



A new model for investigating hair cell degeneration in the guinea pig following damage of the stria vascularis using a photochemical reaction

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大蝶, 修司 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1178

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 325号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	大 蝶 修 司		
論文題目	A new model for investigating hair cell degeneration in the guinea pig following damage of the stria vascularis using a photochemical reaction (光増感反応を用いたモルモット血管条障害による有毛細胞傷害の新しいモデル)		

博士(医学) 大 蝶 修 司

論文題目

A new model for investigating hair cell degeneration in the guinea pig following damage of the stria vascularis using a photochemical reaction

(光増感反応を用いたモルモット血管条障害による有毛細胞傷害の新しいモデル)

論文の内容の要旨

[はじめに]

急性感音難聴のひとつの原因として蝸牛の血流障害や、血管条の障害があると考えられている。もしも、血管条の障害で有毛細胞が影響をうけてさらに難聴がおこるとするならば、その検討には血管条のみに障害を作成できるモデルが必要となる。我々はこれまで、本学薬理学教室において開発された緑色光とローズベンガルを用いた光増感反応を用いて蝸牛の限局した部位に障害をつくることに成功している。しかし、これまで多く検討してきた光を蝸牛壁に垂直に照射する方法では蝸牛軸側の血管にまで光増感反応の影響がおよび、有毛細胞を直接に傷害したために、蝸牛外側壁にある血管条の障害が有毛細胞に与える影響については検討できなかった。そこで今回は、従来行ってきた蝸牛限局性障害モデルを改良して蝸牛血管条のみに障害をおこす光接線方向照射モデルを作成し、それを形態学的及び生理学的に検討した。

[材料ならびに方法]

ハートレー系白色モルモットの雌(23匹)にペントバルビタール40mg/kg腹腔内投与にて全身麻酔を施行し、腹側より皮膚切開をおいた。頸静脈よりカテーテルを挿入し、ローズベンガルの投与経路とした。さらに左中耳骨包を露出後、バーにてこれを削開して蝸牛を明視下においた。光源からファイバーにて誘導した緑色光を集光レンズにて直径1mmに絞り、光度8000ルクスで蝸牛第二回転の外側壁を接線方向に10分間照射した。同時にカテーテルから20mg/kgのローズベンガルもしくは同量の生理食塩水を注入した。形態学的検討には24時間後、4日後、7日後にモルモットを断頭して蝸牛を摘出し、走査電子顕微鏡にて観察した(n=13)。生理学的には蝸牛神経複合活動電位を照射前、照射終了直後、30分後、24時間後に測定し検討した(n=10)。なお、緑色光の照射部位はモルモットにおいてほぼ4000ヘルツを感受する部位に相当するので、聴力の測定に用いた音の周波数は4000ヘルツのトーンバーストとした。

[結果]

形態学的にはローズベンガル注入後に緑色光を照射した全例において、照射部位に一致した約380 μ mの血管条の障害が観察された。コルチ器の外有毛細胞は24時間後でも走査電子顕微鏡下では傷害を認めなかったが、4日後、7日後のものについては血管条の障害範囲に対応したコルチ器上に外有毛細胞の消失を認めた。しかし、内有毛細胞やラセン板縁などの細胞は全く傷害を認めなかった。コントロールとして生食を注入したものは血管条、コルチ器などに全く傷害をうけなかった。蝸牛神経複合活動電位閾値の変化は光増感反応施行例では24時間後に有意な($p < 0.01$)上昇を認めた(照射前39dB SPL、24時間後52dB SPL)。

〔考察〕

緑色光を蝸牛の接線方向に照射することによって血管条に障害を作成することができた。血管条のみならず外有毛細胞にも傷害が現れたが、内有毛細胞やラセン板縁などには傷害を認めなかった。垂直照射の場合には蝸牛中心部にあるこれらの部位までも傷害をおこしており、形態学的には明らかに異なるものであった。これは従来のモデルが蝸牛に垂直に光を照射したために、蝸牛軸側の血管条にまで緑色光があたり、そこで光増感反応を起こし活性酸素種を生成し、これらが直接にコルチ器などを傷害していたと考えられる。一方今回の接線方向の照射では蝸牛外側壁のみに光があたったのでその部位でのみ活性酸素種が生成され、血管条が障害を受け、障害の二次的影響によってコルチ器の外有毛細胞が傷害を受けたために従来とは異なった形態学的変化を示したものと考えられる。また、生理学的にも蝸牛神経複合活動電位閾値の上昇を認め、本モデルは形態学的にも生理学的にも血管条性難聴のモデルとなりうると考えられた。いかにして血管条障害の影響が有毛細胞に及ぶのかは、まだはっきりとした結論は出せないが、24時間後でも有毛細胞の形態学的変化を認めなかったことから、従来からいわれてきた血管条の破綻に伴う蝸牛内リンパ組成の変化に加えて、虚血時におけるグルタミン酸による遅発性細胞死との関連も示唆される。これまでの報告で有毛細胞のグルタミン酸の含有量はかなり高いことがわかっている。また、蝸牛外側壁にはグルタミン酸のトランスポーターが高濃度に存在することが知られている。本モデルにおいて、蝸牛外側壁は光増感反応で障害されるためグルタミン酸のトランスポーターの働きが抑制され、その結果余剰グルタミン酸の処理ができずに細胞障害を起こした可能性も否定できない。しかし、これらの詳細については今後の研究を待たねばならない。

〔結論〕

光増感反応をもちいてモルモット蝸牛血管条に限局する障害をもつ内耳障害モデルを作成した。本モデルは今後の感音難聴発症機構の研究に役立つものとする。

論文審査の結果の要旨

急性感音難聴の発症機序は、いまだ解明されていない。この発症機序を解明するために申請者の属する研究グループは、この成因に血管条の障害を重要視し、これまで緑色光とローズベンガルを用いた光増感反応を用いて主に蝸牛の血管条に限局した部位に障害をきたす実験モデルを作成して研究をしてきた。ただこれは光を蝸牛壁に垂直に照射する方法であったので、蝸牛軸側の血管条まで光増感反応が及び、有毛細胞を直接的に傷害したために、血管条の障害が有毛細胞に与える影響については検討できなかった。申請者は本研究において、従来行ってきた蝸牛限局性障害モデルを改良することにより、蝸牛血管条のみに障害をおこす接線方向の光照射を行うモデルを作成し、これを形態学的及び生理学的に検討をした。

ハートレー系白色モルモットの雄を用い、中耳骨包を開窓して露出させた蝸牛に対して、ファイバーからの緑色光(8,000 lx、直径1mm)を蝸牛第二回転の外側壁に接線方向に10分間照射した。緑色光照射直前にローズベンガルまたは生理食塩液の静注を行った。

24時間後、4日後、7日後に蝸牛を取り出し(n=13)、走査型電子顕微鏡による形態学的観察を行い、生理学的には蝸牛神経複合活動電位を照射前、照射終了直後、30分後、24時間後に測定した(n=10)。

形態学的にはローズベンガル注入後に緑色光を照射した全例において、照射部位に一致した約380 μ m

の血管条の障害が観察された。コルチ器の外有毛細胞は24時間後でも走査型電子顕微鏡下では傷害を認めなかったが、4日後、7日後のものについては血管条の障害範囲に対応したコルチ器上に外有毛細胞の消失を認めた。しかし、内有毛細胞やラセン板縁などの細胞は全く傷害を認めなかった。コントロールとして生理食塩液を注入したものは血管条、コルチ器などに全く傷害をうけなかった。蝸牛神経複合活動電位閾値の変化は光増感反応施行例では24時間後に有意な($p < 0.01$)上昇を認めた(照射前39dB SPL、24時間後52dB SPL)。

本研究で目的とした、緑色光を蝸牛の接線方向に照射することによって血管条に障害を作成することが可能であった。血管条のみならず外有毛細胞にも傷害が現れたが、内有毛細胞やラセン板縁などには傷害を認めなかった。垂直照射の場合には蝸牛中心部にあるこれらの部位までも傷害をおこしており、形態学的には明らかに異なるものであった。今回の接線方向の照射では蝸牛外側壁のみに光が照射され、その部位でのみ活性酸素種が生成され血管条が障害を受け、障害の二次的影響によってコルチ器の外有毛細胞が傷害を受けたために従来とは異なった形態学的変化を示したものと考えられる。また、生理学的にも蝸牛神経複合活動電位閾値の上昇を認め、本モデルは形態学的にも生理学的にも血管条性難聴のモデルとなり得ると考えられた。これまでは血管条障害が有毛細胞にどのような影響を与えるのかを検討できるモデルがなかったために不明な点が多かったが、本モデルによってこれらの検討が更に進んでいくことが期待されるとしている。

論文審査会では、本研究が、光増感反応を用いてモルモット蝸牛血管条に限局する障害をもつ内耳障害モデルを作成することに成功し、本モデルが今後の感音難聴発症機構の解明に役立つものと考えられることが評価された。

本論文の審査過程において、次のような質疑が行われた。

- 1) 内リンパ液の形成はどこでおこなわれているか
- 2) 接線方向の光照射と垂直方向のものとの相違
- 3) 接線方向照射では入射側と出口側では傷害程度が違うか
- 4) モルモットを使用する理由は
- 5) 有毛細胞は加齢性変化をうけるか
- 6) 外有毛細胞の傷害が内有毛細胞よりも著明であった理由は
- 7) リンパの組成の変化と減少はどこで修復されるか
- 8) グルタミン酸の外有毛細胞での役割について
- 9) 血管条の血流量を測定する方法は

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 平 光 忠 久
副査 橋 本 賢 二 副査 三 浦 克 敏