnNOSとiNOSが関与する<sup>9)</sup>。脳虚血が生じると、グルタミン酸の過剰放出に伴い神経細胞内の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、虚血後1~4時間で $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin依存性の神経型NO合成酵素(nNOS)が活性化され $\text{NO}^-$ が産生される。一方、マクロファージなどの炎症系細胞ではサイトカインなどの刺激を受け、虚血後1~2日で白血球や活性化マイクログリア等において誘導型NO合成酵素(iNOS)が活性化され、 $\text{Ca}^{2+}$ 非依存性に $\text{NO}^-$ を産生する。さらに虚血後6~24時間で微小血管に血管型NO合成酵素(eNOS)の活性化がみられ、 $\text{NO}^-$ を産生する<sup>9)</sup>。NOによる障害作用の主な標的はミトコンドリアと考えられる。NOはcytochrome C oxidaseを阻害し、ミトコンドリア電子伝達系を還元型に移行させ $\text{O}_2^-$ 産生を促進する。低い $\text{NO}^-$ レベルでは $\text{O}_2^-$ 産生は $\text{H}_2\text{O}_2$ を誘導するが、高い $\text{NO}^-$ レベルでは活性酸素の中で最も毒性の強いONOO<sup>-</sup>を誘導する。ONOO<sup>-</sup>はミトコンドリア電子伝達系を抑制するので、ATPは枯渇し細胞死(ネクロシス)が誘導される。さらに活性酸素誘発性のER stress、脂質過酸化、DNA障害などによりミトコンドリア依存性の細胞死(アポトーシス)が促進される。一方、NOには、脳血管拡張、脳血流の増加、血小板凝集抑制、白血球の粘着抑制などの作用があり、これらの機序を通して微小循環を改善し、細胞保護効果を示すことが知られている。NOによる神経保護作用にはeNOSが関与するという<sup>10)</sup>。

## 4) 転写因子、炎症、その他

脳虚血周囲のpenumbra領域では通常の蛋白合成が抑制されると同時に、一連の虚血関連因子が活性化

される。まずc-fos、c-jun、ATF、CREBといった immediate early genes (IEG) や転写調節因子が活性化され、多岐にわたる遺伝子群の発現調節に関与している。次いでHSP72といった熱ショック蛋白やGDNF、BDNF、VEGF、IGF-1などの神経栄養因子、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MCP-9といった炎症性サイトカイン、ICAM、ELAM-1、p-selectinなどの接着因子が次々と活性化されていく<sup>11)</sup>。これら様々な分子メカニズムを介して虚血障害は増悪や防御などの作用を受け、病像は修飾されていく。

#### 4. おわりに

虚血性神経細胞死の機序には、上述のように様々な因子が関与している。これらの因子による直接の影響に加え、活性化マイクログリアやアストロサイト、血管内皮、虚血組織へ浸潤する好中球やマクロファージといった神経細胞以外の細胞も、時間的・空間的に重なり合いながら脳虚血障害の進行または修復に関与している。すなわち虚血性神経細胞死は虚血のタイプ、部位、時間によって様相が異なる複雑なメカニズムによるものと考えられる。

(秦 龍二)

---

#### 参考文献

---

- 1) Macdonald RL, Stoodley M: Pathophysiology of cerebral ischemia. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 1998; 38: 1-11.
- 2) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA: Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-397.
- 3) Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA: Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977; 8: 51-57.
- 4) Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, Marcoux FW, FitzGibbon SJ, et al: Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 1981; 54: 773-782.
- 5) Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA: Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20: 306-315.
- 6) Tauskela JS, Morley P: On the role of Ca<sup>2+</sup> in cerebral ischemic preconditioning. *Cell Calcium* 2004; 36: 313-322.
- 7) Taylor JM, Crack PJ: Impact of oxidative stress on neuronal survival. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 397-406.
- 8) Fagan SC, Hess DC, Hohnadel EJ, Pollock DM, Ergul A: Targets for vascular protection after acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35: 2220-2225.
- 9) Moro MA, Cardenas A, Hurtado O, Leza JC, Lizasoain I: Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium* 2004; 36: 265-275.
- 10) Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA: Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 2004; 27: 283-289.
- 11) Hossmann KA: Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 2006; 26: 1055-1081.



## 虚血耐性

### 1. 虚血耐性 (ischemic tolerance)

近年の脳虚血に関する研究によると、致死的な脳虚血を負荷する前に予めストレスとなる軽微な虚血を負荷しておく、脳組織の障害は軽減され死滅を免れる。軽微な先行虚血によりその後の虚血障害が起こりにくくなる現象は虚血耐性現象 (ischemic tolerance) と呼ばれる<sup>1)</sup>。この現象を誘導するには軽微な虚血を1日以上前に負荷しておく必要がある。一度誘導された効果は1~2週間持続する。当初、虚血耐性現象は一過性前脳虚血モデル (スナネズミ、ラット) の海馬CA1領域の神経細胞で認められたが、その後、海馬以外の領域 (大脳皮質、線条体) でも確認されている<sup>2)</sup>。さらに中大脳動脈の一過性閉塞モデルでも、短時間の先行閉塞を負荷しておく、中大脳動脈閉塞による神経症状が著しく軽減され脳梗塞サイズも縮小することが分かり<sup>3)</sup>、脳組織は虚血という破滅的な病態に対抗する手段を保持していることが判明した。すなわち、虚血耐性現象は脳虚血の範囲や場所によらない普遍的な現象と考えることができる。また、培養神経細胞の実験でも、あらかじめ軽度の低酸素・低グルコース負荷を加えておくと、その後に加わる負荷に対して抵抗性を獲得することが証明されており<sup>4)</sup>、虚血耐性現象は細胞レベルでも存在することが明らかとなっている。

### 2. 交差耐性 (cross tolerance) と遠隔耐性 (remote tolerance)

虚血耐性現象において先行負荷する非致死性ストレスは必ずしも虚血である必要はない。低酸素や高体温、活性酸素、脱分極刺激 (cortical spreading depression) など虚血以外のストレスを先行負荷しても脳は虚血耐性を獲得する。このような虚血以外の刺激が虚血障害を軽減する現象は交差耐性 (cross tolerance) と呼ばれ<sup>5)</sup>、ストレスの種類によらず同じ効果が得られることから、共通のシグナル伝達機構を介した細胞障害防御メカニズムの存在が示唆される。この効果を得るには、虚血耐性の場合と同様、

脳虚血負荷の24時間以前に先行負荷を加える必要がある。交差耐性による脳虚血障害防御効果は虚血耐性の場合よりも弱いことが多いが、臨床的観点から安全に虚血耐性が誘導できる手段として注目されている。すでに、各種の炎症性サイトカインや麻酔薬、代謝阻害薬などにも虚血耐性誘導効果のあることが示され、また四肢の虚血や運動負荷が虚血耐性を誘導することも分かっており、これらを利用した臨床応用に向けた取り組みも進められている。

遠隔耐性 (remote tolerance) とは先行虚血と後発虚血の部位が異なる場合の虚血耐性のことであり、たとえば四肢の虚血や運動負荷により脳での虚血耐性が得られる現象をいう。この場合、脳自身は直接ストレスに曝らされないで、四肢から虚血耐性誘導シグナルが放出され、これが脳に伝わって虚血耐性が獲得されると考えられている。

### 3. 心筋虚血プレコンディショニング (ischemic preconditioning)

脳における虚血耐性と似た現象は心臓では ischemic preconditioning として知られている。最初の ischemic preconditioning の論文は犬を用いた短時間の心筋虚血の報告<sup>6)</sup>であり、あらかじめ短時間の非致死的な心筋虚血を加えておくと、その後の本来致死的な心筋虚血に対して耐性を持つというものである。その後の研究により、心筋の ischemic preconditioning には2種類の耐性機構の存在が明らかとなっている<sup>7)</sup>。第1は非致死的な虚血負荷後24時間目から発現し、72時間ほど持続する delayed ischemic preconditioning であり、この現象は蛋白合成阻害剤の投与により抑制されることから、脳の虚血耐性と同様、新たな蛋白合成を介した機序によると考えられる。第2は非致死的な虚血負荷後1時間以内に発現する rapid ischemic preconditioning で、その効果は数時間持続する。この現象にはイオンチャンネルの透過性変化や蛋白質のリン酸化による活性化などの、新たな蛋白合成を伴わないメカニズムの

関与が推定されている。最近、脳虚血モデルや培養神経細胞の低酸素負荷モデルでも、rapid ischemic preconditioningと同様の現象がみられると報告されており、脳組織でも遺伝子発現を介さない虚血耐性機構の存在が示唆されている<sup>9)</sup>。

#### 4. 虚血耐性の分子機構

脳虚血により正常の細胞維持機構が障害されると、神経細胞終末よりグルタミン酸が過剰放出される。この結果、各種のイオン型グルタミン酸受容体(NMDA型、AMPA型など)や電位依存性イオンチャンネルが開き、ナトリウムとカルシウムイオンが細胞内に流入し、カリウムが細胞外に流出する。ナトリウムイオンの流入に伴い、水も流入し浮腫の原因となる。一方、カルシウムイオンの流入により、細胞内のカルシウム濃度が上昇する。また代謝型グルタミン酸受容体の活性化によりホスホリパーゼC・IP3系が活性化し、小胞体から細胞質へカルシウムイオンが放出され、細胞内のカルシウム濃度が更に上昇する。細胞内のカルシウム濃度上昇は蛋白分解酵素(カルパインなど)、ホスホリパーゼA2、NO合成酵素、エンドヌクレアーゼ、さらに転写因子を活性化し、活性酸素産生と蛋白リン酸化を亢進させ、蛋白合成を障害して、細胞死に至ると考えられる<sup>10)</sup>。一方、血流再開後には微小循環障害、脳浮腫、活性酸素産生、炎症関連酵素やアポトーシス関連酵素の活性化などが起こり、更にmatrix metalloproteinase(MMP)などプロテアーゼ関連酵素や、TGF- $\beta$ などの組織修復関連蛋白の発現もみられ、これらが障害増強や軽減に働き虚血障害の病像を修飾する<sup>11)</sup>。

虚血耐性を獲得するには、まず虚血刺激がなんらかの分子センサーにより認識される必要がある。これまでの研究から、各種のイオンチャンネルや神経伝達物質、サイトカイン、redox-sensitive酵素、toll-like receptorなどが分子センサーとして同定されており、これらが刺激を受けて細胞内情報伝達系が活性化され虚血耐性獲得に至ると考えられる。この際、活性化される細胞内情報伝達系としては、MAPK系、Akt系、protein kinase C- $\epsilon$  isoform、mitochondrial ATP-sensitive K channelなどが報告さ

れている。さらにNOや活性酸素、ATPの分解産物であるアデノシンも細胞内情報伝達物質として耐性獲得に関与している<sup>9)</sup>。

虚血耐性現象には新たな蛋白合成機構が関与することから、転写因子の活性化とそれによる遺伝子発現の調節機構が耐性獲得に重要な役割を果たすと考えられる。たとえば低酸素や虚血に反応する転写因子としてはAP1、CREB、NF- $\kappa$ B、SP1などが知られているが、最も作用機構解明の進んだ転写因子としてhypoxia-inducible factor(HIF)を挙げることができる。低酸素・虚血によりHIFが活性化されると、VEGF、エリスロポイエチン、解糖系酵素やグルコーストランスポーターの遺伝子発現も増大し、これらが協調して虚血耐性獲得に働くという<sup>12)</sup>。その他、抗酸化酵素(Mn-SOD)やアポトーシス抑制遺伝子(Bcl2、Bcl-xL、IAPなど)、熱ショック蛋白質(HSP72、HSP110など)も先行虚血後に発現することが知られており、これらの物質が虚血耐性獲得に関与していることも報告されている。さらに本来は細胞障害性に作用する炎症性サイトカインや炎症関連酵素、カスパーゼなども先行虚血後に誘導されること、これらの発現を抑制すると虚血耐性が減弱すること、などから細胞障害メカニズムも何らかの形で虚血耐性形成の一翼を担っていると推察される<sup>13)</sup>。いずれにしろ、虚血耐性の獲得には複雑な分子機構が関与しており、全容の解明が待たれる。

#### 5. 血管虚血耐性(Vascular ischemic tolerance)

血管内皮や平滑筋も脳の虚血耐性現象に関与している。すなわち、予め非致死的な脳虚血を負荷しておくことで血管機能が強化されるため<sup>14)</sup>、後発虚血負荷後も血管拡張能は保たれ低灌流状態は改善される<sup>15)</sup>。先行虚血の作用メカニズムとして、セレクチン等の接着分子の血管内皮での発現が低下することで白血球の組織内侵入が抑制される(特に単球の活性化が抑制される)機構や、血管内皮型NO合成酵素の活性化により血管機能が強化される機構が想定されている。また血管内皮でのNF- $\kappa$ Bの活性化やVEGFの発現亢進、さらには血管内皮特異的な抗アポトーシス機

(つづく)



構の活性化も、血管新生促進作用などを介して虚血耐性に関与すると考えられている<sup>3)</sup>。

#### 6. グリア細胞虚血耐性 (Glial ischemic tolerance)

脳内のアストロサイトも虚血耐性に関与する<sup>16)</sup>。予め非致死的な脳虚血を負荷しておく、アストロサイトによる神経支持機構や血液脳関門の支持機構、フリーラジカル除去機構などが活性化され、周囲の神経細胞に対して虚血耐性効果を高めることが知られている。またTGF- $\beta$ 、BDNF、GDNF、VEGF、エリスロポイエチンなどの栄養因子やIL-10などの抗炎症性サイトカイン、さらにはHSP27、32などのheat shock proteinも、先行脳虚血によりアストロサイトでの発現が促進されることが証明されており、アストロサイトの虚血耐性への関与は疑う余地がない。

(秦 龍二)

#### 参考文献

- 1) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, et al : 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990 ; 528 : 21-24.
- 2) Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, et al : 'Ischemic tolerance' phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 1991 ; 561 : 203-211.
- 3) Chen J, Graham SH, Zhu RL, Simon RP : Stress proteins and tolerance to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996 ; 16 : 566-577.
- 4) Bruer U, Weh MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, et al : Induction of tolerance in rat cortical neurons : hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 1997 ; 414 : 117-121.
- 5) Gidday JM : Cerebral preconditioning and ischaemic tolerance. *Nat Rev Neurosci* 2006 ; 7 : 437-448.
- 6) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA : Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986 ; 74 : 1124-1136.
- 7) Das DK, Maulik N : Cardiac genomic response following preconditioning stimulus. *Cardiovasc Res* 2006 ; 70 : 254-263.
- 8) Atochin DN, Clark J, Demchenko IT, Moskowitz MA, Huang PL : Rapid cerebral ischemic preconditioning in mice deficient in endothelial and neuronal nitric oxide synthases. *Stroke* 2003 ; 34 : 1299-1303.
- 9) Meller R, Cameron JA, Torrey DJ, Clayton CE, Ordonez AN, et al : Rapid degradation of Bim by the ubiquitin-proteasome pathway mediates short-term ischemic tolerance in cultured neurons. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 7429-7436.
- 10) Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA : Pathobiology of ischaemic stroke : an integrated view. *Trends Neurosci* 1999 ; 22 : 391-397.
- 11) Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, Kim CW, Saito A, et al : Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx* 2004 ; 1 : 17-25.
- 12) Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM : Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 2003 ; 26 : 248-254.
- 13) Kariko K, Weissman D, Welsh FA : Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004 ; 24 : 1288-1304.
- 14) Nakamura H, Katsumata T, Nishiyama Y, Otori T, Katsura K, et al : Effect of ischemic preconditioning on cerebral blood flow after subsequent lethal ischemia in gerbils. *Life Sci* 2006 ; 78 : 1713-1719.
- 15) Bastide M, Gele P, Petrucci O, Pu Q, Caliez A, et al : Delayed cerebrovascular protective effect of lipopolysaccharide in parallel to brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003 ; 23 : 399-405.
- 16) Trendelenburg G, Dirnagl U : Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia : focus on ischemic preconditioning. *Glia* 2005 ; 50 : 307-320.

## 第II章 内耳虚血の病態

### 1. 内耳虚血と動物モデル

#### 1) 内耳虚血研究のための動物モデル

コラム「5分虚血と遅発性有毛細胞死」

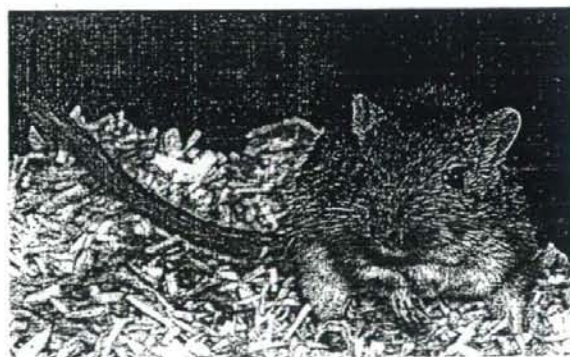
### 2. 一過性虚血による内耳病変

#### 1) 難聴とコルチ器の病変

#### 2) 有毛細胞障害とアポトーシス

#### 3) 血管条・ラセン靭帯の障害

#### 4) ラセン神経節の障害



スナネズミ

従来、内耳虚血に関する実験動物の多くは迷路動脈を遮断することにより行われてきたが、隣接する蝸牛神経を損傷する可能性が高い上、開頭操作が必要なので動物を長期間、生かすことが困難であった。このため内耳虚血障害の長期的影響についての報告は少ない。

特殊な脳血管構造を有するスナネズミを用いて、開頭せずに一過性内耳虚血が誘導できる動物モデルを開発し、虚血負荷によりどの程度の難聴が生じ、また内耳各部位でどのような変化が起こるかを、経時的に検討した。



## II. 内耳虚血の病態 1. 内耳虚血と動物モデル

### 1) 内耳虚血研究のための動物モデル

#### はじめに

古くから突発性難聴の原因の一つとして内耳虚血が挙げられ、その病態解明と治療法開発を目指して多くの動物実験が行われてきた。内耳は側頭骨の中に存在し頭蓋の内側から動脈支配を受けているので、解剖学的に栄養血管へのアプローチは難しい。このため研究者は各人各様の工夫を凝らし実験目的に応じた動物モデルを作成している。実際の研究に当たっては、実験目的を明確にした上で、それに適した解剖学的あるいは生理学的特性を持つ動物モデルを選択（あるいは作成）することが肝要で、どのモデルを用いるかにより研究精度は大きく左右される。

本章では内耳虚血研究のためにこれまでに開発された動物モデルの概要を述べるとともに、われわれが研究に使用している一過性内耳虚血モデルの作成法と特徴を概説する。

#### 内耳栄養動脈の圧迫・凝固による方法

内耳は前下小脳動脈 (anterior inferior cerebellar artery: AICA) の分枝である迷路動脈 (labyrinthine artery) の血管支配を受けていることから、内耳虚血に関する実験の多くは、前下小脳動脈あるいは迷路動脈の血流を遮断することにより研究されてきた。Kimuraらはモルモットの迷路動脈を凝固し、不可逆的な内耳虚血モデルを作成している。血流遮断後の蝸牛を組織学的に検討したところ、蝸牛組織は急速、広範囲に損傷され壊死（ネクロシス）をきたしていたと述べている<sup>1)</sup>。Perlmanらは、マイクロマニピュレーターに取り付けた探針で迷路動脈を圧迫する方法で、モルモットに内耳虚血を惹起している<sup>2)</sup>。蝸電図を測定して内耳機能への影響を検討したところ、蝸牛マイクロホン電位 (cochlear microphonics, CM)、

蝸牛神経複合活動電位 (compound action potential, CAP) はともに低下したと報告している。Konishiらはモルモットのの前下小脳動脈をPerlmanらと同じ方法で一時的（1～60分）に閉塞し、その後圧迫を解除することによって血流を再開させ、一過性内耳虚血を負荷している<sup>3)</sup>。その結果、CM、SP (summing potential)、EP (endocochlear potential) の値は、いずれも虚血により急激に低下したが、再開通とともに徐々に回復したと述べている。これら3つの報告は血流遮断による内耳虚血モデルの基本とされ、以降、これらの手法を用いて多くの研究が行われてきた<sup>4) 5) 6) 7)</sup>。

モルモット以外の動物を用いた研究も少なくない。ネコを用いた実験で、Bernsteinら<sup>8)</sup>は迷路動脈を閉塞して組織学的な検討を行い、またIto<sup>9)</sup>は迷路動脈にクリップをかけ動脈血流の閉塞・解除を行うことで一過性虚血の影響を検討している。一方、小動物を用いた実験も報告されている。Seidmanら<sup>10)</sup>はラットのの前下小脳動脈を電気凝固あるいは微小鉗子で挟むことによって内耳虚血を惹起している。Renら<sup>11)</sup>はスナネズミの迷路動脈を1秒から5分間、微小鉗子で閉塞・解除することで一過性内耳虚血を惹起したと報告している。Suzukiら<sup>12)</sup>も同様の方法でマウスに一過性内耳虚血を誘導しその病態を研究している。これらの方法は明視下に血管を凝固または圧迫するため、一過性虚血から永久虚血までの負荷を加えることが可能である。また虚血を繰り返すこともできるため、虚血性内耳障害の病態解明に有用である。しかし、迷路動脈は内耳道内を走行しており、AICAも小脳橋角部に位置するため、隣接する蝸牛神経を損傷せずにアプローチすることが難しく、内耳栄養動脈のみを遮断するには熟練した技術を要する。またAICAの分枝である迷路動脈は上小脳動脈や後小脳動脈との間に吻合枝を持つことがあるため、AICA

閉塞では完全な内耳虚血にはならない<sup>1)</sup>という問題もある。さらに開頭操作が必要なため、小動物では衰弱し死亡することも多く、長期的な経過観察には適していない。Tsujiら<sup>13)</sup>のように、モルモットを用いて一過性内耳虚血後から蝸牛機能回復まで長期間にわたり聴力変化をみたとの報告もあるが、慢性実験には熟練した技術を要する。

## 血栓・塞栓形成による方法

### 1. 光増感反応法

光増感物質の1つであるローズベンガルにピーク波長540nmの緑色光を照射すると、スーパーオキシド(superoxide)などの活性酸素が発生する。この反応を血管内で起こすと、脂質過酸化反応により血管内皮が局所的に障害され、ここに血小板粘着やフィブリン凝集などが起こり、血栓が形成される。この光増感反応を利用して、Umamuraら<sup>14)</sup>はラットの蝸牛に、Kohnoら<sup>15)</sup>はラットの前庭に血栓を形成して、CAPの変化や血管条の組織変化、前庭機能への影響などを研究している。浅井ら<sup>16)</sup>はこの反応を前下小脳動脈の血栓形成に応用し、広範囲の壁内血栓による循環障害モデルを作成している。Iwasakiら<sup>17)</sup>はこの方法を応用して血管条に局限した内耳病変の作成に

成功している。本法の最大の長所は、動物への侵襲が少なく慢性実験が可能なこと、および目的部位に焦点を定めた限局性病変が作成できることである。しかし形成された血栓は永続的で、一過性虚血による病態研究には向かない。

### 2. 磁力による鉄粉塞栓法

Giebleら<sup>18)</sup>はカルボニル鉄粉を経心的に注入し、虚血を惹起したい部位に磁石を当てて血管内の鉄粉を引き寄せ塞栓を起こさせる方法を報告している。Schweinfurthら<sup>19)</sup>はこの方法を用いて内耳虚血時の歪成分耳音響反射(Distortion Product Otoacoustic Emission: DP-OAE)を測定し、虚血によりDP-OAEが消失することを報告している。本法は全身的な影響がなく慢性実験も可能と思われるが、光増感反応法ほど限局した塞栓は起こせない。

### 3. ビーズ注入法

Igarashiら<sup>20)</sup>はリスザルの椎骨動脈から直接プラスチックのビーズを注入し、内耳毛細血管に塞まったところを組織学的に検討している。その結果、蝸牛第2回転から頂回転に塞栓が起こり易いことを報告している。この方法は全ての毛細血管にビーズが詰まるため、任意の部位を選択して虚血障害を起こすことはできないが、内耳の血流分布をみるには適したモデルといえる。

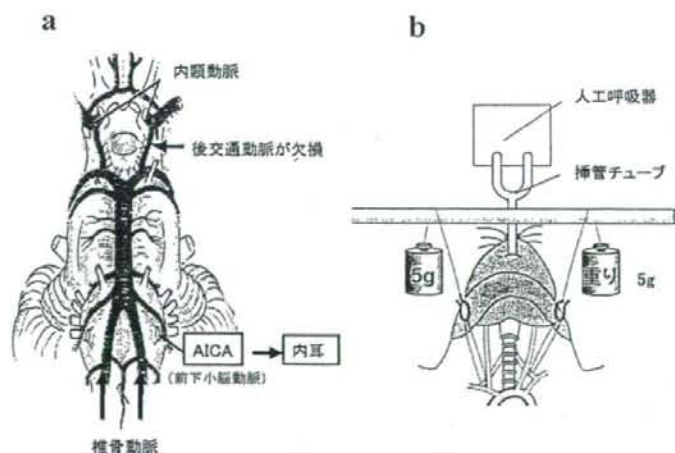


図1 一過性内耳虚血の動物モデル

- a: スナネズミでは後交通動脈が欠損しているため、両側の椎骨動脈血流を遮断すると、内耳を含めた後脳に虚血がおこる。  
b: 両側椎骨動脈血流の遮断法



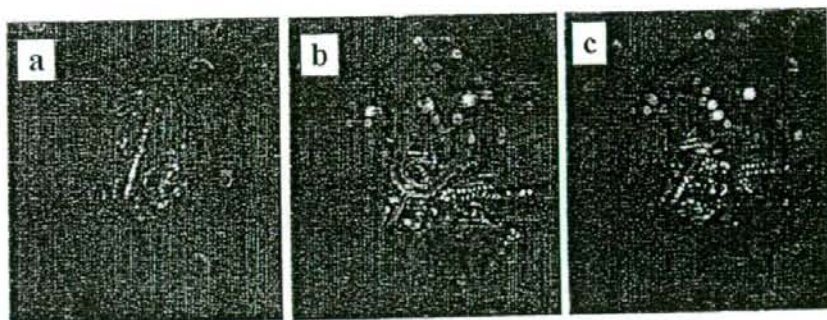


図2 椎骨動脈遮断の実際

a: 椎骨動脈を露出する、b: 血管に絹糸を掛ける、c: 絹糸を牽引し虚血を惹起する

### 椎骨動脈血流遮断による方法

Hataら<sup>21)</sup>はWillis動脈輪の後交通動脈が先天的に欠損しているスナネズミを用いて、両側の椎骨動脈血流を同時に遮断、再開通することで一過性後脳虚血モデルを作成した。スナネズミでは後脳虚血時に前下小脳動脈の血流が遮断されるので、同時に内耳血流も遮断される。われわれは過去10年余りこのスナネズミを用いて一過性内耳虚血の研究を行ってきた。以下、本法の概要とその長所、短所を要約する。

動物を専用実験台上に固定し、酸素30%、笑気70%の混合ガスにハロセン3%を加えて全身麻酔を施した。経口挿管後に仰臥位にて前頸部皮膚切開を行い、顕微鏡下に両側の椎骨動脈を剥離し、4-0絹糸を動脈に掛け5gの重りによって牽引することで椎骨動

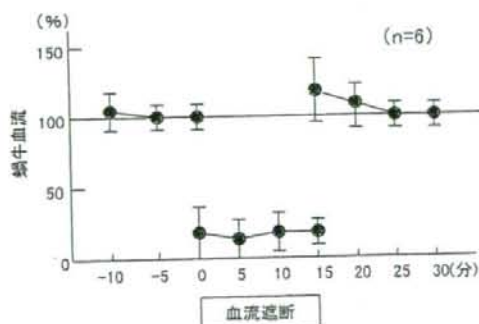


図3 虚血負荷前後の蝸牛血流量

虚血により蝸牛血流は著明に低下する。再開通すると血流は虚血前値に回復する。

脈の血流を遮断した(図1)。15分間の虚血負荷後に重りと絹糸を外し、顕微鏡下に椎骨動脈の血流再開を確認した。(図2)

虚血負荷前後の蝸牛血流量は、レーザードプラ血流計を用いて蝸牛基底回転側壁にレーザー光をあてて測定した。上述の方法で虚血負荷を加えると、虚血開始とほぼ同時に蝸牛血流は低下し、虚血中は低下した状態で安定していた。再開通直後は一旦、虚血前値以上となりオーバーシュートを示すが、まもなく虚血前の血流量に戻った。これにより確実に内耳虚血の起こっていることが分かる。(図3)

本法の長所としては、1) 開頭を必要としないので、長期間動物を生存させることができる、2) 蝸牛神経や中耳に触れないので、手術操作による聴覚系への影響が回避できる、などが挙げられる。一方、短所としては、1) 本モデルはスナネズミに限られる、2) 後脳虚血を起こすので長時間の虚血負荷ができず、15分程度の虚血が限界である、3) 脳幹や小脳にも虚血病変が起こる、4) 内耳全体が虚血を受け、任意の部位に限局した虚血が起こせない、などの問題がある。研究目的に合致すれば応用範囲の広い動物モデルといえる。

(兵頭 純)

### 参考文献

- 1) Kimura R, Perlman HB: Arterial obstruction of the labyrinth.

- I. Cochlear changes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1958 ; 67 : 5-24.
- 2) Perlman HB, Kimura R, Fernandez C : Experiments on temporary obstruction of the internal auditory artery. *Laryngoscope* 1959 ; 69 : 591-613.
  - 3) Konishi T, Butler RA, Fernandez C : Effect of anoxia on cochlear potentials. *J Acoust Soc Am* 1961 ; 33 : 349-356.
  - 4) Kuasakari J, Kobayashi T, Rokugo M, Arakawa E, Kawamoto K : The effect of transient anoxia upon the cochlear potentials. *Auris Nasus Larynx* 1981 ; 8 : 55-64.
  - 5) 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* 1993 Feb ; 102 : 127-136.
  - 6) Makino K, Morimitsu T : Effects of arterial occlusion on endocochlear DC potential and cochlear blood flow in guinea pigs. *Auris Nasus Larynx* 1994 ; 21 : 75-83.
  - 7) Tabuchi K, Kusakari J, Ito Z, Takahashi K, Wada T, et al : Effect of nitric oxide synthase inhibitor on cochlear dysfunction induced by transient local anoxia. *Acta Otolaryngol* 1999 ; 119 : 179-184.
  - 8) Bernstein JM, Silverstein H : Anterior cerebellar and labyrinthine arteries. *Arch Otolaryngol* 1966 ; 83 : 422-435.
  - 9) Ito H : Effects of circulatory disturbance on the cochlea. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1991 ; 53 : 265-269.
  - 10) Seidman MD, Quirk WS : The anterior inferior cerebellar arterial network supplying the rat cochlea and its role in autoregulation of cochlear blood flow. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992 ; 249 : 332-335.
  - 11) Ren T, Brown NJ, Zhang M, Nuttal AL, Miller JM : A reversible ischemia model in gerbil cochlea. *Hear Res* 1995 ; 92 : 30-37.
  - 12) Suzuki T, Ren T, Nuttal AL, Miller JM : Age-related changes in cochlear blood flow response to occlusion of anterior inferior cerebellar artery in mice. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1998 ; 107 : 648-653.
  - 13) Tsuji S, Ohkubo H, Hara A, Kusakari J : Long-term observations on the reversibility of cochlear dysfunction after transient ischemia. *Hear Res* 2002 ; 166 : 72-81.
  - 14) Umemura K, Kohno Y, Matsuno H, Uematsu T, Nakashima M : A new model for photochemically induced thrombosis in the inner ear microcirculation and the use of hearing loss as a measure for microcirculatory disorders. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1990 ; 248 : 105-108.
  - 15) Kohno Y, Umemura K, Asai Y, Uematsu T, Nakashima M : A new model of equilibrium dysfunction in the rat induced by photochemical damage to the inner ear's microcirculation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1992 ; 249 : 283-286.
  - 16) 浅井美洋, 梅村和夫, 中島光好, 野末道彦 : 前下小脳動脈血栓によるラット難聴モデル 耳鼻臨床1992 ; 補60 : 155-159.
  - 17) Iwasaki S, Mizuta K, Gao J, Wu R, Hoshino T : Focal microcirculation disorder induced by photochemical reaction in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 1997 ; 108 : 55-64.
  - 18) Giebel W, Schmidt G, Galic M, Winkler B : Occlusion of inner ear vessels by magnetic forces applied to circulating metallic iron particles. *Arch Otorhinolaryngol* 1985 ; 242 : 329-335.
  - 19) Schweinfurth JM, Cacace AT : Cochlear ischemia induced by circulating iron particles under magnetic control : an animal model for sudden hearing loss. *Am J Otol* 2000 ; 21 : 636-640.
  - 20) Igarashi M, Alford BR, Konishi S, Shaver EF, Guilford FR : Functional and histopathological correlations after microembolism of the peripheral labyrinthine artery in the dog. *Laryngoscope* 1969 ; Apr 79 : 603-623.
  - 21) Hata R, Matsumoto M, Hatakeyama T, Ohtsuka T, Niinobe M, et al : Differential vulnerability in the hindbrain neurons and local cerebral blood flow during bilateral vertebral occlusion in gerbils. *Neuroscience* 1993 ; 56 : 423-439.



## 5分虚血と遅発性有毛細胞死

1982年、Kirino<sup>1)</sup>はスナネズミの脳血流を一過性に遮断すると海馬CA1領域の錐体ニューロンがゆっくりと細胞死に陥る現象を報告し、これを遅発性神経細胞死と名づけた。この遅発性細胞死は神経伝達物質であるグルタミン酸によってもたらされると考えられている。すなわち「虚血によって細胞外に放出された大量のグルタミン酸が、受容体を介して大量のCa<sup>2+</sup>を細胞内へ流入させることで細胞死に至る」というもので、これをグルタミン酸・カルシウム説と呼んでいる。これは脳以外であってもグルタミン酸受容体を有する細胞においては同様のメカニズムにより遅発性細胞死が起こり得ることを示唆している。

内耳でも、内毛細胞と蝸牛神経間の神経伝達物質はグルタミン酸である<sup>2)</sup>とする説が有力であり、内毛細胞やラセン神経節細胞にはグルタミン酸受容体の存在が明らかとなっている<sup>3) 4) 5)</sup>。また、一過性内耳虚血により外リンパ中のグルタミン酸濃度が著明に上昇すること<sup>6)</sup>や鼓室階にグルタミン酸アゴニストであるカイニン酸を投与すると10日後にラセン神経節細胞数が減少すること<sup>7)</sup>などが明らかとなっている。すなわち、一過性虚血は内耳においても内毛細胞やラセン神経節細胞に遅発性神経細胞死を引き起こす可能性が推測される。

そこでスナネズミを用いて内耳に一過性虚血を負荷し、聴力変化や内耳の遅発性細胞死の有無を検討

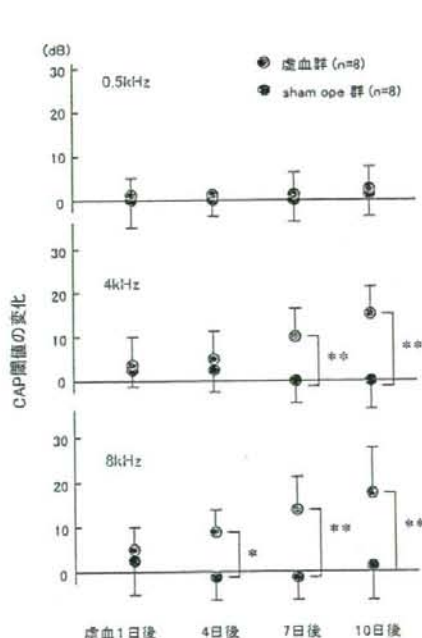


図1 虚血後のCAP閾値の推移

0.5kHzではCAP閾値に変化はないが、4kHzでは7日後から、8kHzでは4日後から閾値上昇がみられた。  
(\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ )

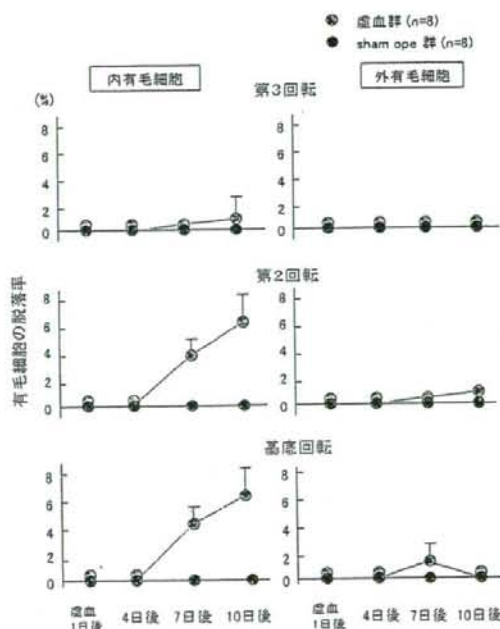


図2 内・外有毛細胞の脱落率の推移

内毛細胞では虚血4~7日後から脱落が顕著になる。外毛細胞ではほとんど脱落はみられない。

した。5分前脳虚血の数日後から錐体細胞に変性がみられたというKirino<sup>1)</sup>の報告に準じ、虚血時間を5分間とした。

聴力変化を図1に示す。聴力変化はCompound action potential (CAP) 閾値の変化を指標とした。虚血直後、CAP閾値は上昇したが翌日には元の値に戻った。その後、4日後までは変化はないが、7日後から10日後にかけ高音域での閾値が有意に上昇した。

有毛細胞数の変化を図2に示す。CAP閾値の変化と同様に7日後から内毛細胞の脱落がみられるようになり、10日後には内毛細胞の脱落はさらに高度となった。しかし外毛細胞には虚血負荷による変化はみられなかった。

ラセン神経節ニューロン数の推移を図3に示す。ラセン神経節の神経細胞数は7日後から減少を始め、10日後にはさらに減少していた。

以上、5分間の内耳虚血では、内毛細胞やラセン神経節細胞などグルタミン酸受容体を有する細胞が選択的に障害されていた。これらの障害は虚血負荷の直後には見られず、内毛細胞やラセン神経節細胞では4日後以降に認められており、海馬CA1領域の虚血障害でみられた遅発性細胞死と極めて類似していた。

このように一過性内耳虚血による遅発性細胞死の原因としてグルタミン酸・カルシウムの関与が強く疑われるが、一方で、虚血がアポトーシスを誘導し

遅発性細胞死をきたすという説も提唱されており、更なる検討が必要と思われる。

今回の実験で一過性虚血後に内毛細胞やラセン神経節細胞において遅発性細胞死がおこることが明らかとなった。しかし、5分間の虚血では障害が比較的軽微であり、臨床に即した研究を行うためには、より障害の強いモデルでの検討が必要と思われる。このため一過性内耳虚血モデルは虚血時間を15分間に延長した15分虚血モデルへと移行した。

(古賀健一郎)

#### 参考文献

- 1) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 1982; 239: 57-69.
- 2) Eybalin M: Neurotransmitters and neuromodulators of the mammalian cochlea. *Physiol Rev* 1993; 73: 309-373.
- 3) Kuriyama H, Albin RL, Altschuler RA: Expression of NMDA-receptor mRNA in the rat cochlea. *Hear Res* 1993; 69: 215-220.
- 4) Niedzielski AS, Wenthold RJ: Expression of AMPA, kainate, and NMDA receptor subunits in cochlear and vestibular ganglia. *J Neurosci* 1995; 15: 2338-2353.
- 5) Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP: Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 1996; 16: 4457-4467.
- 6) Hakuba N, Gyo K, Yanagihara N, Mitani A, Kataoka K: Efflux of glutamate into the perilymph of the cochlea following transient ischemia in the gerbil. *Neurosci Lett* 1997; 230: 69-71.
- 7) Juiz JM, Rueda J, Merchan JA, Sala ML: The effects of kainic acid on the cochlear ganglion of the rat. *Hear Res* 1989; 40: 65-74.

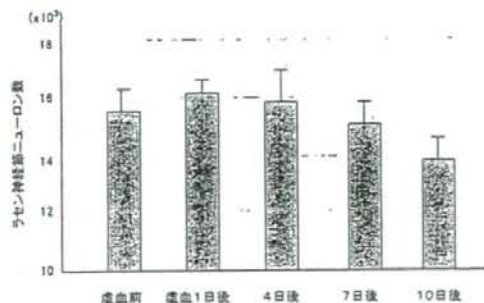


図3 ラセン神経節ニューロン (I型神経細胞) 数の推移

I型神経細胞の減少は虚血7日後以降に顕著になる。



## II. 内耳虚血の病態 2. 一過性虚血による内耳病変

## 1) 難聴とコルチ器の病変

【要約】スナネズミに一過性内耳虚血を負荷し、虚血7日後の聴力およびコルチ器の形態に及ぼす変化を検討した。聴力は蝸電図のCAP閾値を指標として評価した。その結果、虚血7日後のCAP閾値は虚血前と比べ、1kHzで9.2dB、4kHzで12.2dB、8kHzで16.3dB、上昇した。またこの時のコルチ器を組織学的に観察したところ、外有毛細胞にはほとんど障害がみられなかったが、内有毛細胞には聴毛の脱落や癒合などの所見が散在性にみられた。これらの変化は頂回転より基底回転に多く観察された。以上のことより、虚血に対して内有毛細胞は外有毛細胞よりも脆弱であり、また基底回転の方が頂回転よりも障害程度が強いことから高音域がより高度に障害されると結論した。

## はじめに

虚血による内耳障害については古くより多くの研究が行われてきたが、そのほとんどは急性期<sup>1)2)</sup>の変化をみたものであり、長期経過を観察した研究は少ない。これは内耳道を走行する迷路動脈へのアプローチが困難であり、隣接する蝸牛神経を損傷しやすく、動物を長期間生存させることが困難なためである。これまでの報告によると、虚血が高度・長時間であると組織は壊死を起こすが、一過性であれば障害は限局的で回復も期待できる。これまで、一過性内耳虚血がどのようなメカニズムで難聴をきたすかについてはあまり知られていなかった。今回、一過性内耳虚血の動物モデルを用いて、虚血後の聴力の推移と蝸牛組織、特にコルチ器の障害について検討した。

## 方 法

## 1. 聴力測定

聴力評価には蝸電図を用いた。スナネズミの顔面神経管内にエポキシ被覆白金線を留置し記録電極とした<sup>3)4)</sup>。電極はデンタルセメントで固定し、他端は皮下を通して耳後部に導き、先端を皮膚面より露出させた。蝸電図測定時にはこの電極をクリップで挟んで開電極とし、また針電極を記録側および対側の

耳後部に刺入して、それぞれ不開電極と接地電極とした。

刺激音には1、4、8kHzの3周波数におけるトーンバースト（立ち上がり、立ち下がり時間各1.25ms、持続時間10ms）を用いた。ビニール製のイヤホンチューブ（内径2mm）を外耳道に密着させて刺激音を鼓膜前面に導いた。記録された反応は信号処理装置にて300回加算し、また刺激音圧は10dBステップで変化させ、閾値付近では5dBステップで変化させてCAP（Compound Action Potential）閾値を求めた。

両側の椎骨動脈の血流を15分間遮断し、虚血直後および7日後にCAP閾値を求め、虚血前値と比較した。

## 2. 有毛細胞脱落率の算出

虚血7日後に前庭窓および蝸牛窓を開放、頂回転に設けた小孔より4%パラホルムアルデヒドを注入して局所灌流固定を行った。その後、実体顕微鏡下に頂回転から基底回転に至るコルチ器を採取し、Rhodamine-phalloidinとHoechst33342による二重染色を行った。これを蛍光顕微鏡で観察し、核と聴毛のいずれかが消失している内・外有毛細胞を同定し、これを脱落細胞と定義して、その割合（%）をそれぞれ蝸牛回転ごとに算出した。

## 3. 電子顕微鏡による有毛細胞の観察

虚血1時間後に蝸牛を採取し、蝸牛壁の小孔より

	(%)		
	基底回転	第2回転	頂回転
内毛細胞	26.5	21.7	3.2
外毛細胞	3.3	6.0	2.1

表1 蝸牛回転別の内・外毛細胞の脱落率(虚血7日後)  
一過性虚血による障害は主に基底回転および第二回転の内毛細胞にみられる。外毛細胞や頂回転の変化は軽微である。

2.5%グルタルアルデヒドを注入して内耳灌流固定を行った。2%オスニウム酸にて後固定し、エポン包埋後、コルチ器を含む標本を作製した。これに酢酸ウランとクエン酸鉛を用いて二重染色を施し、透過型電子顕微鏡(TEM)にて基底回転の内・外毛細胞を観察した。

また虚血後の長期的な内耳病態を観察する目的で、虚血7日後に蝸牛を採取し、走査型電子顕微鏡(SEM)にてコルチ器の観察を行った。標本の内耳灌流固定と後固定を行った後、白金蒸着しSEMにより観察した。

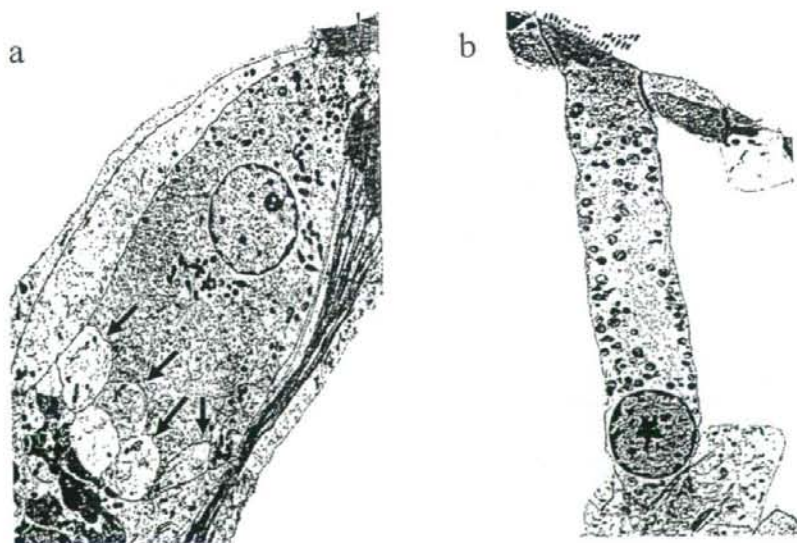


図2 コルチ器の透過型電子顕微鏡所見(虚血1時間後)

- a: 内毛細胞では細胞質に空胞形成がみられ、シナプス間隙は崩壊変性をきたしている。  
b: 外毛細胞には形態的な異常はない。

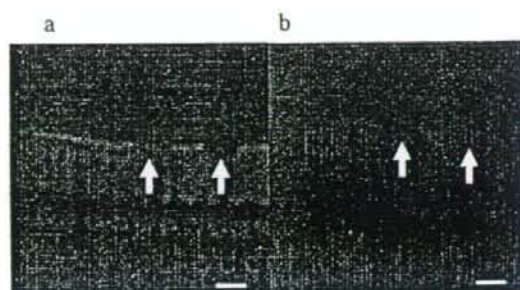


図1 虚血7日後のコルチ器  
a: Rhodamine-phalloidin染色、b: Hoechst33342染色  
聴毛の消失と一致して核の脱落が認められる。(矢印)  
(scale bars=10 $\mu$ m)

## 結果

### 1. 聴力の変化

虚血直後にCAP閾値は急激に上昇し、スケールアウトとなった。血流再開後、CAPは徐々に回復した。虚血前のCAP閾値を基準(0 dB)とした場合、虚血7日後の閾値上昇は、1kHzで9.2dB、4kHzで12.2dB、8kHzで16.3dBであった。



## 2. 有毛細胞の脱落率

虚血7日後の内・外有毛細胞の脱落率を表1にまとめた。外有毛細胞では核や聴毛に異常所見はほとんどみなかったが、内有毛細胞では核と聴毛がともに消失する脱落細胞が多数認められ、特に基底回転においてより高頻度であった(図1)。

## 3. 電子顕微鏡による有毛細胞の観察

虚血直後の有毛細胞をTEMで観察すると、外有毛細胞にはほとんど異常を認めなかったが、内有毛細胞にはシナプス側を中心に細胞質に空胞形成が認められ、また樹状突起のシナプス付近にも崩壊・脱落が生じていた<sup>3)</sup>(図2)。

虚血7日後のコルチ器のSEMによる観察<sup>8)</sup>でも、外有毛細胞は正常な形態を維持していたが、内有毛細胞には聴毛脱落や癒合などの所見がみられた。このような所見は頂回転よりも基底回転に多かった(図3)。

## 考 察

実験の結果、虚血7日後には有意にCAP閾値が上昇すること、閾値上昇は中低音域よりも高音域の方が顕著なことが示された。組織学的にも、特に基底回転の内有毛細胞と直下の樹状突起で変性・脱落が高度であった。このように虚血に対して内有毛細胞が脆弱な理由については、別稿の「グルタミン酸による障害機序」の項に記載する。

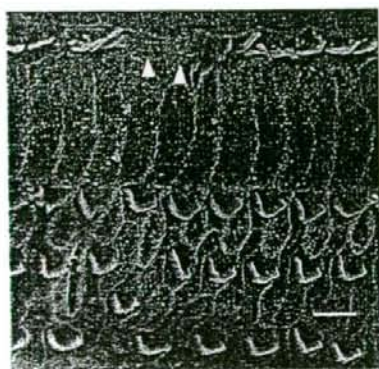


図3 コルチ器の走査型電子顕微鏡所見(虚血7日後)

内有毛細胞では聴毛の消失が認められる。外有毛細胞の形態には変化がない。(scale bars=10 $\mu$ m)

虚血に対して頂回転と比較して基底回転に強く障害が生じる機序として、各回転における酸素消費の違いが考えられる。基底回転は頂回転に比べ約2.5倍の酸素を消費する<sup>7)</sup>ことから、基底回転は好気性代謝が盛んであり、虚血障害に対する感受性も高いと考えられる。実際に酸素欠乏に対して電気生理学に周波数別の障害の程度を検討した研究<sup>8)</sup>において、高音部の方が低音部より酸素欠乏に対し敏感であると報告されている。

以上のことより、虚血に対して内有毛細胞は外有毛細胞よりも脆弱であること、また基底回転の方が頂回転よりも障害程度が強いことから、高音域がより高度に障害されることが明らかとなった。

(白馬伸洋)

## 参考文献

- 1) Kimura R, Perlman HB: Arterial obstruction of the labyrinth. I. Cochlear changes. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1958; 67: 5-24.
- 2) Perlman HB, Kimura R, Fernandez C: Experiments on temporary obstruction of the internal auditory artery. *Laryngoscope* 1959; 69: 591-613.
- 3) Hildesheimer M, Rubinstein CM, Creter D, Rubinstein M: Long-term electrode implantation for recording cochlear electrical activity in guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 1979; 88: 37-40.
- 4) Watanabe F, Koga K, Hakuba N, Gyo K: Hypothermia prevents hearing loss and progressive hair cell death after transient cochlear ischemia in gerbils. *Neuroscience* 2001; 102: 639-645.
- 5) Hakuba N, Koga K, Shudou M, Watanabe F, Mitani A, et al: Hearing loss and glutamate efflux in the perilymph following transient hindbrain ischemia in gerbil. *J Comp Neurol* 2000; 418: 217-226.
- 6) Koga K, Hakuba N, Watanabe F, Shudou M, Nakagawa T, et al: Transient cochlear ischemia causes delayed cell death in the organ of Corti: an experimental study in gerbils. *J Comp Neurol* 2003; 456: 105-111.
- 7) Mizukoshi O, Daly JF: Oxygen consumption in normal and kanamycin damaged cochleae. *Acta Otolaryngol* 1967; 64: 45-54.
- 8) Fechter LD, Thorne PR, Nuttall AL: Effect of carbon monoxide on cochlear electrophysiology and blood flow. *Hear Res* 1987; 27: 37-45.

## II. 内耳虚血の病態 2. 一過性虚血による内耳病変

### 2) 有毛細胞障害とアポトーシス

【要約】虚血障害に対して脆弱とされる内毛細胞に注目し、一過性内耳虚血後に内毛細胞がどのような機序で細胞死に至るかを検討した。スナネズミに15分間の内耳虚血を負荷し、内毛細胞における核の形態学的変化を経時的に観察した。その結果、虚血一再灌流の12時間後をピークに、3時間後から2日後までの間、内毛細胞にアポトーシスの特徴的所見とされる核凝縮が認められた。さらにTUNEL染色でDNAの断片化を確認し、透過型電子顕微鏡にて核のクロマチン凝縮や分裂を認めたことから、虚血による内耳障害にはアポトーシスが関与すると結論した。

#### はじめに

近年の脳梗塞に関する研究によると、一過性虚血の数日後より海馬CA1領域に遅発性神経細胞死<sup>1)</sup>が起こることが報告され、グルタミン酸のexcitotoxicityとの関連で注目されている。その後、この現象については多くの研究が行われ、遅発性神経細胞死はアポトーシス<sup>2)</sup>によることが明らかとなった。

われわれはこれまでのスナネズミを用いた研究<sup>3)</sup>で、内毛細胞は虚血に対して特に脆弱であり、虚血後より徐々に脱落が進行し、海馬における遅発性神経細胞死と類似した病態が生じることを報告した<sup>3) 4)</sup>。しかし、虚血後の内毛細胞がどのようなメカニズムで形態学的変化を起こし細胞死に至るかは不明であった。

今回、一過性虚血後の内毛細胞死におけるアポトーシスの関与を検討する目的で、15分間の内耳虚血負荷を行い、まずHoechst33342による蛍光染色にて核の全体像を把握し、さらに核の形態学的変化を詳細に検討するためTUNEL染色および透過型電子顕微鏡による観察を行った。

\*：細胞死はアポトーシスとネクローシス（壊死）の二つのメカニズムにより起こるといわれている。アポトーシスはプログラムされた細胞死のことで、個体の生命

維持のために不要な細胞を自ら死に至らしめる機構であり、カスパーゼなどのプロテアーゼやBcl-2ファミリーなどの細胞内因子により制御される。一方、ネクローシスは細胞が外部因子により致命的な損傷を受けた場合の病的な死であり、炎症や血管病変、血流障害などによって生じる。形態学的特徴としてアポトーシスは先に核に変化が起こるのに対し、ネクローシスは先に細胞質に変化が生じる。

#### 対象および実験方法

1. 実験動物および一過性内耳虚血モデルの作成  
実験動物には体重60～80gのスナネズミを使用し、15分間の両側椎骨動脈血流遮断による一過性内耳虚血を行った。sham op群には両側椎骨動脈に絹糸を掛けるが血流遮断は行わない疑似手術のみを施行し、虚血群と比較した。
2. 有毛細胞の観察とアポトーシス細胞割合の算出  
蛍光顕微鏡下に内毛細胞の核の形態を観察するため、Hoechst33342を用いて標本の核染色を行った。標本採取の時期は、虚血の30分、3、6、12時間、1、2、3、4日後とし、虚血群には各5匹（10耳）、sham op群には各3匹（6耳）を割り当てた。ペントバルビタール腹腔内投与による深麻酔後、両側の耳胞を採取して局所灌流固定を行い、さらに同じ固定液で



後固定を行った。ついで実体顕微鏡下にsurface preparation法で基底回転のほぼ全周のコルチ器を採取した。採取した標本はHoechst33342で染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。この方法により蝸牛基底回転の内毛細胞の生細胞と死細胞およびアポトーシス細胞の数をカウントし、アポトーシス細胞と脱落細胞の割合を算出した。

### 3. TUNEL染色による観察

TUNEL染色にはIn situ cell death detection kit, PODを用いた。虚血12時間後に、虚血群は5匹(10耳)、sham op群は3匹(6耳)の蝸牛を抽出した。surface preparationにて基底回転のほぼ全周のコルチ器を採取後、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で内因性ペルオキシダーゼのブロッキングを行った。その後、TUNEL反応液と37℃、60分間反応させ、POD-conjugated anti-fluorescein antibodyを加えて37℃、30分間反応させた。最後にDABで発色させ、光学顕微鏡で観察した。この方法により蝸牛基底回転における内毛細胞のTUNEL陽性細胞数をカウントし、全内毛細胞に対する割合を算出した。

### 4. 透過型電子顕微鏡(TEM)による観察

対象は虚血群が5匹(10耳)、sham op群が3匹(6耳)とし、それぞれ虚血12時間後に蝸牛を採取した。局所灌流固定および後固定の後、コルチ器を採取した。その後、Hoechst33342による蛍光染色にて核の凝縮を示した内毛細胞を含む標本を取り出し、2%オスミウム酸で後固定を行い、エポン包埋後、透過型電子顕微鏡にて内毛細胞における核の形態を観察した。

## 結 果

### 1. 内毛細胞の脱落とアポトーシス細胞の割合

図1aに示すようにsham op群の核の形態は正常であったが、虚血群(図1b)では、虚血一再灌流の3時間目以降、核の消失した脱落細胞が散在性にみられ、その中には核の凝縮したアポトーシス細胞も認められた(図1c)。核の凝縮の程度は軽度なものから高度なものまで様々であり、断片化した核も存在した。

虚血後のアポトーシス細胞の割合および累積脱落細胞の割合を図2に示す。アポトーシス細胞の割合は虚

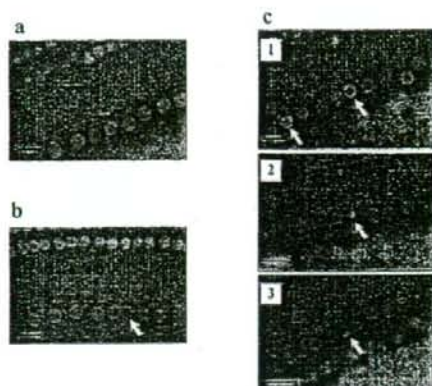


図1 内毛細胞のHoechst染色像

- (a) sham op群では内毛細胞の核の形態に異常はない。  
 (b) 虚血3時間後、核の消失した内毛細胞が散在性に認められた。  
 (c) 虚血3時間後から2日後までの間は核の凝縮したアポトーシス細胞が認められた。核の凝縮は軽度なもの(C-1)から高度なもの(C-2)まで様々で、核の断片化(C-3)も認められた。(scale bars=10μm)

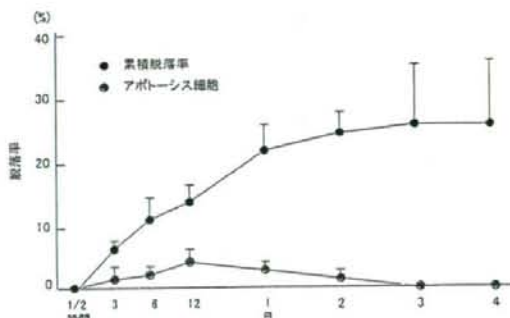


図2 アポトーシス細胞割合(%)の経時的変化

アポトーシス細胞割合(●)は虚血後より徐々に増加し、12時間後にピークに達し、その後は減少した。内毛細胞の累積脱落率(●)は虚血3日後までは徐々に増加したが、その後は変化しなかった。

血後徐々に増加し、12時間後に4.5±1.7%とピークに達し、その後は減少した。これに対応して内毛細胞の累積脱落細胞の割合は虚血3日後まで徐々に増加して23.7±3.3%となり、その後はほぼ一定であった。

### 2. TUNEL染色による内毛細胞の観察

アポトーシス細胞の割合がピークを示した虚血12時間後にコルチ器を採取した。sham op群ではTUNEL

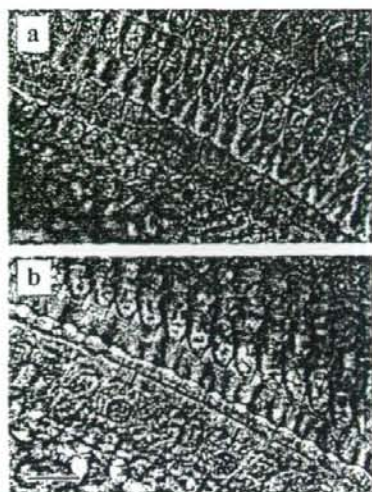


図3 内毛細胞のTUNEL染色像

- (a) sham op群ではTUNEL陽性細胞は見られなかった。  
 (b) 虚血群では内毛細胞が散在的にTUNEL染色陽性を示した。(scale bar: 10 $\mu$ m)

陽性細胞は認められなかったが(図3a)、虚血群では内毛細胞にTUNEL染色陽性細胞が散在性に認められた(図3b)。TUNEL陽性細胞の割合は $6.6 \pm 1.7\%$ であった。

### 3. TEMによる観察

虚血12時間後にコルチ器を採取しTEMによる観察を行った。sham op群では、内毛細胞の核の形態は正常であった(図4a)。一方、虚血群ではミトコンドリアやゴルジ装置などの細胞内小器官は比較的正常な形態を保っていたが、クロマチンの網状構造を失った核は凝縮し、辺縁部にくびれが見られた(図4b)。その他の核の形態もHoechst 33342による蛍光染色の所見と同様に凝縮や分裂が観察された(図4 c, d)。

### 考 察

本研究では、一過性虚血による内耳障害の過程にアポトーシスがどのように関与するかを組織学的に検討した。その結果、Hoechst33342による蛍光染色で内毛細胞にアポトーシスの形態学的特徴とされる核の凝縮が認められた。このようなアポトーシス細胞の割合は虚血—再灌流12時間後にピークに達し、2日後まで認められた。この結果は虚血が疑われる急性難聴の治療を考える上で重要な所見であり、発症2日以内が内毛細胞障害に対する治療の窓(therapeutic time window)ということになる。

内毛細胞の障害メカニズムにアポトーシスが関

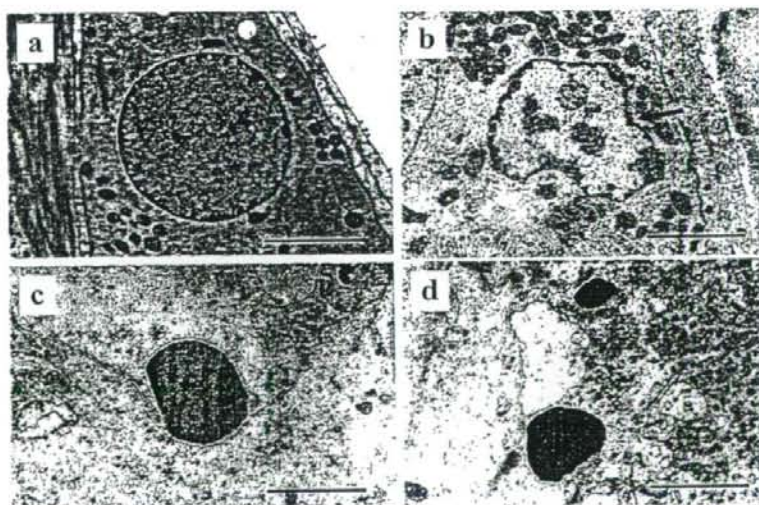


図4 内毛細胞の透過型電子顕微鏡像

- (a) sham op群では内毛細胞の核の形態は正常であった。(b) 虚血12時間後、核は凝縮し辺縁部はくびれていた(矢印)。また、高度に凝縮した核(c)や分裂した核(d)も認めた。scale bars: (a)と(b) 2.5 $\mu$ m, (c)と(d) 1 $\mu$ m。