

性難聴の予後に関連した因子として報告されている表の各項目について酸化ストレス度の正常群と異常群での比較を行なったが、両群間でこれらの項目について統計学的に有意差を認めなかった。

(表2)

考察

今回我々の検討では、突発性難聴症例の多くで酸化ストレス度の異常を認めた。

酸化ストレスと内耳局所の関係については、フリーラジカルにより内耳の有毛細胞が障害されるといった報告や、内耳の急性障害モデル(薬剤や騒音)でフリーラジカルが関与しているということが既に報告されている。また、全身の酸化ストレスを考えた場合、循環障害や免疫力の低下を引き起こす可能性があり、従来から考えられている突発性難聴の原因としての循環障害やウイルス感染を誘発する要因となっている可能性も推測された。

酸化ストレス度と急性感音難聴の関連性についての報告は多くはないが、今回の我々の結果と同様に高値を示したとしている報告もあり、以上のことから突発性難聴の発症期において酸化ストレスが関与している可能性が考えられた。

また今回治療前の酸化ストレス度と治療成績との間に関連性が示唆される結果であった。

当院では治療として従来から行なわれている副腎皮質ステロイドの投与を行なっているが、副腎皮質ステロイドについては抗酸化作用として働くという報告がある一方で、その副作用は過剰な活性酸素種の産生によって生じるという報告もあるのが現状で、今回の結果が副腎皮質ステロイドの作用機序の

関連したものが、あるいは本来の病態の違いによるものなのかは现阶段では不明であり、今後の検討課題と考えられた。

最後に、前述のように治療前の酸化ストレス度と治療成績に関連性が認められたにも関わらず、従来から予後と関連しているとされる臨床像の各項目は酸化ストレス度の異常の有無と関連性を認めなかったことから、治療前の酸化ストレス度が、独立した予後予測因子となりうる可能性があるのではないかと考えられた。

結論

突発性難聴患者において末梢血を用いて酸化ストレス・抗酸化力を測定し、突発性難聴の発症や治療効果に関与している可能性について検討した。

- 1) 突発性難聴患者で酸化ストレス度は高値を示していた。
- 2) 酸化ストレス度の高い患者群で治療成績の良い症例が認められた。
- 3) 治療効果以外の臨床像と酸化ストレス度に関連性が認められなかったことから治療前の酸化ストレス度が予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

今後症例を重ねて上記項目についてのさらなる検討が必要と考えられた。

健康危険情報

なし

研究発表

なし

知的財産権の出願・特許状況

なし

図1. 全症例の酸化ストレス度と抗酸化力の分布

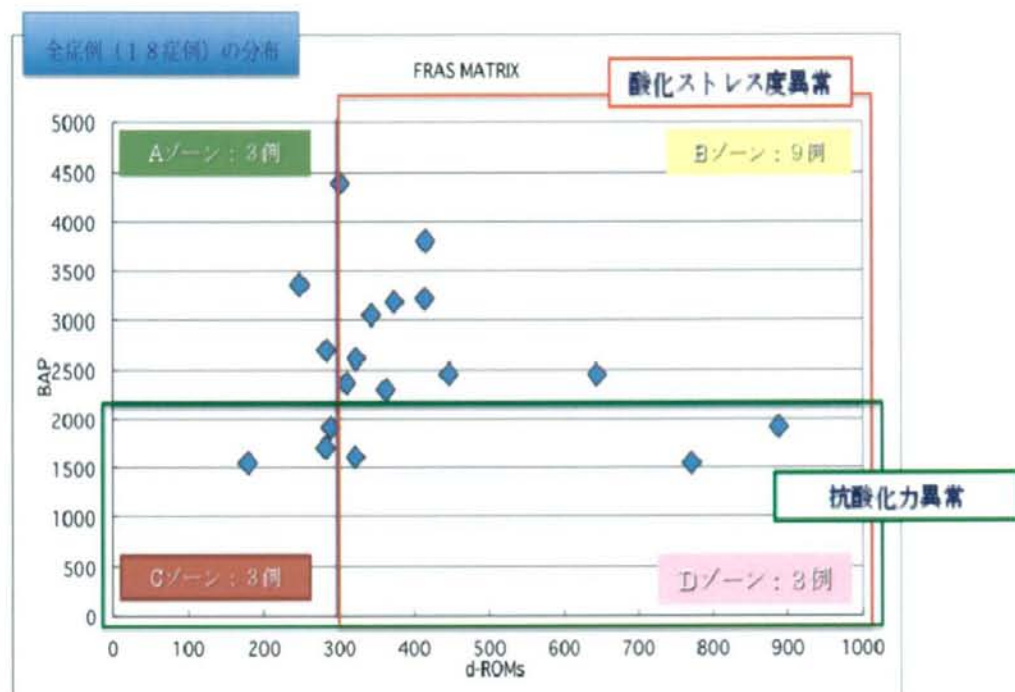


表1. 酸化ストレス度と治療成績 (1984年 厚生省班研究基準を用いて)

		酸化ストレス度		
		正常 (300 以下)	異常 (301 以上)	
治療成績	著明回復以上	0	7	7
	回復以下	6	5	11
		6	12	18

	酸化ストレス度正常	酸化ストレス度異常	P 値
症例数	6	12	-
男女比 (男/女)	4/2	5/7	-
年齢平均 (歳)	60.2	50.475	0.316
初診時聴力平均 (dB/5分法)	74	74.6	0.622
発症から治療までの期間 (日)	4.3	3.5	0.567
めまいの随伴	4/6 (66.6%)	2/12 (16.7%)	0.107

表2. 酸化ストレス度と臨床像の関係

選択的セロトニン再取り込み阻害薬による マウス下丘神経細胞自発発火パターンの変化

分担研究者: 福田 諭 (北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)
共同研究者: 小原修幸 (北海道大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学分野)

研究要旨

中脳下丘は主に聴覚系の求心性神経中継核である。最近、セロトニンが神経調節物質として下丘の神経伝達に関わっているという報告が複数あり、神経細胞レベルではGABA伝達性の抑制性入力を亢進させるとされている。本研究では、その結果を確認し、さらに選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の薬理学的効果についてパッチクランプ法を用いて調べた。その結果、SSRIの投与によってセロトニンの効果はさらに増強し、下丘神経細胞自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) の頻度が増大した。

研究目的

哺乳類の中脳下丘は主に聴覚系の求心性神経中継核であり、下位の神経核から伝達される音の周波数・時間差などの複数の情報を統合している部位と考えられている。下丘へは縫線核群から伸びるセロトニン繊維が分布し、4種類のセロトニン受容体の存在が確認されており (Tomponson et al. 2001)、セロトニンは下丘において神経調節物質として働いていると考えられている。また、ラットの下丘神経細胞からパッチクランプ法を用いて自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を記録すると、セロトニンはGABA作動性ニューロンに作用し、sIPSCの頻度・振幅ともに増強させるという報告がある (Wang et al. 2008)。

本研究では、主にうつ病に対する治療薬であるが、慢性的な耳鳴症状に対して用いられることがある選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の下丘神経細胞に対する薬理作用を検討するため、パッチクランプ法を用いて記録を行った。

研究方法

生後6-12日の近交系マウス (C57BL/6J) から、厚さ400 μ の中脳下丘を含む急性脳スライスを作成し、下丘中心核神経細胞からパッチクランプ法を用いて細胞内記録を行った。脳スライスには酸素化した人工脳脊髄液を灌流し、さらにGABA作動性シナプス伝達のみを記録するため、キヌレン酸 (1mM) とストリニキン (0.5 μ M) を加えた。記録開始から5分後に灌流している人工脳脊髄液にセロトニン (10 μ M)、10分後にマレイン酸フルボキサミン (2 μ M) を加え、自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を記録し、その波形の頻度・振幅について比較した。

研究結果

記録されたsIPSCの1分間あたりの回数 (頻度) を図1、振幅を図2に示す。セロトニン (5-HT) 投与によって、sIPSC

は頻度・振幅ともに増大がみられた。サンプル数4のデータをまとめたものを図3に示す。

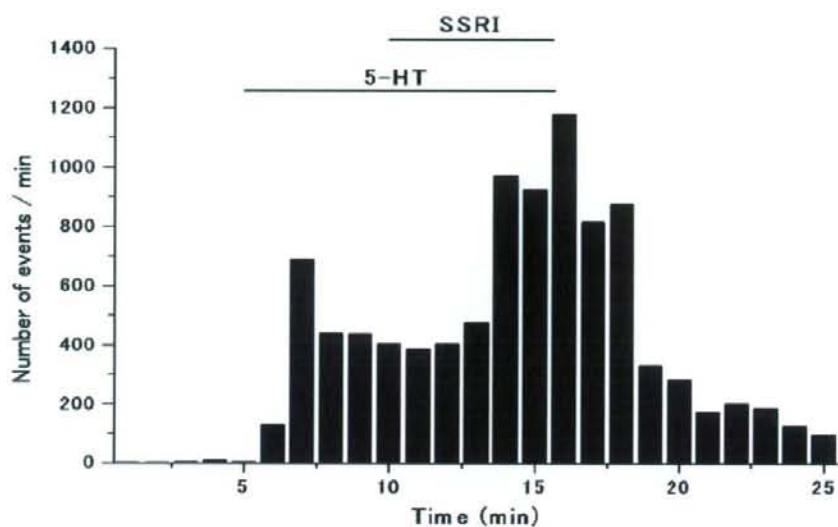


図1 sIPSC 頻度の時間経過

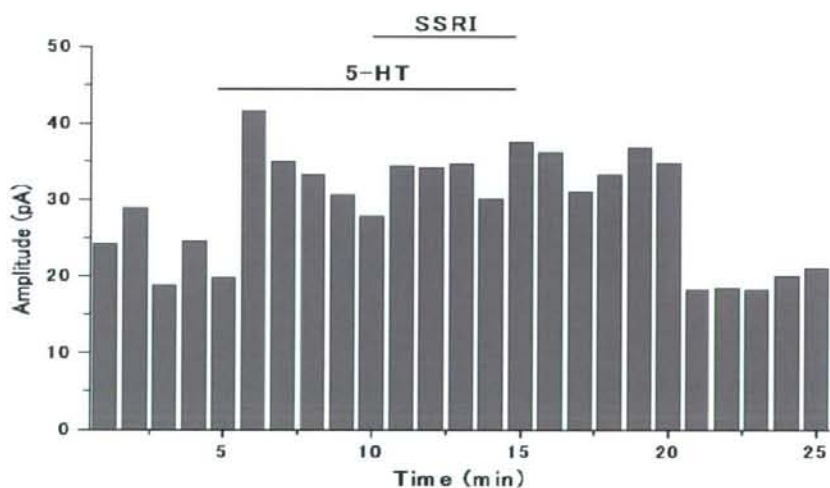


図2 sIPSC 振幅の時間経過

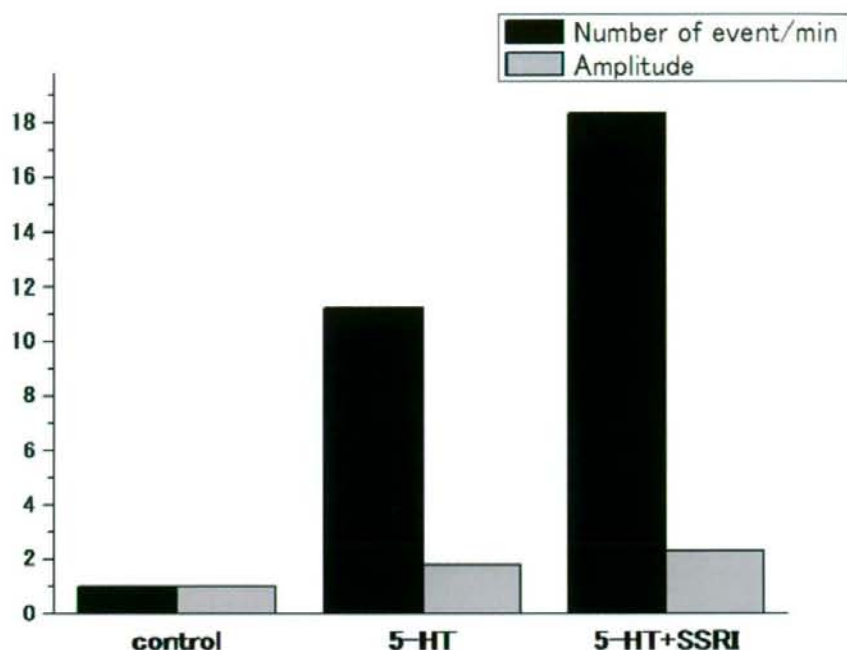


図3 control を1としたときの頻度・振幅の変化 (n=4)

考察

今回の結果から、セロトンは下丘においてGABA作動性ニューロンの神経伝達を亢進することが推測される。SSRIの投与はセロトンの効果を増強させることから、SSRIがセロトントランスポーターを阻害することによって細胞への再取り込みが減少し、細胞外のセロトニン濃度が増大したものと考えられる。

GABAと同じ抑制性であるグリシン作動性ニューロンと、興奮性のグルタミン作動性ニューロンへの作用については未だ調べられていないが、抑制性伝達のみが増強するのであれば、SSRIによって神経

細胞の伝達が抑制される方向に作用するものと推測される。

SSRIは慢性的な耳鳴に対して症状を軽減させるという報告が複数あるが、作用機序としては抑うつ傾向が改善されることにより耳鳴に効果を発現するとされている。本研究の結果、SSRIは中枢聴覚路神経細胞の伝達を直接変化させることが示唆され、それにより耳鳴が改善することもあり得るものと考えられる。

結論

セロトンは下丘神経細胞の抑制性

シナプス伝達を増強させ、SSRI はそのセロトニン効果をさらに増強させる。抑制性シナプス入力が増加することにより、下丘神経細胞の発火特性が変化していると推定される

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

アポトーシス抑制蛋白 PTD-FNK の内耳取り込みと
蝸牛有毛細胞障害の予防—蛋白治療の可能性について

分担研究者：山嵜 達也（東京大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：樫尾 明憲（東京大学耳鼻咽喉科）

共同研究者：坂本 幸士（東京大学耳鼻咽喉科）

研究要旨

アポトーシス抑制活性強化型蛋白 FNK に Protein Transduction Domain を付加した PTD-FNK を作成し、鼓室内投与による蝸牛への取り込み、アミノ配糖体に対する細胞障害予防の効果を確認した。PTD-FNK は鼓室内投与で蝸牛有毛細胞・らせん神経節細胞へ取り込まれ、アミノ配糖体に対する細胞障害を予防することが確認された。

研究目的

急性感音難聴におけるアポトーシスの関与はこれまでの研究から明らかとなっている。アポトーシス抑制蛋白を内耳へ導入する蛋白治療は急性感音難聴の有効な治療手段となりうる。全身副作用を考慮すると、鼓室内局所投与が優れているが、高分子蛋白は蝸牛窓膜を透過することが困難である。HIV 蛋白の一部 Protein Transduction Domain を付加すると蛋白はレセプター非依存的に細胞膜を通過することができることがわかっている。今回アポトーシス抑制蛋白 Bcl-XL の活性強化型蛋白 FNK に PTD を付加することで蝸牛窓膜の通過・内耳への到達・アミノ配糖体による内耳障害の予防が可能かどうかを検討した。

研究方法

250g 白色モルモット（♂）を使用。全身麻酔下蝸牛骨包を開放し、PTD-FNK に myc Tag を付加した PTD-myc-FNK

（3 μ l, 0.5mg/ml）を静置 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48 時間後蝸牛を摘出し、myc に対する免疫染色を行い分布を確認した。

蝸牛窓膜上にスポンゼルを置き、PTD-FNK を 3 μ l (6mg/ml) 注入した。1 時間後カナマイシン 200mg/kg 皮下注、エタクリン酸 40mg/kg 血管内投与を行った。術前と 2 週間後の ABR の閾値差、蝸牛有毛細胞障害率を検討した。

研究結果

PTD-myc-FNK は 1 時間後より蝸牛有毛細胞・らせん神経節への取り込みを認め、最大 24 時間までコントロール群に対して有意な取り込みを認めた（図 1, 2）。一方 PTD を付加しない myc-FNK 蛋白では取り込みを認められなかった。カナマイシン・エタクリン酸による聴力障害動物において PTD-FNK 投与群は ABR 閾値上昇を非投与群に比べ有意に抑えることができた。（図 3）また、外有毛細胞の障害率も PTD-FNK 投与群では

非投与群に比べ有意に抑えることができた。(図4)

考 察

PTD を付加することで高分子蛋白である FNK が蝸牛窓膜を通過し蝸牛有毛細胞に取り込まれることが可能となることが分かった。今後様々な蛋白の鼓室内投与への応用が期待される。また、以前行った全身投与では6時間ではほぼ蝸牛内から代謝されてしまうのに対し、鼓室内投与ではより長時間蝸牛内にとどまることが分かった。鼓室内投与の方法は全身投与に比べより副作用が少

なく、有効な治療法であることが示唆された。

結 論

PTD-FNK 蛋白は蝸牛窓膜を通過し蝸牛有毛細胞に到達アミノ配糖体に対する有毛細胞を抑制することが分かった。

研究発表

第18回 日本耳科学会総会・学術講演会 Protein Transduction Domain を付加した蛋白 (PTD-FNK) の蝸牛窓膜通過、蝸牛内細胞への取り込みについて—経鼓室的蛋白治療の開発—

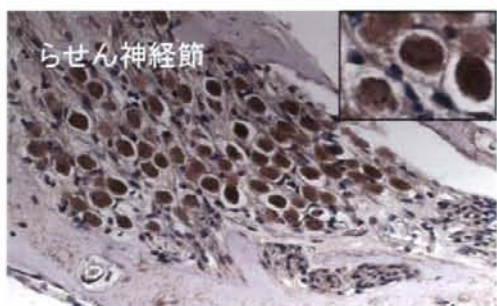


図1 投与6時間後の蝸牛。myc染色にて蝸牛有毛細胞・らせん神経節への取り込みが確認された。

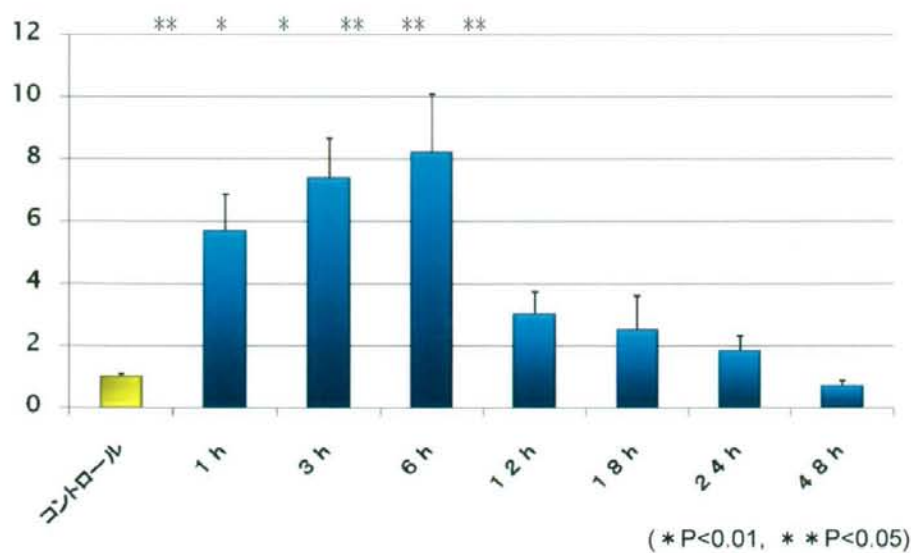


図2 コントロール (myc-FNK) との比較・時間経過。1 時間後より染色を認め、最大 24 時間後まで染色を認めた。

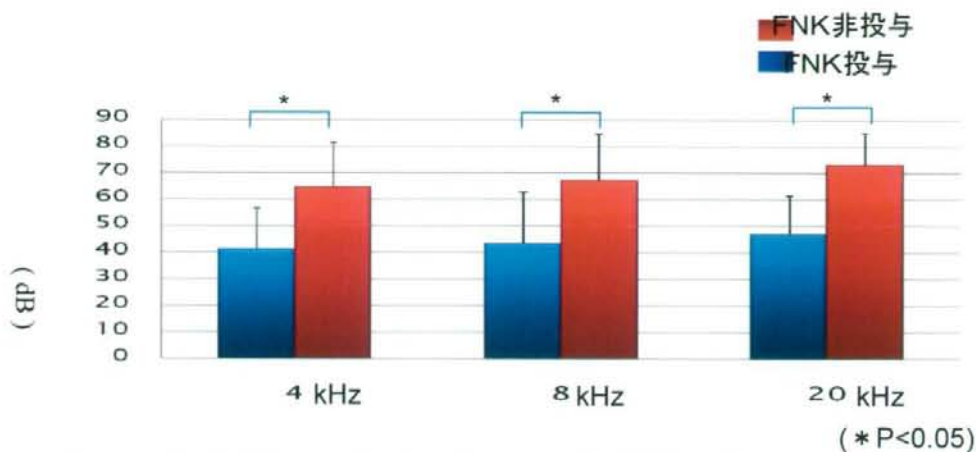


図3 PT-D-FNK 投与群・非投与群におけるアミノ配糖体負荷前後の閾値変化 4kHz、8kHz、20kHz いずれにおいても有意に閾値上昇を抑えられた。

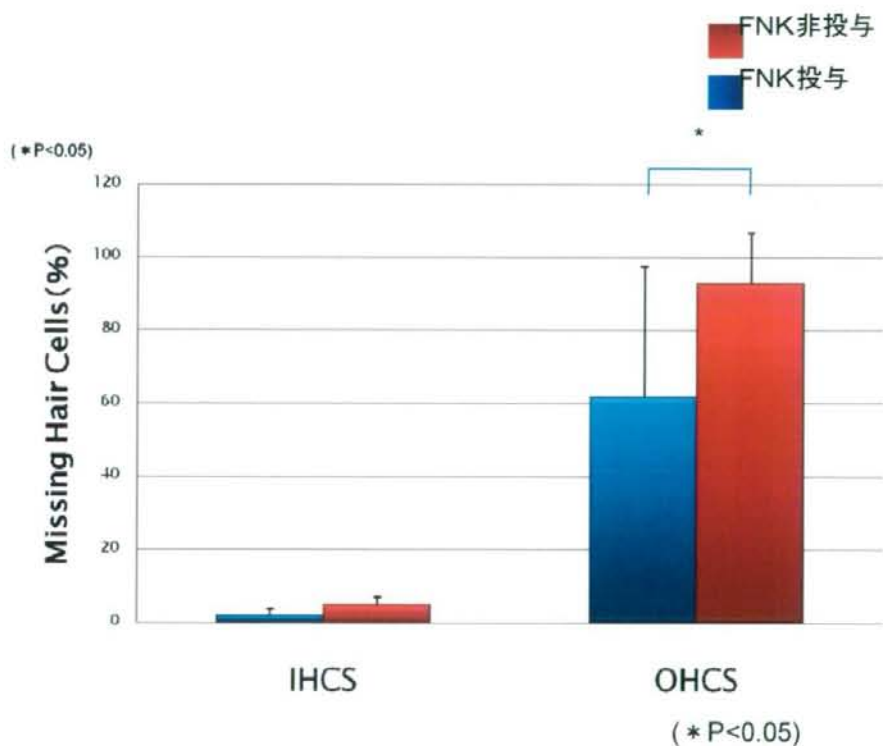


図4 PT-D-FNK 投与群・非投与群におけるアミノ配糖体負荷前後の細胞障害率の比較。外有毛細胞において有意に障害率を抑えられた。

蝸牛器官培養における microRNA 発現について

分担研究者：福島 邦博（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科）
共同研究者：前田 幸英（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科）
共同研究者：平井 美紗都（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科）
共同研究者：片岡 祐子（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科）
共同研究者：西 和則（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科）

研究要旨

マウスの蝸牛器官培養における microRNA 発現を検討し、内耳機能を検討するための実験系としての妥当性を検討した。

研究目的

蝸牛器官培養において遺伝子発現を検討する系が確立できれば、蝸牛において様々な薬剤の効果などを検討するのに有用なツールとなると考えられる。我々はすでに、DNAマイクロアレイを用いて、蝸牛器官培養内の遺伝子発現を網羅的に解析し、培養系での遺伝子発現が生体内での状態を有意に再現していることを確認した。

一方 microRNA はゲノム上に散在し約 20 塩基からなる non-coding RNA である。microRNA は mRNA に結合し、mRNA の分解を施すことによって様々な遺伝子の発現量をコントロールしており、内耳でも同様の機能を持つと考えられる¹⁾。今回我々は、蝸牛器官培養内での microRNA 発現を microRNA アレイを用いて生体内での発現と比較検討し、これを指標として蝸牛器官培養系の妥当性を検討した。

研究方法

胎生 15 日目の BALB/c マウスをケタミンで麻酔し、胎児を摘出しその内耳組織

を実体顕微鏡下で剖出した、37 度で 48 時間培養（DMEM、Knockout serum replacement 10%、PenicillinG 6 μ g/ml）後、Total RNA 抽出カラムとポリアクリルアミドゲル電気泳動によってマイクロ RNA を抽出し（各サンプルにつき $n=7$ ）、プローブを合成、microRNA アレイと反応させた。microRNA アレイには Ambion 社 mirVana micro RNA アレイを用いた。これにより 909 microRNAs の網羅的解析が可能となる。各 microRNA のシグナルを培養後の組織と、E15 培養前の組織との間で比較検討した。また、以上の実験を 3 度反復して行い、その再現性を検討した。

研究結果

培養前と培養後の microRNA 発現量は非常に高い相関をしめした（ $r=0.9111$ 、 $p<0.001$ ）。また、2 倍以上の発現変化を示す micro RNA は全体の 3.41%、1/2 以下の発現変化を示す micro RNA は全体の 4.84%であったが、変化した microRNA の内容は 3 回の実験でよく再現されていた。

考 察

今回の実験では培養前後のmicroRNA発現量はよく再現されていたが、前述のように一部のmicroRNAの発現量には、変化がみられた。これは組織が器官培養という *in vitro* の条件におかれたための変化と推察される。例えば我々はこれまでの器官培養の検討で²⁾、*Gapdh* 遺伝子の発現量が培養下で増加することから、現条件の器官培養では低酸素状態となっていると推測しているが、今回のmicroRNAの検討でも *has-mir-365* の発現量が低下していることを確認した。*has-mir-365* の低下は結果的に *HIF3A* 遺伝子の発現増加をもたらす。*HIF3A* は細胞に対する酸素供給が不足状態に陥った際に誘導されてくるタンパク質であり、低酸素への適応反応として発現したものと推測される。

結 論

今回の実験では培養前後のmicroRNA発現量は有意に再現されていた。また一部のmicroRNAでは *in vitro* の条件下となつたためとみられる変化があったが、その状況は3回の実験でよく再現されていた。以上から今回の条件の蝸牛培養系は、様々な薬剤の効果などの、培養条件下の比較検討には十分利用できるものと考えられた。

参考文献

- 1) MicroRNA gene expression in the mouse inner ear. Weston MD, Pierce ML, Rocha-Sanchez S, Beisel KW, Soukup GA. *Brain Res.* 2006 Sep 21; 1111 (1):95-104.

- 2) RT-PCR analysis of *Tecta*, *Coch*, *Eya4* and *Stre* in mouse cochlear explants. Maeda Y, Fukushima K, Kakiuchi M, Orita Y, Nishizaki K, Smith RJ. *Neuroreport.* 2005 Mar 15; 16(4):361-5.

健康危険情報

なし

研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

知的財産権の出願・登録状況

なし

音響外傷蝸牛に対するインターロイキン6阻害剤の効果

代表研究者：小川郁（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：若林健一郎（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：神崎晶（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：井上泰宏（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：斎藤秀行（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：岡本康秀（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：鈴木隆史（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：大石直樹（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）
共同研究者：藤岡正人（慶應義塾大学耳鼻咽喉科）

研究要旨

音響外傷蝸牛モデルマウスに対して音響負荷直後に炎症性サイトカインであるインターロイキン6の阻害剤を投与し、聴力、組織学的変性に影響を認めるか検討した。インターロイキン6阻害剤の投与により聴力の有意な改善と組織学的変性の軽減が認められた。また、炎症細胞の内耳への浸潤が薬剤投与により有意に抑制されていた。

研究目的

これまで内耳は中枢神経系同様、血液内耳関門のため免疫学的に特異な存在とされ、炎症細胞の存在は否定的であったが、近年内耳での炎症細胞の存在、浸潤を示唆する報告がなされている。われわれのグループでは音響外傷蝸牛においてIL-6の一過性の上昇と炎症細胞の浸潤を報告した。今回、われわれは、炎症反応を抑制することにより音響外傷を含む急性内耳障害において聴力の改善を期待できると考え、音響外傷モデルマウスに対してIL-6阻害剤を投与し、その効果について検討する。

研究方法

C57BL6 マウスを用いて実験を行った。

音響外傷(4kHz中心のoctave band noise, 124dB SPL、2h)直後にIL-6阻害剤(MR16-1;ラット抗マウスIL-6抗体)を腹腔内投与した薬剤投与群とラットIgGを投与したコントロール群において投与3週間後に聴覚機能、組織学的変化について解析を行った。

機能解析としてはAcoustic brainstem-evoked response(以下ABR)を施行した。組織学的には、エポキシ樹脂包埋による切片を用いて、らせん神経節、コルチ器、外側壁など蝸牛構造物に関して詳細な検討を行った。らせん神経節においては単位面積あたりの神経細胞数をカウントした。コルチ器に対してはsurface preparation法を用いて有毛細胞数のカウントを行った。

また、炎症細胞の評価のため、投与後 3 日、7 日、14 日後の凍結切片を用いて、CD45（白血球系のマーカー）、Iba-1（マクロファージのマーカー）の免疫染色を行い、機序に関して検討した。

研究結果

音響外傷後の ABR では、4kHz において薬剤投与群において有意な聴力の改善を認めた(図 1)。組織学的には、エポキシ樹脂包埋による切片において単位面積当たりのらせん神経節細胞数の減少が頂回転を中心に薬剤投与群では有意に抑制されていた(図 2)。Surface preparation 法を用いた有毛細胞数のカウントでは音響外傷により頂回転を中心に細胞数の減少を認めたが薬剤投与群とコントロール群の間で有意な差は認められなかった。

CD45、Iba-1 を用いた免疫染色ではらせん神経節において投与 3 日後の切片で薬剤投与群では炎症細胞の増加が有意に抑制されていた。この現象は頂回転を含めたすべての回転で同様に認められた。一方、外側壁では音響外傷による炎症細胞数の増加は認められたものの、薬剤投与群とコントロール群間での有意差は認められなかった。

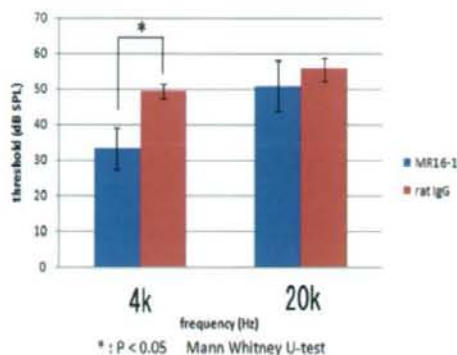


図1 聴力の評価(ABR)

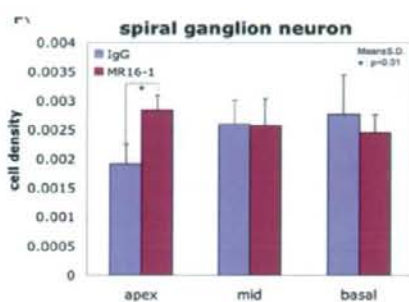


図2 らせん神経節細胞のカウント

考察

らせん神経節細胞の組織学的所見は低音域に有意差を認めており、ABRによる聴力改善と合致した。一方、有毛細胞数には有意差を認めておらず、このことから、IL-6 阻害による聴力改善効果には主にらせん神経節細胞の関与が考えられた。機能的、組織学的解析ともに効果が認められており、IL-6 シグナルを中和抗体を用いて阻害することにより音響外傷蝸牛障害が保護される可能性が示唆された。また、免疫染色の結果から、これらの機序には CD45 陽性細胞、Iba-1 陽性細胞などの炎症細胞の関与が示唆された。今後は、薬剤の機序についてさらに詳細な検討を行っていく予定である。また、

本薬剤はすでにヒト化抗体（MRA）が関節リウマチなどに臨床応用されており、急性内耳障害への応用を進めたいと考えている。

謝 辞

本研究に多大なご協力をいただいた慶応義塾大学医学部生理学教室（岡野研究室）岡野栄之教授、岡野ジェームス洋尚准教授にこの場を借りて御礼申し上げます。

発表論文

なし

学会発表

31st Mid Winter Meeting, The
Association for Research in
Otolaryngology February 16-21, 2008
Phoenix, Arizona, USA
The Effect of Anti-Interleukin-6
Receptor Antibody in Noise Induced
Damaged Cochlea
Kenichiro Wakabayashi, Masato
Fujioka, Sho Kanzaki, Masatsugu
Masuda, Daisuke Yamashita, Hirotaka
James Okano, Hideyuki Okano, Kaoru
Ogawa

パラフィン包埋ヒト側頭骨標本の免疫組織学的研究

分担研究者:喜多村 健(東京医科歯科大学耳鼻咽喉科)
共同研究者:高橋 正時(東京都保健医療公社大久保病院耳鼻咽喉科)
共同研究者:木村 百合香(東京都老人医療センター耳鼻咽喉科)
共同研究者:沢辺 元司(東京都老人医療センター病理部)
共同研究者:久保 幸穂(東京都老人総合研究所老化ゲノムバイオマーカー)
共同研究者:和田 仁(東北大学 大学院工学研究科)

研究要旨

パラフィン包埋法を用いてヒト側頭骨パラフィン包埋切片を作製し、免疫組織学的研究を行った。ヒト側頭骨パラフィン包埋法では形態的な歪みはあるものの、内耳内の蛋白局在の同定は可能であり、パラフィン包埋法の有用性が確認された。

研究目的

内耳病変の病理組織学的評価は、硬組織内の膜様物の中に高度に分化した機能をもつ複数の組織が存在するという解剖学的特殊性により、マクロでの形態を温存しながら大きな切片作製が可能であるセロイジン包埋法を用いることが一般的である。しかしセロイジン包埋側頭骨病理組織切片の作成にはコストや時間的ならびに人的資源を要することから、現在本邦ではセロイジン包埋切片の作成が可能な施設は皆無に等しい。また、セロイジン包埋切片は標本中の組織からセロイジンを完全に除去することが困難である点から、内耳に発現するタンパクの免疫染色等の分子生物学的研究をする上では限界がある。そこで通常の病理組織学的

研究に用いるパラフィン包埋法によるヒ

ト側頭骨病理切片を用いた免疫染色を試み、セロイジン包埋切片との比較検討を行い、パラフィン包埋法のヒト側頭骨分子病理学的研究における有用性を再検討した。

研究方法

東京都老人医療センター病理部にて剖検時に円筒状採取法で側頭骨を採取した。今回の対象標本は82歳女性で死後9時間で側頭骨を採取し、20%ホルマリンで固定し、9ヵ月間 EDTA 溶液で脱灰した。脱灰後、側頭骨を15mm大のブロックに切り取り、パラフィン包埋を施行し、6mmの厚さで薄切した。染色は HE 染色の他、

免疫染色として抗 Neurofilament 抗体 (Chemikon International 社 rabbit polyclonal ×5000)、抗 Prestin 抗体 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY 社 goat polyclonal ×1000) を用いた。

Neurofilament は末梢神経に発現するタンパクで、内耳にも多く発現が認められており、ヒト側頭骨内での発現も報告されている。Prestin は外有毛細胞に発現する蛋白でマウスでの免疫組織学的局在は多く報告されているが、ヒトでの免疫組織学的検討は我々が渉猟し得た範囲ではない。免疫染色のコントロールとして全身の32臓器を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は死体解剖保存法第18条のもと行い、東京都老人医療センター倫理委員会の承認を得て行った。

研究結果

パラフィン包埋の HE 染色の結果を図1に示す。ライスネル膜の破綻や基底版の歪みなど膜迷路の形態保存の点では劣るものの、パラフィン包埋切片においてもコルチ器の形態は比較的温存されていた。

免疫組織化学染色では、neurofilamentの結果を図2に示す。コントロールとして用いた全身の32臓器では、聴神経や末梢神経に発現が認められ、内耳内においても神経線維に強い発現を確認することができ、さらにコルチ器内においても有毛細胞の神経末端の部分にも発現を確認することができた。

Prestin の染色結果を図3に示す。コントロールでは発現を認めなかったものの、コルチ器内の3列の外有毛細胞に強い発現を確認することができた。

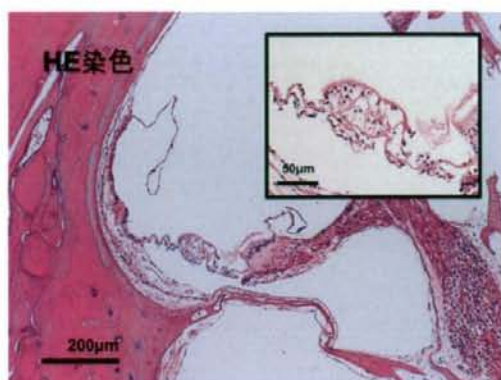


図1 HE染色

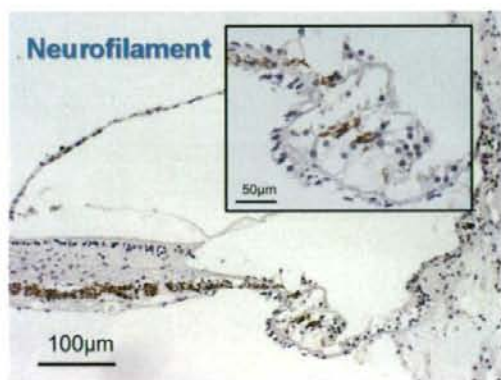


図2 免疫染色 (Neurofilament)

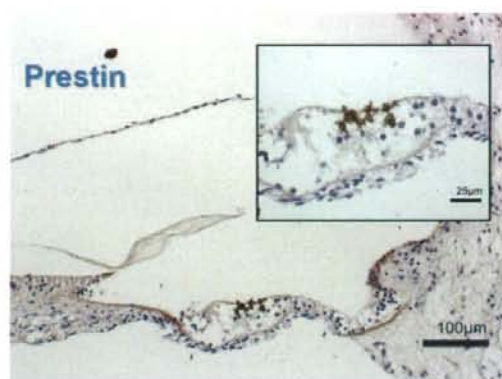


图3 免疫染色 (Prestin)

考 察

今回我々は通常の病理解剖標本作成法に準じたヒト側頭骨パラフィン包埋切片により、コルチ器内の prestin や neurofilament といった蛋白の局在を確認することが可能であった。今後の展望として、通常のパラフィン包埋による病理組織学的手法を用いても、ヒト側頭骨病理学的解析が可能であり、レーザーマイクロダイセクション法を用いた細胞レベルでの分子病理学的解析などへも応用できるものと考えた。しかし、今回の方法における今後の課題としては、いかに形態を保存できるかがあげられる。今後、標本採取時にホルマリンの内耳還流を行ったり、採取した標本のトリミングを試みることで、固定や脱灰時間を短縮することで、内耳形態や内耳に局在する蛋白や核酸の保存が可能であるか、検討を重ねていく予定である。

結 論

ヒト側頭骨パラフィン包埋切片を作成し、ヒト側頭骨病理学的検討を行い、免疫染色上、内耳組織内の蛋白の局在を同定し、ヒト側頭骨病理学におけるパラフィン包埋法の有用性を確認した。

健康危険情報

なし

研究発表

1 論文発表

なし

2 学会発表

1)高橋正時, 木村百合香, 加藤智史, 沢辺元司, 野本幸男, 大森孝一, 喜多村健 : ヒト側頭骨分子病理学的研究におけるパラフィン包埋法の再検討. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会学術講演会 大阪, 2008 年 5 月

知的財産権の出願・登録状況

なし