

ドメインから形成されている。そして、それらのコンビネーションにより感覚細胞周囲の緻密な構造が形成されバリアーとしての役割を果たしており、water homeostasisが保たれていると思われる。

[参考文献]

Distinct subdomain organization and molecular composition of a tight junction with adherens junction features. Nunes FD et al. J Cell Sci. 2006 Dec ;4819-4827.

5. マウス内耳における TRP の発現

工田昌也, 平川勝洋 (広島大)

[はじめに]

trp 遺伝子は、1989年にショウジョウバエにおける眼の光受容器異常変異体の原因遺伝子として同定された。trp 変異株では、光応答性が一過性で細胞外からの Ca^{2+} 流入が減弱する。このことに由来して transient receptor potential (TRP) と命名された。その後、TRP タンパク質は6回の膜貫通領域を有する Ca^{2+} 透過性の高いチャネルであることが明らかとなり、電位作動性の K^+ チャネルと類似して4量体で機能的なチャネルを形成すると考えられている。現在、TRP スーパーファミリーは、哺乳類では TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML の6つのサブファミリーに大きく分けられている。TRP チャネルは個々のチャネルの活性メカニズムはかなり異なるものの、化学物質受容、温度受容をはじめとして広く cell sensor として機能することが明らかになっている¹⁾。内耳においても最近 TRPV²⁾、TRPA³⁾ の存在が確認され、様々な役割を持つことが明らかになってきている。今回、我々は内耳での TRP チャネルの働きを解明するために、28個すべてのマウス内耳での局在を免疫組織学的に解析しその役割について検討を加えた。

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常の CBA/J マウス、8週齢 (体重約20g) を使用した。動物はネブタールによる深麻酔下に4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、断頭、側頭骨を摘出した。試料は EDTA にて脱灰後、4 μ m の厚さで凍結切片を作製、各種抗 TRP 抗体を用いて、免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。

[結果]

TRPV

蝸牛側壁では、血管条に TRPV2, 4, 5, 6 の局在が認められた。コルチ器では感覚細胞に TRPV1, 2, 3, 4, 5、支持細胞に TRPV1, 2, 3, 4, 6 の局在が認められた。蝸牛神経節では TRPV1, 2, 3, 4, 5, 6 が神経節細胞に認められた。

前庭器では前庭感覚細胞に TRPV1, 2, 3, 4, 5, 6、暗細胞に TRPV2, 4, 5, 6、前庭神経節に TRPV1, 2, 3, 4, 5, 6 の局在が認められた。

TRPM, TRPA1

蝸牛側壁では、血管条に TRPM1, 2, 3, 6, 7、ラセン隆起に TRPM1, 2, 6, 7、ラセン靭帯に TRPM1, 2, 6, 7 の局在が認められた。コルチ器では感覚細胞に TRPM1, 2, 3, 6, 7, 8、支持細胞に TRPM1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 の局在が認められた。蝸牛神経節では TRPM1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 が神経節細胞に認められた。また、蝸牛神経には TRPM8 が強く発現していた。

前庭器では前庭感覚細胞に TRPM1, 2, 3, 4, 6, 7, 8、暗細胞に TRPM1, 3, 6, 7、前庭神経節に TRPM1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 の局在が認められた。

TRPA1 は蝸牛、前庭の神経に強い局在を認めたが、神経節細胞には認められなかった。

TRPC

蝸牛側壁では、TRPC3, 4, 5, 7 は血管条での発現が強く、TRPC1, 2, 6 は血管条、ラセン隆起、ラセン靭帯に局在が認められた。コルチ器では感覚細胞に、蝸牛神経節では神経節細胞に全ての TRPC の発現が認められた。また、蝸牛神経には TRPM8 が強く発現していた。前庭器では前庭感覚細胞、前庭神経節細胞に全ての TRPC の発現が認められ、前庭暗細胞に TRPC1, 3, 4, 5, 6, 7 の局在が認められた。

TRPML

TRPMLの局在はTRPML1-3ではほぼ同一であり、血管条、内外有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経節に認められ、前庭器では感覚細胞、暗細胞、前庭神経節細胞で認められた。

TRPP

TRPP2は蝸牛側壁で僅かな発現が認められ、コルチ器支持細胞、蝸牛神経節で発現が認められた。TRPP3は主に血管条、蝸牛神経節で発現が認められた。TRPP5は蝸牛神経節で弱い発現が認められるのみであった。前庭器では感覚細胞でTRPP2, 3の発現が認められ、前庭神経節ではTRPP2, 3の発現が認められた。(表)

[考察]

これまでの研究から内耳には各種のTRPチャンネルが存在することが報告されており、近年その機能についてもかなりのことがわかってきている^{2,3)}。中でもTRPVについては主としてTRPV1-3が感覚細胞の興奮伝達機構に関与し、TRPV4 (TRPV2)が内耳での水、イオンの恒常性の維持や感覚細胞での浸透圧受容に関わることが示唆されている²⁾。今回、これらに加えて内耳での他のTRPチャンネルの局在を検討した結果、内耳には殆ど全てのTRPチャンネルが発現しており、それぞれ様々な機能に関連していることが推察された。その主な役割として、TRPV5, 6は内耳でのCa²⁺の再吸収に関与し^{4,5)}、TRPMについてはTRPM3, 6, 7が水分や内リンパの恒常性の維持に、TRPM2, 3, 4, 6, 7, 8が感覚細胞の受容機構に、TRPM2, 7が細胞障害に関与し、TRPM8, TRPA1は特に感覚細胞からの神経伝達に関与すると考えられた⁶⁾。また、TRPCについてはTRPC3が外有毛細胞の運動性に関与することも報告されており⁷⁾、TRPC1-7の殆どがほぼ似た分布形式をとることから内耳での感覚細胞の興奮伝達に関与することが推察された。TRPMLについてはTRPML3の異常が難聴や前庭機能障害を引き起こすことが知られていること⁸⁾、TRPML1, TRPML2の分布がTRPML3と同一であることより、主としてTRPML3が感覚細胞の発生、興奮伝達、内耳での水、イオンの恒常性の維持にTRPML1, TRPML2と共同して働くと考えられた。TRPPに関してはTRPP3が内耳での内リンパの恒常性の維持に関与していることが考えられた⁹⁾。さらに今回の結果から内耳では感覚細胞を始めとして様々な領域で複数のTRPチャンネルが発現しており、例えば温度感受性チャンネルとしてのTRPV1-4, TRPM8, TRPA1などは神経節細胞や神経には全てが発現しており、細胞容積の変化を感受するTRPV4, TRPM3, TRPP3などは血管条に共存している。すなわち類似した機能を持つTRPチャンネルが複数存在していることは内耳での機能を複数で担っていることを示し、ひとつが欠損したとしても大きな機能障害が生じないようにしているという機構の存在が示唆された。今後は各チャンネルのknockoutマウスの研究と共に複数のチャンネルのknockoutマウスを用いた研究が必要と考えられた。

[結論]

マウス内耳におけるTRPチャンネルの局在を検討した結果、内耳では殆ど全てのTRPチャンネルが発現しており、それぞれ様々な機能に関連していることが推察された。

[参考文献]

1. Venkatachalam K, Montell K. TRP channels. *Annu Rev Biochem* 2007; 76: 387-417.
2. Ishibashi T, Takumida M, Akagi N, Hirakawa K, Anniko M. Expression of transient receptor potential vanilloid (TRPV) 1, 2, 3 and 4 in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol* 2008; 128: 1286-93.
3. Cuaungco MP, Grimm C, Heller S. TRP channels as candidates for hearing and balance abnormalities in vertebrate. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1772: 1033-7.
4. Nakaya K, Harbidge DG, Wangemann P, Schultz BD, Green ED, Wall SM, Marcus DC. Lack of pendrin HCO₃⁻ transport elevates vestibular endolymphatic [Ca²⁺] by inhibition of acid-sensitive TRPV5 and TRPV6 channels. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1314-21.

5. Wangemann P, Nakaya K, Wu T, Maganti RJ, Itza EM, Sanneman JD, Harbidge DG, Billings S, Marcus DC. Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: F1345-53.
6. Takumida M, Ishibashi T, Hamamoto T, Hirakawa K, Anniko M. Expression of transient receptor potential channel melastin (TRMP) 1-8 and TRPA1 (ankyrin) in mouse inner ear. *Acta Otolaryngol* 2009; in press.
7. Raybould NP, Jagger DJ, Kanijan R, Greenwood D, Laslo P, Hoya N, Soeller C, Cannell MB, Housley GD. TRPC-like conductance mediates restoration of intracellular Ca²⁺ in cochlear outer hair cells in the guinea pig and rat. *J Physiol* 2007; 579: 101-13.
8. Nagata K, Zheng L, Madathany T, Castiglioni AJ, Bartles JR, Garcia-Añoveros J. The varitint-waddler (Va) deafness mutation in TRPML generates constitutive, inward rectifying currents and causes cell degeneration. *PNAS* 2008; 105: 353-8.
9. Shimizu T, Janssens A, Voets T, Nilius B. Regulation of the murine TRPP3 channel by voltage, pH, and changes in cell volume. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* 2009, in press

表：マウス内耳でのTRPチャネルの発現

		cochlea					spiral ganglion		vestibular endorgan			vestibular ganglion	
		SV	SP	SL	HC	SC	SGC	SGN	VHC	DC	sNF	VGC	VGN
TRPV	TRPV1	-	-	-	++	+	++	+	++	-	+	++	+
	TRPV2	±	-	-	++	+	++	+	++	±	+	++	+
	TRPV3	-	-	-	++	+	++	+	+	-	+	++	+
	TRPV4	+++	-	-	++	+	+	-	++	+++	-	+	-
	TRPV5	++	++	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+
	TRPV6	++	++	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+
TRPM	TRPM1	+++	+++	++	++	+	+++	-	++	+	-	++	-
	TRPM2	++	++	±	++	++	+++	-	+	-	-	++	+
	TRPM3	++	-	-	+	+	++	-	+	+	-	++	-
	TRPM4	±	-	-	±	+	±	-	+	-	-	+	-
	TRPM5	-	-	-	-	+	±	-	±	-	+	±	-
	TRPM6	+	+	+	++	++	++	-	++	++	-	++	-
	TRPM7	++	+	±	++	++	++	-	++	+	-	++	-
	TRPM8	±	±	+	+	±	+	++	+	-	++	++	++
TRPA	TRPA1	±	-	-	-	-	-	++	+	-	+++	+	++
TRPC	TRPC1	+	+	+	++	+	+++	+++	++	+	+	++	+
	TRPC2	+	+	+	++	+	++	++	+	-	-	++	+
	TRPC3	++	+	+	++	++	+++	+++	++	++	-	++	+
	TRPC4	++	+	+	++	+	++	+	++	++	-	++	+
	TRPC5	++	+	+	+	++	++	+	++	++	+	++	-
	TRPC6	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	-
	TRPC7	++	+	+	++	+	++	++	+	+	+	++	+
TRPML	TRPML1	++	+	+	++	+	++	+	+	+	+	++	+
	TRPML2	++	+	+	++	+	++	+	++	+	+	++	+
	TRPML3	++	+	+	++	+	++	+	++	+	+	++	+
TRPP	TRPP2	-	-	-	-	+	++	+	++	+	-	++	-
	TRPP3	++	-	-	+	+	+	+	±	-	-	+	-
	TRPP4	-	-	-	-	-	+	±	±	-	-	±	-
	TRPP5	-	-	-	-	-	+	±	±	-	-	±	-

SV: stria vascularis; SP: spiral prominence; SL: spiral ligament; HC: cochlear hair cell; SC: cochlear supporting cell; SGC: spiral ganglion cell; SGN: nerve fiber of the SGC; VHC: vestibular sensory cell; DC: dark cell; sNF: subepithelial nerve fiber; VGC: vestibular ganglion cell; VGN: nerve fiber of the VGC

6. メニエール病の動物モデル

工田昌也, 平川勝洋 (広島大)

[はじめに]

メニエール病の動物モデルとしては現在、内リンパ囊(管)閉塞モデル動物が最も一般的に用いられており、このモデルを用いてメニエール病の病態や治療に関して様々な検討が行われてきた^{1,2)}。しかし、このモデルは効率的に内リンパ水腫を作製することができ、低音域の難聴を生じるものの、メニエール病に最も特徴的な一過性めまい発作は出現せず、メニエール病の病態を十分に再現しているとは言いがたい³⁾。メニエール病の動物モデルとしては内リンパ囊閉塞モデルの他に、能動的な内リンパ水腫モデル⁴⁾、免疫反応を利用した内リンパ水腫モデル⁵⁾、二相性モデル⁶⁾、など様々なモデルが存在するが、いずれのモデルもめまい発作の反復というメニエール病の病態の再現については不十分であるのが現状である。これらのことを踏まえて、我々は、メニエール病のより適切な動物モデルとして、内リンパ囊自体に手術的操作を加えずに内リンパ水腫を作製し、しかも可逆的な平衡機能障害の出現を示すような動物モデルを開発し⁷⁾、メニエール病でのめまい発作の発現に必要な条件についての検討を加えた。

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常、8週齢のCBA/Jマウスを使用した。モデル動物の作製には左耳に大腸菌由来リポポリサッカライド(LPS) 1mgを経鼓膜的に1日1回、アルドステロン100 μ g/100g(体重)を腹腔内に1日1回、5日間連日投与した。動物は薬剤の最終投与終了1日後に左耳に1:10,000エピネフリン、または3%ソジウムニトロプルシド(SNP)を経鼓膜的に鼓室内投与し、エピネフリン投与群では2時間後、SNP投与群では1時間後に深麻酔下に断頭、側頭骨を摘出、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、EDTAで脱灰、エタノール系列にて脱水後、水溶性レジン(JB-4[®])にて包埋した。その後、通常の方法で切片を作製し、光学顕微鏡にて形態学的観察を行なった。

[結果]

モデル動物にエピネフリンを投与したものではエピネフリン投与側への偏倚傾向、薬剤投与耳と反対側に向かう眼振が認められたが、SNP投与群ではこのような変化は認められなかった。

今回開発したモデル動物は蝸牛に軽度から中等度の内リンパ水腫の発現を認め、回転別では上方回転でより強い傾向にあった。内リンパ囊の観察では内リンパ腔の大きさは正常～拡大まで様々であったが、上皮細胞は円柱形でLISの拡張も認められた。

モデル動物にエピネフリンを投与した群では、血管条の細胞間隙は拡大し、空胞形成が認められ、ライスネル膜には著明な皺襞形成が認められた。SNP投与群ではこのような変化は殆ど認められなかった。内リンパ水腫の程度とライスネル膜の長さの変化の計測では、エピネフリン投与群で内リンパ水腫の程度が有意に減少していたが、ライスネル膜の長さには変化がなく、SNP投与群では内リンパ水腫の程度、ライスネル膜の長さのいずれにも変化は認められなかった。(図1)

モデル動物およびSNP投与群では前庭器に内リンパ水腫は殆ど認められなかったが、エピネフリン投与群では内リンパ腔の軽度の拡大が認められた。(図2)

内リンパ囊ではエピネフリン投与群で内リンパ腔の軽度の拡張とgranular cellの出現が認められたがSNP投与群では内リンパ腔の拡大や狭小化は認められなかった。

[考察]

内リンパ水腫は内リンパの吸収障害や、内リンパの産生過剰、あるいはその両者によって引き起こされるが、モルモット内リンパ嚢、内リンパ管の閉塞により高率に内リンパ水腫が発生することが報告されて以来¹⁾、内リンパ嚢閉塞モデルは現在、代表的なメニエール病の動物モデルとして広く利用されている。一方、内リンパの分泌過剰による内リンパ水腫として中央階へのコレラ毒素の注入やアルドステロン、バソプレッシンの全身投与により内リンパ水腫が発生することもよく知られている^{2,3,6)}。これらの動物モデルの特徴として、内リンパ水腫、聴力障害は程度の差はあれ、すべてのモデルで出現するものの、メニエール病の第一の特徴であるめまい発作は殆ど出現しないということがあげられる。今回開発したモデルは内リンパ水腫の作製に、内リンパの分泌過剰と吸収障害の両者を用いており、エピネフリンの投与により一過性の平衡機能異常が生じ、メニエール病の病態の再現により適していると考えられる⁷⁾。このモデル動物を用いてメニエール病のめまい発作発現機序を検討した結果、エピネフリン投与により、蝸牛では内リンパ腔容積の減少、前庭では一過性内リンパ水腫の形成が生じることが明らかとなった。このような変化は SNP 投与群では認められなかった。正常動物では内耳血流はエピネフリン投与で減少し、SNP 投与で増加するが、内耳血流低下に際しては、内リンパ圧や量の相対的低下が生じ、それを代償するために内リンパ嚢の狭小化、stable substance の出現が起こり、内耳血流増加の際には内リンパ圧や量が相対的に増加し、それを代償するために内リンパ腔が拡大するといった代償機構が働いている⁸⁾。しかし、我々のモデル動物ではこの代償がうまく働かず、内耳血流が低下したときに前庭器で一過性的内リンパ腔の拡大が起こり平衡障害が生じることが推察された。これまでの研究^{2,3)}からは、内リンパ水腫が存在するのみではめまい発作は生じないと考えられており、側頭骨病理所見でも必ずしもすべてのメニエール病患者で内リンパ水腫が認められるわけではなく、反対に、内リンパ水腫が生じているにもかかわらずメニエール病の症状がないものも報告されている⁹⁾。実際、メニエール病患者は常にめまいを起こしているわけではなくストレスなどを契機として発作性にめまいを生じる。

以上のことからメニエール病の病態を考えると炎症、免疫反応、内リンパ嚢形成不全など、様々な原因からの内リンパ嚢での内リンパ液吸収不全や、ストレスによる内リンパの過剰産生などで内リンパ水腫が形成される。この状態のみではめまい発作は生じないものの、内リンパ圧の急激な変化、内耳血流の障害、膜迷路の破裂、透過性の亢進などの新たなストレスが加わることによりめまい発作を引き起こすというメカニズムが推察された。

[結論]

新しく開発したメニエール病モデル動物の検討からメニエール病のめまい発作は内リンパ水腫に加えて、内リンパ圧の急激な変化、内耳血流の障害、膜迷路の破裂、透過性の亢進などの新たなストレスが加わることにより引き起こされることが推察された。

[参考文献]

1. Kimura RS, Schuknecht H. Membranous hydrops in the inner ear of the guinea pig after the obliteration of the endolymphatic sac. *Pract Otorhinolaryngol* 1965; 27: 343-54.
2. Kimura RS. Animal models of endolymphatic hydrops. *Am J Otolaryngol* 1982; 3: 447-51.
3. Gates GA: Meniere's Disease review 2005. *J AM Acad Audiol* 2006; 17:16-26.
4. Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res* 2000; 140: 1-6.
5. Tomiyama S. Development of endolymphatic hydrops following immune response in the endolymphatic sac of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 1145-8.

6. Dunninger EA, Segenhout JM, Wit HP, Albers FWJ. Two-phase endolymphatic hydrops: a new dynamic guinea pig model. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 117:13-19.
7. Takumida M, Akagi N, Anniko M. A new animal model for Meniere's disease. *Acta otolaryngol*
8. Akagi N, Takumida M, Anniko M. Effect of inner ear blood flow changes on the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol* 2008; 128:1187-95.
9. Paparella MM. Pathogenesis and pathophysiology of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1991; Suppl 485: 26-35.

図1：モデル動物の蝸牛の変化

a:モデル動物では蝸牛に内リンパ水腫が認められる。b:モデル動物にエピネフリンを投与したものではライスネル膜の皺壁形成が認められる (↑) c:モデル動物に SNP を投与したものでは変化は認められない。

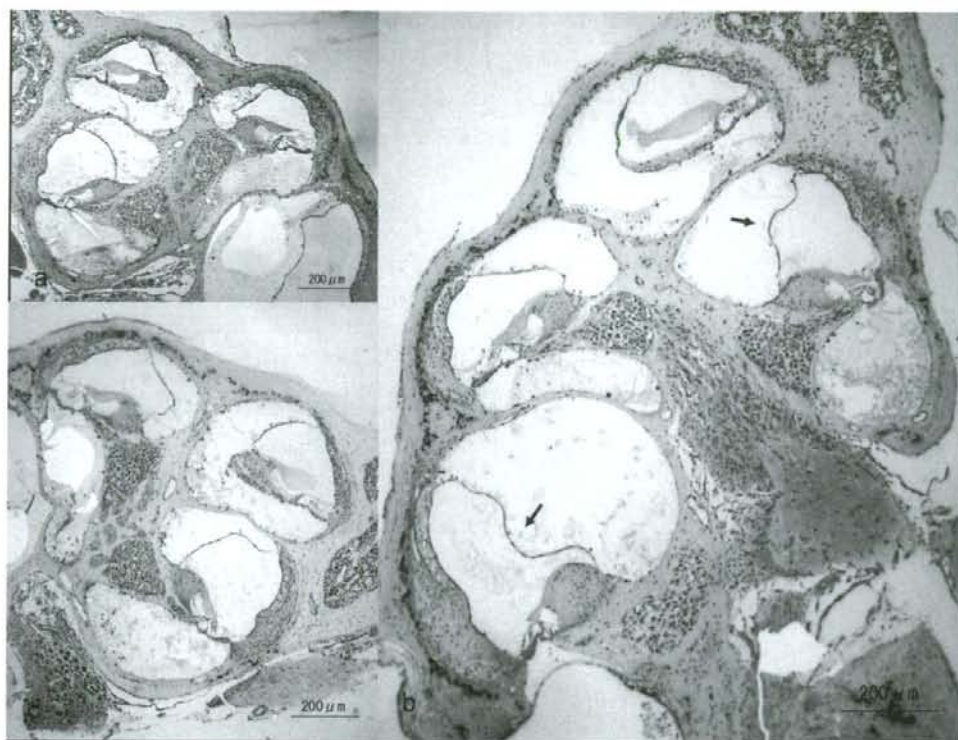
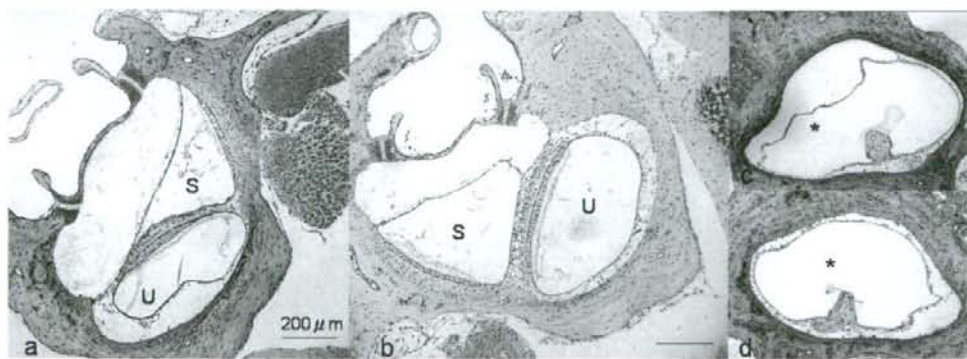


図2：モデル動物の蝸牛の変化

a:モデル動物の前庭器では内リンパ水腫は認められない。S: 球形囊、U: 卵形囊、b:モデル動物にエピネフリンを投与したものでは内リンパ腔の拡大が認められる (↑) c:モデル動物の半規管には内リンパ水腫は認められない (*)。 d:モデル動物にエピネフリンを投与したものでは内リンパ腔の拡大が認められる (*)



7. 耳毒性薬剤によるクブラの変化 —半規管感覚上皮障害との比較検討—

許斐氏元, 鈴木 衛, 大塚康司, 稲垣太郎, 長谷川剛, 清水重敬, 河口幸江 (東京医大)

[はじめに]

内耳への耳毒性薬剤の影響はアミノ配糖体系抗生物質を使った蝸牛や前庭における感覚細胞の障害を中心に多数報告されている。しかし、クブラは脆弱で形態学的評価が困難なこともあり、その障害についての報告はきわめて少ない。これまで我々はクブラを墨汁で染色してその形態や膨大部内での動きを観察してきた

(1、2)。クブラが障害されると半規管の反応性が変化し、末梢性めまいの原因になることが予想される。今回、ゲンタマイシン (GM) を内耳内へ注入し、クブラの形態変化を半規管膨大部感覚上皮の変化と比較検討した。

[対象と方法]

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) を用いた。エーテル麻酔後、開口して耳管内側の口蓋粘膜に小切開を加えた。粘膜を剥離して内耳骨包を露出させ、球形嚢を指標として微細シリンジを刺入し、外リンパ腔に GM300 μg (7.5 μl) を注入した。生食 7.5 μl を注入した群を対照とした。

1) クブラの観察

GM 処置後、一定期間 (3 日後、7 日後、14 日後の 3 群、各群 10 匹) 後に深麻酔後断頭し、リンゲル液の中で後半規管のクブラを摘出した。摘出したクブラは墨汁で染色した後、実体顕微鏡で観察した。クブラの変化は表 1 のように Grade 1~4 の 4 段階で評価した。

2) 感覚上皮の観察

クブラ除去後の後半規管膨大部感覚上皮は速やかに 2.5% グルタルアルデヒド液内で固定し、1% オスミウムで導電染色を施した。エタノール上昇系列で脱水、酢酸イソアミルで置換後に CO₂ 臨界点乾燥を行った。白金パラジウムによるイオンスパッタコーティング後、走査電子顕微鏡 (HITACHI S-800, 以下 SEM) で感覚上皮を観察した。感覚上皮の変化は表 1 のように Grade 1~4 の 4 段階で評価した。

GM 処置した各群において、クブラと膨大部感覚上皮の形態変化を比較検討した。

[結果]

クブラは GM 処置により種々の変化を呈した。クブラの主な変化は頂部 (膨大部頂部側) を含む辺縁からの収縮であった (図 1)。

1. GM 処置 3 日後の変化 (表 2)

全 10 例中 7 例ではクブラの変化が乏しく Grade 1 であった。クブラの明らかな変化は 3 例でみられ、いずれも Grade 4 でクブラは消失していた。これらは感覚上皮障害も高度であった。Grade 2 以上の感覚上皮障害はすでに 7 例でみられた。

2. GM 処置 7 日後の変化 (表 3)

クブラと感覚上皮の障害がともに Grade 2 以下の軽度変化例が 10 例中 5 例であった (図 2)。その他、クブラ障害が高度な例は感覚上皮変化が軽度、感覚上皮障害が高度な例はクブラ障害が軽度と、クブラ変化と感覚上皮障害が解離した。GM 処置 3 日後と比べて感覚上皮障害が高度になる傾向はなかった。

3. GM 処置 14 日後の変化 (表 4)

クブラと感覚上皮障害がともに Grade 2 以下の軽度変化例は 2 匹にとどまった。クブラと感覚上皮障害が

ともに Grade 3 以上に障害されたものが 3 例みられ、クブラと感覚上皮の障害が解離した例が 4 例あった (図 3)。Grade 2 以上のクブラ変化例は 7 例に増加した。

4. GM 処置 7~14 日後の変化 (表 5)

GM 投与 7 日と 14 日の資料をあわせた全 20 匹のうち、クブラに Grade 2 以上の変化がみられたのは 11 例で 55% であった。Grade 2 以上の感覚上皮障害は 14 匹で観察され、クブラよりも感覚上皮の方が変化しやすい傾向があった。クブラと感覚上皮で並行して障害が進むものが 3 日後と比べ増加していた。

5. 生食処置の対照群

6 例全例でクブラ、感覚上皮とも正常所見であった。

[考察]

耳毒性薬剤が内耳に与える影響については、蝸牛を中心に多くの研究がある。しかし、そのほとんどが感覚細胞を観察したもので、クブラなど付属器の変化についての報告は少ない。蝸牛の付属器としての蓋膜の障害については報告されており、難聴の原因になると考えられている。音響外傷や、Connexin 26 mutation、DFN8/12 family、 β -tectorin mutation などによる蓋膜の有毛細胞からの解離、rolling-up 現象、膠原線維障害などが報告されている (3-5)。前庭では、耳石、耳石膜、平衡斑についての研究があるが、クブラについてはほとんど報告がない。しかしながら、クブラの形態的脆弱性を考えると高度の変化が予測される。今回我々は、内耳に GM を注入し、クブラと半規管感覚上皮の形態変化を観察したが、その結果、感覚細胞障害のみならずクブラにも縮小などの変化が起きることが判った。

クブラは膨大部稜側 (以下、底部と略す) から頂部に向かう小管状構造と、その間を結ぶネット状構造から成る (6, 7)。その間質は膨大部支持細胞から分泌されるムコ多糖体で埋められている (8)。また、底部下面には無数の小孔がみられ、ここに感覚毛が入りこんでいる。今回の検討で、GM 内耳内注入によってクブラは常にその頂部、辺縁から縮小し、底部は残存した (図 1)。これは、クブラを墨汁染色すると膨大部頂部を墨汁が通過することで容易に確認できた。クブラはその底部から代謝され維持されるといわれるが、これは耳石器と同様の機構で、支持細胞がムコ多糖体を分泌しクブラに供給しているとされる (9)。今回の検討で、クブラが頂部から縮小し底部が残ったのはこのためと考えられる。

クブラが縮小するとその運動様式も変化することが予想される。正常クブラは膨大部を遮断するように存在し、頭部回転などによる生理的内リンパ流動では、クブラ底部が動き、流動量の増加に伴いクブラの中央が動いて diaphragma 様運動となる (10-12)。さらに、非生理的な強い力が加わるとクブラ頂部の接着が解離して swing-door 様運動になる (13, 14)。クブラが軽度縮小した状態では、膨大部壁とクブラ間に間隙が生じる。この状態では、内リンパ流動が間隙を通過するため内リンパ流動に対する感受性は低下する (15) (図 4)。この状態では、カロリックテストは半規管麻痺の結果になると予想される。

クブラが縮小すると swing-door 様運動に変化し、生理的刺激に対する VOR の閾値が上昇するだけでなく反応遅延も生じて、体動時浮遊感などの不安定症状の原因となる可能性がある。また、swing-door 様運動ではクブラ結石症が生じた場合、クブラ可動性の増加によって激しい眼振が起きると推察される。すなわち、カロリックテストでは CP であっても頭位眼振が強く発現することになる (16)。カロリックテストでの CP は従来、感覚細胞や神経の機能低下を示すと考えるのが一般的であった。しかし、今回の検討でクブラ縮小が強く、感覚細胞障害は軽度という例もあったことから、カロリックテストの CP には、従来の感覚上皮や神経の機能低下によるものとクブラの収縮によるものがあると考えられる。

さらに、クブラが縮小したとすると半規管遮断術無効の原因も説明できる。半規管遮断術は難治性 BPPV の多くをコントロールできる有用な方法の一つ (17) であるが、中には無効例も存在する (16)。手術により半規管遠位端を遮断しても、クブラの縮小で遮断部位とクブラ間の閉鎖空間効果が消失し、swing-door 様運動でクブラ結石症の眼振が持続することになる。また、メニエール病において内リンパ水腫で膨大部壁が伸

展すればクブラと壁に間隙が生じ、めまいの病像や検査所見に影響を与えることが考えられる。このように、クブラ自体あるいは周辺に形態的变化が起こると BPPV やメニエール病の病態や臨床像がより複雑で多様となる。また、明らかな眼振がない体動時の浮動性めまいや、臨床原因不明とされてきた眼振を説明できる可能性もあり、クブラ異常を考慮しためまい診断が重要になると考えた。

GM 処置後のクブラと膨大部感覚上皮の障害結果を比較すると、処置 3 日後ではクブラは正常で、感覚上皮が中等度まで障害されている例が 70% と多かった。感覚上皮の変化は有毛細胞の癒合や球状化が多く、脱落前の変化過程にあると思われた。GM 処置後 7 日、14 日後の群ではこれら変性過程の有毛細胞はほとんどみられなかった。クブラ障害は Grade 4 が 30% あり、すべてクブラは消失しており感覚上皮障害も伴っていた。多くがクブラ正常である中で感覚上皮に高度障害がみられたことは、クブラより感覚上皮が障害を受けやすいことを示している。GM 処置 7 日後では、クブラに軽度の障害例がみられ、これらはクブラが徐々に変化したものと考えた。クブラと感覚上皮の障害が Grade 1 と Grade 4 に解離する例が 40% あった。GM 処置 14 日後では、感覚上皮障害も Grade 4 が 50% と増加し、これらの 80% がクブラ変化を伴っていた。クブラと感覚上皮が共に高度に障害される例が多かったが、解離している例も 30% あった。このような感覚細胞障害にクブラの障害が伴わない例があったことは予想と異なる結果であった。

GM による感覚上皮障害性は、I 型細胞が最も受傷性が高く、ついで II 型細胞、支持細胞の順とされている (18)。ウシガエルには II 型細胞のみ存在するが、クブラ障害がその維持に強く関わる支持細胞の障害によって生じていると考え、GM に対する易傷性は変化が起きた例数において感覚細胞、支持細胞で同等であった。感覚上皮の維持には、それらを取り巻く細胞環境が相互に関係している可能性があり、クブラの代謝にも支持細胞のみでなく、その周囲の細胞環境やイオン環境も影響する。また、感覚細胞も支持細胞の産生するムコ多糖体で保護されている。徐々に支持細胞の変性が強くなると、感覚細胞を保護できなくなり感覚細胞の変性消滅が加速したと推察した。クブラと感覚細胞の障害が解離した例がみられたが、クブラが正常で感覚細胞のみ高度に障害されている例では、感覚細胞はクブラの形態維持には寄与しないことが示唆される。また、感覚細胞が正常でクブラのみ高度に障害される例に関しては、クブラが高度変性していても支持細胞が残存している可能性が考えられる。今後は支持細胞の変化も含めて観察する必要がある。また、クブラの再生がどのように起こるかも興味深い点である。

一般に両生類は感覚細胞や末梢神経などの再生能が強く、末梢組織は強靱である (19, 20)。それに比べ哺乳類の末梢組織は脆弱であり、ヒトのクブラは両生類より変化を受けやすいと推測される。今回 GM によって生じた変化から考えて、内耳障害のある状態ではヒトクブラは容易に変化を受けることが想像される。クブラが縮小した状態でのクブラ結石症なども頭位性めまいの病態の一つと考えたい (21)。

今後はクブラ障害時の支持細胞の形態やクブラ再生について検索する予定である。また、感覚器の付属器障害にも注目し、末梢性めまいの病態の一つとして考慮していく必要があると考えている。

【結論】

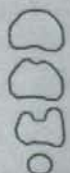
1. GM 内耳内投与後、クブラが辺縁から縮小するのが観察された。
2. GM 処置後 2 週間でクブラの障害が進行した。
3. 感覚細胞の障害が軽度にもかかわらずクブラの変化が高度のように、両者の障害度が相関しない例があった。
4. クブラの形態的变化が BPPV の病態や臨床像を複雑にする可能性が示唆された。
5. クブラの形態変化を考慮し、CP などカロリックテストの意義を再検討する必要がある。

[参考文献]

1. Suzuki M, Harada Y: An experimental study on the frog semicircular canal- functions of cupula and vestibular ganglion. *J Otolaryngol* 14: 36-40. 1985.
2. Suzuki M: Functional physiology of the semicircular canal ampulla. *Biol Sci Space*15: 353-355. 2001.
3. Smolders JW: Functional recovery in the avian ear after hair cell regeneration. *Audiol Neurootol* 4: 286-302. 1999.
4. Jun AI, McGuirt WT, Hinojosa R, Green GE, et al: Temporal bone histopathology in connexin 26-related hearing loss. *Laryngoscope* 110: 269-75. 2000.
5. Plantinga RF, Cremers CWRJ, Huygen PLM, et al: Audiological evaluation of affected members from a Dutch DFNA8/12 (TECTA) family. *J Assoc Res Otolaryngol* 8:1-7. 2007.
6. Harada Y: Surface structure of semicircular ampullae. *Equilibrium Res. Suppl* 4: 53-58. 1972.
7. Lim D. J.: Vestibular sensory organs. *Arch Otorhinolaryngol* 94: 69-76. 1971.
8. Tauber R, Reher K, Helling K, Scherer H: Complex carbohydrates-Structure and function with respect to the glycoconjugate composition of the cupula of the semicircular canals. *Biol Sci Space*15: 362-366. 2001.
9. Igarashi M, Alford B. R.: Cupula, copular zone of otolith membrane, and tectorial membrane in the squirrel monkey. *Arch Otorhinolaryngol* 68: 420-426. 1969.
10. Hillman DE, McLaren JW: Displacement configuration of semicircular canal cupulae. *Neuroscience* 4: 1989-2000, 1979.
11. Suzuki M, Harada Y: Exposure and direct stimulation of the semicircular canal cupula. *Arch Otorhinolaryngol* 241: 141-147. 1985.
12. Suzuki M, Harada Y: An Experimental study on cupular function: mapping of the cupula by direct stimulation. *Arch Otorhinolaryngol* 241: 237-242. 1985.
13. Oman CM, Frishkoph LS, Goldstein MH Jr: Cupula motion in the semicircular canal of the skate, *Raja erinacea*. An experimental investigation. *Acta Otolaryngol* 87: 528-538, 1979.
14. 大塚康司, 鈴木 衛, 古屋正由, 他: 微細刺激によるクブラの偏移の観察. *Equilibrium Res* 64:100-105, 2005.
15. Suzuki M, Harada Y, Kishimoto A: An experimental study on the physical properties of the cupula. Effect of cupular sectioning on the ampullary nerve action potential. *Arch Otorhinolaryngol* 241: 309-316. 1985.
16. 鈴木 衛: めまい治療とEBM. 半規管遮断術. 日耳鼻専門医講習会テキスト 35-39, 2008.
17. Pohl DV: Posterior semicircular canal occlusion for intractable BPPV. *J Vest Res* 6: s-48, 1996
18. Quint E, et al: The effect of explantation and neomycin on hair cells and supporting cells in organotypic cultures of the adult guinea-pig utricle. *Hear Res* 118: 157-167, 1998.
19. Kadir A, Suzuki M, Yajin K, Harada Y: Effect of streptomycin intoxication on vestibular nerve regeneration and posture recovery. *Acta Otolaryngol* 1997; 117: 376-381.
20. Suzuki M, Takahashi H, Yoshida S, et al: Recovery mechanism of postural disturbance after vestibular neurectomy. *ORL* 53: 290-293, 1991.
21. Suzuki M, Kadir A, Takamoto M, Hayashi N: Experimental model of vertigo induced by detached otoconia. *Acta Otolaryngol* 116: 269-272. 1996.

クブラの形態的变化

- Grade 1: 正常形態～中央部の陥凹程度
 Grade 2: 50%の縮小まで
 Grade 3: 51～80%の縮小
 Grade 4: 81%以上の縮小または消失



感覚上皮の障害度(半規管膨大部面積中)

- Grade 1: 障害範囲が20%以下
 Grade 2: 障害範囲が21～50%
 Grade 3: 障害範囲が51～80%
 Grade 4: 障害範囲が81%以上

表1.クブラの形態変化と感覚上皮障害度の評価

Grade	1	2	3	4
1	2	2	3	
2				
3				
4		1	1	1

クブラの変化

N=10

表2. クブラの変化と感覚上皮障害度の関係. GM内耳注入後3日.

感覚上皮の障害度

クブラの変化

Grade	1	2	3	4
1	2	1		3
2	1	1		
3				
4	1	1		

N=10

表3. クブラの変化と感覚上皮障害度の関係. GM内耳注入後7日.

感覚上皮の障害度

クブラの変化

Grade	1	2	3	4
1		1	1	1
2	1			1
3				2
4	2			1

N=10

表4. クブラの変化と感覚上皮障害度の関係. GM内耳注入後14日.

感覚上皮の障害度

クブラの変化

Grade	1	2	3	4
1	2	2	1	4*
2	2	1		1
3				2
4	3*	1		1

N=20

表5. GM内耳注入後7日と14日の群を合計した表. (*はクブラの変化と感覚上皮障害度が解離した例)

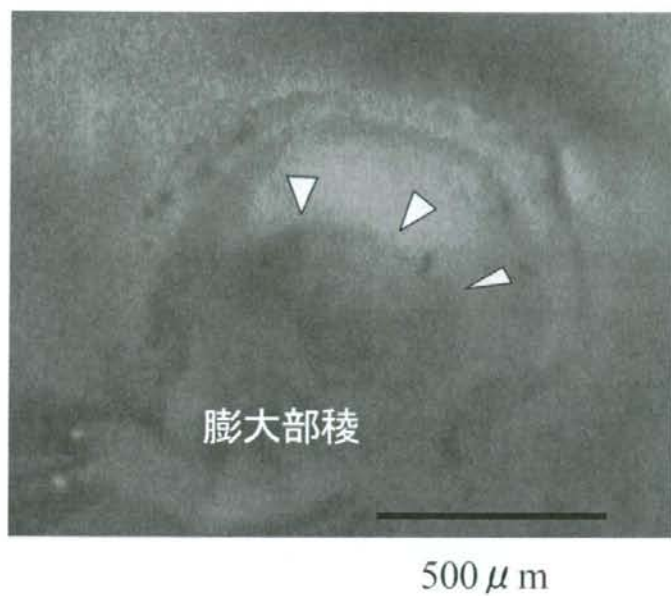


図1. 膨大部頂上部から収縮したクブラ (Grade 3)

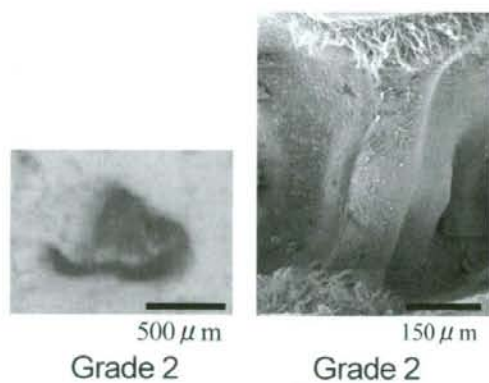


図2. クブラと感覚上皮の障害が軽度の例

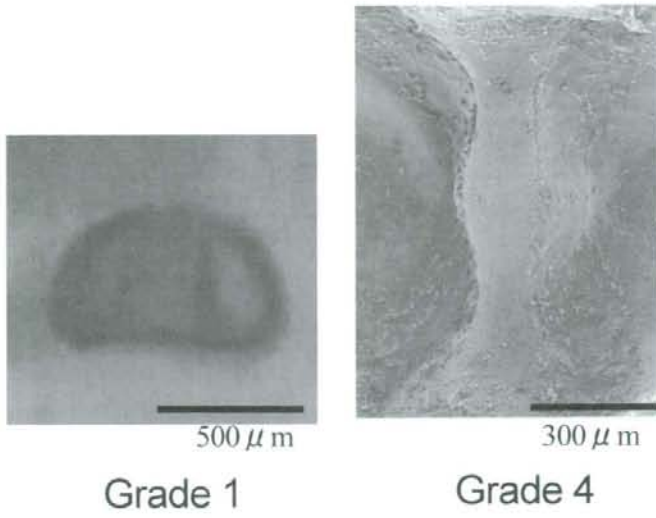


図3. クブラと感覚上皮の障害が解離した例

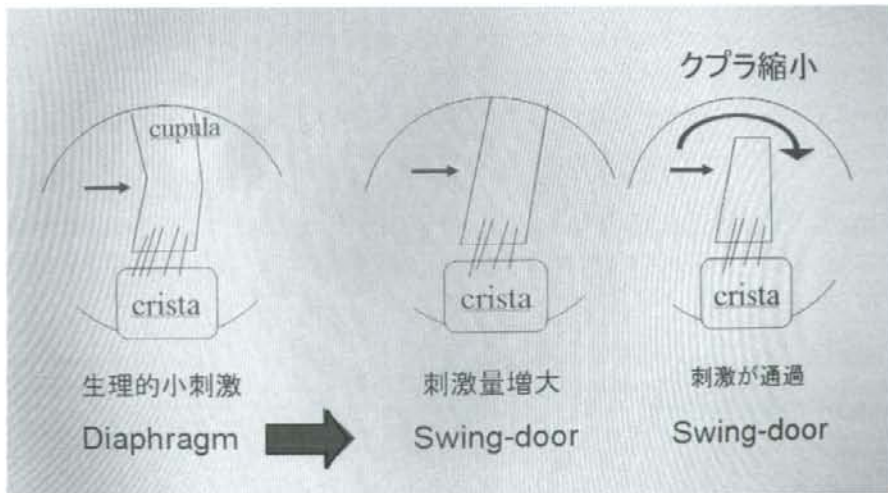


図4. クブラの運動様式

8. ロリプラム一側内耳投与の前庭系へ及ぼす影響

下郡博明, 菅原一真, 橋本 誠, 山下裕司 (山口大)

[はじめに]

これまで我々は、前庭神経系、中でも末梢前庭の可塑性における前庭神経節細胞の役割を、CREB の変化を通して検討してきた。neurogenesis を起こしている細胞には CREB のリン酸化がおこるともいわれており、CREB は神経細胞ニューロン間の恒久的接続を確立するための鍵となる分子である。さらに、海馬においては、マイルドなストレスはリン酸化された CREB (p-CREB) の活性化を引き起こし、神経細胞の突起が増加することも報告されている。我々は、前庭神経節細胞においても CREB のリン酸化を促進させることで可塑性を促進できる可能性を考えている。ロリプラムは抗うつ剤として開発された薬剤で、cAMP を活性化し、プロテインキナーゼA (PKA) を活性化することで核内の CREB のリン酸化を促進させる物質である。しかし、その強い嘔吐という副作用から、臨床薬としては姿を消してしまった。今回我々は、この薬剤を内耳局所投与に用い得る可能性を検討するために、ロリプラムを一側内耳に直接投与することでの前庭系に与える影響を検討したので報告する。

[対象と方法]

ブライエル反射正常、鼓膜正常なハートレイ系白色モルモットの雄を用いた。方法は当科で以前より報告している浸透圧ポンプを用いた薬剤の内耳直接投与手技に準じた。キシラジンとケタラルで全身麻酔を行い、耳後切開後に中耳骨胞を開放した。正円窓下に小孔を作成し、浸透圧ポンプを接続したカテーテルを留置した。浸透圧ポンプは皮下に留置した。術側は全て右耳とした。ロリプラムは、全身麻酔の影響が完全に消失した術後12時間から内耳に投与されるように、生理食塩水を満たしたカテーテルをポンプに接続した。術前と術後12、24時間、3日に振子様回転刺激による VOR の観察を行った。回転刺激は、暗所下に最大角速度60 degree/sec、周期10 sec で3回連続の振子様回転刺激を行った。実験終了時、ネンプタール深麻酔下に、断頭し、側頭骨を摘出後、膜迷路を採取して、外側半器官膨大部、卵形囊の形態学的変化を観察した。

[結果]

術後24時間の時点で、一過性に投与側の VOR gain は低下する傾向を認めたが統計学的に有意な変化ではなかった (図1)。ロリプラム投与により、外側半器官膨大部、卵形囊には、明らかな組織学的変化を認めなかった (図2)

[考察]

ロリプラムは全身投与には用いにくい副作用があるが、内耳局所投与薬剤としては、正常動物に対して、前庭機能的、形態学的に大きな変化をきたさない可能性が示唆された。ロリプラムが、前庭神経節細胞での cAMP-CREB 系の活性化を引き起こすとすれば、末梢前庭障害時に局所投与薬として有効である可能性もあると考えた。

[結論]

正常動物に対して、ロリプラムの内耳局所投与は前庭機能、形態に大きな影響をきたすことは認められなかった。

図1

VOR gainの経時変化

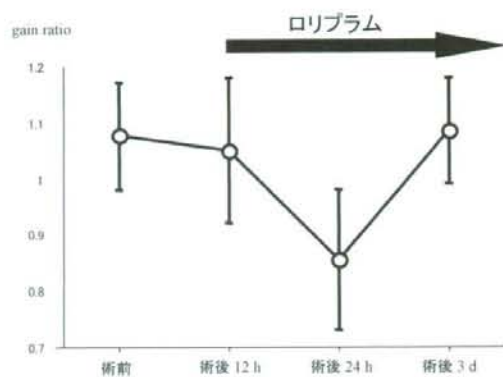
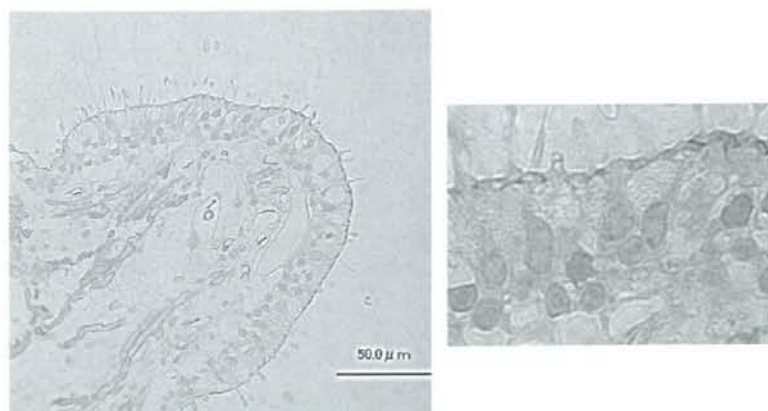


図2

組織学的所見



9. テブレノン経口投与による前庭感覚細胞保護

菅原一真, 御厨剛史, 宮内裕爾, 橋本 誠, 下郡博明, 山下裕司 (山口大)

[はじめに]

熱ショック応答は細胞がストレスに暴露された際に熱ショック蛋白質を高発現し, 細胞を保護する反応である。最近, 胃粘膜保護剤テブレノンが組織に熱ショック応答を誘導し, 保護効果を示すことが注目されている。我々は, 実験動物にテブレノンを経口投与することで, 種々の蝸牛障害が抑制されることを報告してきた^{1,2)}。本研究では, テブレノンの経口投与が前庭感覚細胞を保護できるかどうかについて, 実験動物を用いて検討した。

[対象と方法]

生後4週から6週のCBA/Nマウスを用いた。テブレノン群は4週間, テブレノン0.5%を含む飼料で飼育した。コントロール群は通常の飼料で飼育した。これら2群のマウスを以下の検討に用いた。

1. Hsp70の発現について

側頭骨を摘出し, TRIZOL内で溶解し, mRNAを抽出した。Hsp70 mRNAの発現をRT-PCRにて検討した。

2. 感覚細胞の保護効果について

2群のマウスに対し, ベントバルビタールによる深麻酔下は無菌操作で両側の卵形嚢を摘出し, 培養液(BME/EBSS 2:1%)に浮遊させた。有毛細胞死を誘導するために, 1mMのネオマイシンを加え, 24時間, CO₂インキュベーター内で培養した。培養終了後, 4%パラホルムアルデヒドで固定し, PBSで洗浄した後, シリンジポンプと27Gの注射針による水流にて卵形嚢膜や耳石膜を除去し, 感覚上皮を露出させた。試料を, ブロック液(1%アルブミン, 0.4%正常ヤギ血清, 0.4%正常ウマ血清, 0.4% Triton X-100を含む)に浸した後, 抗カルモデュリン抗体(Sigma, 1:150), 抗カルビンディン抗体(Chemicon, 1:250)に反応させた。2次抗体として, Alexa 488抗マウスIg-G抗体, Alexa 594抗ヤギIg-G抗体を用いて, 感覚細胞を標識した。洗浄後, スライドガラス上に封入し, 蛍光顕微鏡下に単位面積あたりの残存有毛細胞数を評価した。

[結果]

両群のマウス側頭骨におけるHsp70 mRNAの発現を図1に示す。Hsp70 mRNAはコントロール群においても発現を認めたが, テブレノン群において発現が上昇していることが示された。この結果から, テブレノンの経口摂取によって内耳に熱ショック応答が誘導されることが明らかとなった。培養実験では, ネオマイシンによる前庭感覚細胞死にテブレノン経口投与がどのような影響を与えるかについて検討した。有毛細胞を同定するために, 抗カルモデュリン抗体, 抗カルビンディン抗体を用いた二重染色を行った。コントロール群のマウスより摘出した卵形嚢では, 24時間後にカルモデュリン陽性有毛細胞, カルビンディン陽性有毛細胞共に細胞密度が減少していた。一方, テブレノン群のマウスより摘出した卵形嚢では, ほとんどの有毛細胞が残存していた(図2)。

[考察]

生体が外部からのストレスに曝された際, 細胞内には速やかに熱ショック蛋白質群が発現し, 細胞を保護する方向に作用する。この熱ショック応答は熱ショック転写因子(HSF1)に制御されており, HSF1の活性化によって生体の熱ショック応答を誘導できることが明らかになっている。内耳においても熱ショック蛋白質の高発現が内耳を保護し, 発現の調節にHSF1が重要な役割を持つことを報告した³⁾。最近では, 既に臨床に