



Photochemically induced focal cochlear lesions in the guinea pig : I . DAB staining and SEM study

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高, 競 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1134

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 281号	学位授与年月日	平成11年 3月26日
氏 名	高 競		
論文題目	Photochemically induced focal cochlear lesions in the guinea pig : I. DAB staining and SEM study (光増感反応によるモルモット蝸牛限局障害 : I.DAB 染色及び走査 電顕による検討)		

博士(医学) 高 竟

論文題目

Photochemically induced focal cochlear lesions in the guinea pig : I. DAB staining and SEM study
(光増感反応によるモルモット蝸牛限局障害 : I. DAB染色及び走査電顕による検討)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

内耳蝸牛管の外側壁にある血管系 (stria vascularis) の機能障害は感音性難聴の発生に関与していると推定されている。Schuknechtらは、血管系の慢性的な萎縮性病変は老人性難聴の一つと報告しているが、近年、急性の血管系機能障害も急性感音性難聴の重要な発病原因の一つと考えられている。我々は rose bengal と緑色光の間の光増感反応を利用して、モルモットの蝸牛に限局性の急性血管系障害をつくり、障害をおこした血管系血管と上皮細胞がどのように変化しているのか調べるため、障害作成後経時的に DAB (3, 3'-diaminobenzidine) 染色し、血管系の形態学的変化を光学顕微鏡 (光顕) と走査型電子顕微鏡 (SEM) で検討した。

〔材料ならびに方法〕

対象としてプライエル反射良好な白色モルモット (体重230g から300g) を用い、腹側より中耳骨包を開き、頸静脈にカテーテルを留置。2% rose bengal を頸静脈により注入した直後に、緑色光 (540nm) を直径 1 mm にしぼって蝸牛第二回転に10分間照射した。障害作製後それぞれ、1時間 (5匹)、24時間 (7匹)、1週間 (5匹)、1カ月 (5匹) で側頭骨を採取した。採取した側頭骨は2.5%グルタルアルデヒドで外リンパ腔よりの灌流固定後、0.35M EDTA D で脱灰、さらに DAB ペルオキシダーゼ基質溶剤で外リンパ腔を灌流、染色した。Surface preparation 法で蝸牛の各回転を取りだし、グリセリンで封入して光顕で観察した。同じ標本を2%タンニン酸と1%オスミウム酸で再固定後、脱水、凍結乾燥をおこなって、SEMで再観察した。

〔結果〕

血管系の障害部位は、光顕及び SEM で一致して観察された。DAB 染色した標本では経時的に変化する血管系血管が、SEMでは同部位の上皮細胞の変化が明瞭に観察できた。

DAB 染色光顕所見：照射後1時間の標本で、すでに照射部位の血管系血管の血栓形成による拡張が認められた。24時間後には、さらに著しい血管系血管の拡張が認められたが、集合静脈、ラセン隆起血管、ラセン靱帯の血管では血流が減少していた。照射後一週間では血管系血管は異常な走行を示し、放射状細動脈、集合静脈、ラセン隆起血管及びラセン靱帯血管の血流はほぼ消失していた。一カ月すると照射部位に蝸牛側壁の血液供給が全くなり、何も染まってこなかった。障害範囲は一カ月後でも拡大や縮小を示さず、限局性であった。

SEM の所見：照射後1時間において、ラセン隆起に近い部分の血管系辺縁細胞に細胞の変性、崩壊が早期に強く見られた。照射後24時間たつと、辺縁細胞は照射部位の全域でかなり脱落し、血管系血管が著しく拡張して露出していた。拡張した血管系血管の断面をみると赤血球が固くつまって、血栓を形成していることが認められた。一週間経過すると、本来表面5-7角形の血管系上皮細胞は大型、不整形の一層の細胞で置き換わり、変形した血管系血管がこの上面に浮かぶように走行していた。一カ月後

では瘢痕化した血管条の表面に萎縮した血管がわずかに残っている所見が認められた。

〔結論〕

染色の基質に用いる DAB は、内因性のペルオキシダーゼ活性により反応し、不溶性褐色の重合体を形成する。特に赤血球がよく染まり、血管網を染め出す。さらにこの重合体は OsO₄と反応して電子密度の高い反応産物を形成するので、透過型電顕でも観察しうる。光増感反応で血管条の障害がおこっても、DAB 染色をしないと血管条血管の障害は明瞭には見えない。DAB 染色すると赤血球は褐色に染まり光顕でよく観察でき、さらに、電子密度の高い反応産物で赤血球と血管壁が堅くなるためか血管条血管がSEMでも明瞭に観察できた。同一標本へのDAB染色とSEMの併用で、血管条血管の障害及び同じ部位の上皮細胞の変性を同時によく検討できることがわかった。本方法は光顕で広い範囲の血管を観察でき、SEM で上皮の変性を高倍率で観察できる便利な方法であり、蝸牛の微小循環障害の検討に有用と思われる。

実験の結果からは、照射後1時間から血管条血管の血栓形成と拡張がみられ、24時間たつとさらにその拡張程度が高度になった。また、照射部位の障害範囲は一カ月後でも拡大や縮小の傾向は示さず、限局したままであることがわかった。これらの所見の解析は急性血管条障害の病態解明に役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

感音難聴の病因は多彩で不明のことが多いが、蝸牛障害、殊に内耳蝸牛管の外側壁にある血管条の機能障害が原因の一つと推定されている。血管条の慢性的な萎縮性病変が老人性難聴の一つで、急性の血管条機能障害が急性感音性難聴の原因の一つとの報告もある。前下小脳動脈・静脈の閉塞による内耳の循環障害モデルは既に研究されている。また、光増感反応により発生する活性酸素が血栓形成や細胞障害を来すことを利用した蝸牛の限局性障害モデルの研究もあるが、感音機能と関係の深い血管条血管と上皮細胞の経時的変化を詳細に検討した報告はない。

そこで申請者はブライエル反射陽性の白色モルモットに、ローズベンガルを頸静脈に注入した直後に左蝸牛第二回転に波長540nmの緑色光を直径1mmに絞って10分間照射し、1時間、24時間、1週間、1ヶ月後に側頭骨を採取した。標本についてEDTAで脱灰後、血管の形態学的変化を示すために、ペルオキシダーゼの基質であるDAB(3, 3'-diaminobenzidine)反応液で染色後、光学顕微鏡(光顕)と走査型電子顕微鏡(SEM)で観察し、以下の如き所見を得た。

- 1) 血管条の障害部位は、光顕とSEMで一致していた。
- 2) DAB染色光顕所見としては、
 - (1)照射後1時間で既に血管条血管の血栓形成による拡張が認められた。
 - (2)24時間後には血管条血管の更に著しい拡張が認められ、集合静脈、ラセン隆起血管、ラセン靱帯の血管では血流が減少していた。
 - (3)1週間後には血管条血管は異常な走行を示し、放射状細動脈、集合静脈、ラセン隆起血管、ラセン靱帯血管の血流はほぼ消失していた。
 - (4)1ヶ月後には血管条血管は消失したが、障害範囲の拡大や縮小はなかった。
- 3) SEMの所見としては、
 - (1)照射後1時間でラセン隆起に近い血管条辺縁細胞に細胞の変性、崩壊が早期に強く見られた。

(2) 24時間後には、辺縁細胞はかなり脱落し、血管条血管は赤血球が固く詰まって著しく拡張していた。

(3) 1週間では、血管条上皮細胞は大型、不整形の一層の細胞で置き換わり、変形した血管条血管がこの表面を不整に走行していた。

(4) 1ヶ月後では、瘢痕化した血管条の表面に萎縮した血管がわずかに残っていた。

以上の所見より、申請者は以下の如き結論を導出した。

- 1) 同一標本へのDAB染色とSEMの併用で、血管条血管の障害と上皮細胞の変性を同時に検討でき、蝸牛の微小循環障害の検討に有用である。
- 2) 照射後1時間から血管条血管の血栓形成と拡張が見られ、24時間後にはその拡張程度は高度になったが、障害範囲は、1カ月経っても限局したままであった。
- 3) これらの所見の解析は、急性血管条障害の病態解明に役立つ。

本論文内容の説明後、論文内容と関連の深い以下の点について申請者との間に質疑応答がなされた。

- 1) 光増感反応の機序
- 2) 光増感反応による血栓形成の機序について
- 3) 赤色血栓と白色血栓の違い
- 4) プライエル反射とは
- 5) 第二回転を選んだ理由
- 6) 光源の明るさ
- 7) 血管条の細胞成分
- 8) 血管条の機能
- 9) 筋肉型毛細血管とは
- 10) 本研究の臨床的意義

以上の質問に対する申請者の解答は適切であり、光増感反応による蝸牛の血管条血管の障害と上皮細胞の変性を同時にかつ経時的に詳細に解明した意義は大きく、本論文は博士（医学）の学位を授与するに十分な内容であると審査員全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 植 村 研 一

副査 教授 平 光 忠 久 副査 助教授 三 浦 克 敏