EXPERIMENTAL STUDY FOR THE CHANGES OF NUCLEIC ACIDS IN SPIRAL GANGLION CELLS OF THE GUINEA PIGS AFTER EXPOSURE TO EXCESSIVE PURE TONE.

By
E. ISHIYAMA M.D.

*From the Department of Otorhinolaryngology, Nihon University School of Medicine, Tokyo.
(Director: Prof. S. Nakamura M.D.)*

By histochemical and ultraviolet photographic analysis, the author investigated the nucleic acid in spiral ganglion cells of the guinea pigs, three days, one week, two weeks and three weeks after the exposure to 1000cps, 135db, for different duration (5, 10, 15, 30, 60, 120 & 180minutes),

The results obtained were as follows:

1. The results obtained by Mg-Py staining analysis and ultraviolet photographic analysis were almost similar.
2. Changes of RNA in the cytoplasm were much more sensitive than of DNA.
3. Three days after the exposure, RNA increased temporarily.
4. One week and two weeks after the exposure, RNA was decreased.
5. Three weeks after the exposure, RNA recovered to normal limits in the cases with 5~15 minutes' exposure, however, in the cases with more prolonged exposure, RNA was markedly decreased.

音響刺激によるテンデクネズミラセン神経節細胞の 核酸の変動について

日本大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：中村四郎教授）

助手 石 山 英 一
イシ ヤマ エイ イチ

目 次

第1章 緒 言	第1項 純音発生装置
第2章 実験材料および実験装置	第2項 音圧測定法
第1節 実験材料	第3項 純音実験箱
第2節 実験装置	
第3章 実験方法	
第1節 標本作製方法	
第2節 ラセン神経節細胞の核酸染色	
第3節 非核酸染色	
第4節 紫外線顕微鏡写真による核酸証明	
第4章 実験成績	
第1節 ラセン神経節細胞の MG-PY 染色による	

観 察

第1項 対 照 群	第1項 対 照 群
第2項 音響負荷群	第2項 音響負荷群
第2節 Feulgen 反応による観察	第3節 紫外線顕微鏡写真による観察
第1項 対 照 群	第1項 対 照 群
第2項 音響負荷群	第2項 音響負荷群
第5章 考 按	
第6章 結 語	
文 献	

第1章 緒 言

聴器に対する音響刺激の影響として現われる Cortis organ の形態学的変化については古くより多くの実験的

報告が行われ、その病理組織学的所見の回復性の問題についても論ぜられている。しかしこの場合、内耳病変の回復性を論ずるにあたっては、たんに病理組織学的変化の一面からだけみるのでは、自らその限界があつて、その観察結果は極めて不十分とならざるをえない。こゝにおいて聴器のもつ微妙な生体反応として、内耳の細胞化学が研究の対象に浮かびあがすることは当然のなりゆきであろう。殊に Cortis organ の有毛細胞をはじめ種々の支持細胞、あるいはラセン神経節細胞内に現われる細胞の化学的变化を追求することは、聴覚の疲労ないしは音響外傷におけるその発生機序の解明に大きな根拠を与えるものと思われる。これらの細胞化学的研究の一環として、こゝにラセン神経節細胞内の核酸の変動が先づ注目されるわけであるが、この核酸については既に Caspersson (1940) 以来 Hamberger-Hydén (1945) 等によつて研究の端緒が開かれてきた。

そもそも核酸は細胞核および細胞質のそれぞれに存在し、遺伝因子である染色体の主成分として、また細胞質の蛋白合成のためのアミノ酸の鋳型 (template) として細胞に欠くことのできない物質であり、その存在が F. Mischer によつて発見されて (1871) 以来、これに関する数々の研究業績があり、益々その重要性が認識されてきている。また音響の聴器に対する影響についても、河田はニッスル氏小体の消長がラセン神経節細胞の維持に関係が強いことをのべたが、その後 Caspersson がニッスル氏小体はリボ核酸 (RNA) であることを証明し、細胞化学の部門は形態学的と、生化学的との密接な関連の下に発展しつつある。Caspersson は細胞の核酸が細胞の蛋白合成に重要な意義をもつことを指摘し、さらに Hamberger-Hydén らの業績は、神経の興奮伝導という機能は細胞内蛋白合成と動的に関連して、神経興奮の持続は神経細胞体の蛋白質および RNA の減少を引越すということを明らかにした。本邦においては中村、水越、森、片桐、安藤らが聴中枢の組織化学的研究を、あるいは、ラセン神経節細胞の RNA の分布を調べ、Hamberger-Hydén らの実験における成績とはほぼ同様の結果をのべている。私は音響刺激による聴覚疲労ないしは音響外傷の回復性の問題を細胞化学の立場から求めようとして、刺激時間をいろいろ変化しながら、1000cps, 135db の強大純音刺激を probe tube により動物の鼓膜直前に導き、正確に音圧測定を行ないながら、ラセン神経節細胞の RNA, DNA 代謝に対するこれら音響刺激の影響を組織化学よりする核酸染色法と、

一方においては原理を異にする紫外線吸収像の両面より観察し、音響刺激によるラセン神経節細胞内の核酸の変動について研究した結果、いさゝか知見をえたのでこゝに報告する次第である。

第2章 実験材料および実験装置

第1節 実験材料

実験動物としては、体重約 350gr 前後の聴力正常なテンデクネズミを用いた。耳鏡検査により鼓膜正常なることを確め、さらにブライエル氏耳介反射良好のものをえらんで実験に用いた。実験に用いたテンデクネズミは合計 94 匹である。

第2節 実験装置

第1項 純音発生装置

純音発生は純音発振器 R-C signal generator ORC-27 を、増幅器は山水電気社製 Amp, Model, Q50 を、ドライバーユニットはアシダ音響社製 RU25-S 型 2 ケを使用した。この際の sine curve に歪みのないことを予め確めた (第1図)。

第1図 1000cps の sine curve

第2項 音圧測定法

音圧測定には、東京理工研究所製音圧測定器を使用した。本装置の microphone head に probe tube を装着することによつて、鼓膜直前の音圧を正確に測定した。(第2図、第3図) 音響発生装置より生ずる音響は、鼓膜直前における最大値として 1000cps では 136.7db を示した。実験には 1000cps, 135db の音圧を使用した。

第3項 純音実験箱

音響装置より発する音響は、一端に耳鏡を設備した直径 16mm の金属性 tube を介して、動物の被検耳に与えられた。実験動物はこれをテンデクネズミ固定器にて固定して、実験箱内に入れた。この実験箱の全体は脚よ

第 2 図

音圧測定装置 及び 校正装置

第 3 図

Probe tube 挿入法

り床上約 80cm に固定し、実験室の壁および床等よりの振動が伝播しないように留意した。実験箱は容積約 $60 \times 80 \times 120$ cm で、壁はすべて外面より木板、ロックウール、テックス、鉄板、テックス、ロックウール、木板、吸音剤（但し底部のみ硝子）よりなっている。

第3章 実験方法

上記の純音発生器より発した 1000cps 135db の刺激音の刺激時間は、5分、10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間とした。これらの刺激負荷後、3日目、1週間目、2週間目、3週間目にそれぞれの試獣を生体固定せずそのまま断頭し、MG-PY 染色用には Carnoy 固定液を、Feulgen 反応用には昇汞醋酸液を卵円窓より注入して大藤式内耳灌流固定を行った後、直ちに中耳腔を破つて、細心の注意のもとに、殻軸を蝸牛神経を含んだまま取出し、つぎの操作によつて染色処理を行った。

第1節 標本作製方法

1) メチルグリン・ピロニン染色用標本としては、摘出した被検材料を Carnoy 氏液に投じて1時間半固定を行ない、ついで直ちに無水アルコールにて一昼夜脱水した後パラフィン包埋を行った。

2) ホイルゲン反応を行なうためには、6% 昇汞水

100cc+氷醋酸 2cc の液にて一昼夜固定を行ない、ついでアルコール脱水をおこなった後パラフィン包埋を行った。

3) 紫外線顕微鏡用標本としては、被検材料を Carnoy 氏液に投じて1時間半固定後、無水アルコール一昼夜脱水した後パラフィン包埋を行った。

第2節 ラセン神経節細胞の核酸染色

1) メチルグリン・ピロニン染色

マイクロームで 7μ の厚さの切片を作製し、a) メチルグリン・ピロニン液（以下 MG-PY 液と略記する）で20分間室温で染色し、3級ブチルアルコール中に一昼夜放置した後、キシロール透徹、バルサム封入した。b) ミノファージェン製薬本舗試薬部作製のリボヌクレアーゼ結晶を 1mg, 1cc の割合に pH 6.6 の McIlvaine 氏緩衝液に溶解したものを、 50°C 、30分間作用させた後、a) と同様の方法で MG-PY 染色を行ない RNA 確認の参考とした。

2) ホイルゲン反応 (Feulgen et Rossenbeck)

Feulgen 反応用としては、 7μ の厚さの切片につき脱パラ後、つぎの染色処理を行った。a) 一規定塩酸で1分間洗った後、 60°C の一規定塩酸中に4分間浸漬し、しかもこの容器は密栓して正確をきした。さらに短時間一規定塩酸で洗い、後水洗して加水分解中断後に、1時間半 Schiff 氏試薬中に浸漬し、さらに新しく調製した亜硫酸水を別々の蓋のある容器3ケにとり、各3回あて洗滌し、水洗後、脱水、キシロール透徹、バルサム封入した。b) 他の群として、一規定塩酸を作用させず同様の染色操作をおこなつて DNA 確認の参考とした。

第3節 非核酸染色

前述のラセン神経節細胞の核酸染色の他に、ヘマトキシリン・エオジン染色をおこない、切片の良否、ラセン神経節細胞の各部を含むか否かについて確認の参考とした。

第4節 紫外線顕微鏡写真による核酸証明

核酸類は $260\text{m}\mu$ の部分の紫外線を吸収するが、これはポリヌクレオチド類の特異的な性質ではない。この吸収はプリンとピミジン環の共役二重結合によるものである。それ故紫外線顕微鏡によつて証明される核酸は、RNA と DNA との間に有意な差は認めることはできない。検査標本は脱パラ後、石英スライドガラスにのせ、グリセロール（屈折率 $nd=1.458$ ）を滴下後、オリンパス光学製（MOB 型）紫外線顕微鏡写真装置により核鏡、その部位の $260\text{m}\mu$ の写真を取り核酸判定の資料

とした(第4図)。

第 4 図

MOB型紫外線顕微鏡

第4章 実験成績

第1節 ラセン神経節細胞の MG-PY 染色による観察

第1項 対 照 群

MG-PY 染色により、原則的に DNA は MG によって選択的に染色され、RNA は PY によって同様に選択的に染色される。本方法によるテンデクネズミの正常神経節細胞の細胞質は PY 好性を示し、桃赤色の粗大および微細顆粒によって満たされ、いわゆる、ニッスル染色によるニッスル氏小体と一致するが、粗大顆粒は、概して細胞質に平等に分布した濃厚像を示すものが多く、これについて辺縁部にやゝ多量に存在する傾向がみられる。核には MG 好性小顆粒が点在している。核仁は MG 好性および PY 好性を示し紫色にみられた。テンデクネズミ 10 匹におけるこれらの正常型細胞を染色の状態から次の 4 型に分類した。すなわち 1 型=細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型、2 型=細胞質 PY 好性顆粒平等分布淡型、3 型=細胞質 PY 好性顆粒核膜周囲および細胞質辺縁部限局型、4 型=PY 好性顆粒ほとんど欠如型、の四型に分類し、各型の百分率を求めると第 1 表のようであった。これからみて、第 1 型が全体の 66% を占め、第 2 型および第 4 型はそれぞれ約 10%、第 3 型は 15% にして、第 1 型が比率の上からは支配的である(なお写真 1-2 は、対照群の MG-PY による染色標本を示したものである)。

第2項 音響負荷群

音響負荷群にはすべて 1000cps, 135db の純音を負荷した。probe tube により鼓膜直前の音圧測定を行いな

第 1 表
対照群 細胞型百分率

1 型	2 型	3 型	4 型
細胞質 PY 好性顆粒 平等分布 濃型	細胞質 PY 好性顆粒 平等分布 淡型	細胞質 PY 好性 顆粒核膜周囲 及細胞質辺縁部 限局型	細胞質 PY 好性顆粒 ほとんど 欠如型
66 %	10 %	15 %	9 %

がら負荷した。その所見としては、細胞質の PY 好性顆粒にかなり著明な変化を認めた。これらの変化はラセン神経節細胞における RNA の量的変化の時間的変動であるが、その時間的変動にはかなりの個体差を認め、細胞個々についてもかなりの段階のものゝ混在を認め、各回転部における差は著明ではないが、第 2 回転のラセン神経節細胞がやゝ強い反応を示すように思われた。そこで主として第 2 回転の神経節細胞を観察した。実験動物は、音響負荷群では各負荷群ごとに 3 匹づゝを使用した。

1) 5 分間負荷群: 5 分間の音響負荷後 3 日目の群は、細胞質、核、核膜周辺部、細胞質辺縁部等に MG-PY 染色上著明な変化みられずゝ対照群と同様の所見を示すもの多く、音響負荷後 1 週間、2 週間のものは細胞質における PY 好性顆粒が 3 日目に比してやゝ減少を示し、細胞質 PY 好性顆粒平等分布淡型の増加 (25~19%) をみたが、核、核膜周辺部、細胞質辺縁部には著明な変化は認められなかつた。しかし負荷後 3 週目のものでは、細胞質 PY 好性顆粒の平等分布濃型を示すものが多く (74%)、又細胞質核膜周辺部には濃厚像を示すものが多く (18%) 出現しているが、細胞質、核の変型等はみられず、その細胞百分率は第 2 表の通りであつた (なお写真 3 は、5 分負荷後 3 日目、写真 10 は、5 分負荷後 1 週間目、写真 17 は、5 分負荷後 2 週間目、写真 24 は、5 分負荷後 3 週間目の MG-PY 染色標本を示したものである)。

2) 10 分間負荷群: 音響負荷後 3 日目のものでは、細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型を示すものがやゝ多くなり、核膜周辺部にもやゝ PY 好性顆粒の増加を認めたが、その度合は著しいものではない。負荷後 1 週間および 2 週間の群では核、細胞質、核膜辺縁部、細胞質

第 2 表

5分音響負荷群 細胞型百分率

負荷後日数	1 型	2 型	3 型	4 型
3 日目	65 %	11 %	13 %	11 %
7	50	25	10	15
14	55	19	9	17
21	74	4	18	4

第 3 表

10分音響負荷群 細胞型百分率

負荷後日数	1 型	2 型	3 型	4 型
3 日目	68 %	9 %	16 %	7 %
7	48	28	10	14
14	52	25	9	14
21	69	10	13	8

第 4 表

15分音響負荷群 細胞型百分率

負荷後日数	1 型	2 型	3 型	4 型
3 日目	70 %	4 %	20 %	6 %
7	44	31	9	16
14	48	27	7	18
21	66	10	16	8

辺縁部共にやゝ明瞭な PY 好性顆粒の減少を認めた (1 型=48~52%)。これに反し, PY 好性顆粒欠如型は増加した (14%)。負荷後3週間目のものでは細胞質の PY 好性顆粒はなお正常のものに比してやゝ減少を認めるが, 細胞質核膜辺縁部および細胞質辺縁部に共に PY 好性顆粒による濃厚像を示し, 細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型を示すものが多くなつてきている。その細胞百分率は第3表の通りである (なお写真4は, 10分負荷後3日目, 写真11は, 10分負荷後1週間目, 写真18は, 10分負荷後2週間目, 写真25は, 10分負荷後3週間目の MG-PY 染色標本を示したものである)。

3) 15分間負荷群: 負荷後3日目の群では細胞質, PY 好性顆粒平等分布濃型を示すものが多くなり, また, 核膜周辺部および細胞質辺縁部にも PY 好性顆粒の濃厚像を認めたが, 負荷後1週間目, 2週間目のものではこれに反して明らかに PY 好性顆粒の減少がみられ, 核膜周辺部および細胞質辺縁部の濃厚像も減少を示しており, 逆に PY 好性顆粒欠如型は増加を示していた。負荷後3週間目のものでは細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型および核膜周辺部, 細胞質辺縁部に濃厚像を示すものが多くなり, その比率は対照群に近づいてくる。その

細胞百分率は第4表の通りである(なお写真5は, 15分負荷後3日目, 写真12は, 15分負荷後1週間目, 写真19は, 15分負荷後2週間目, 写真26は, 15分負荷後3週間目の MG-PY 染色標本を示したものである)。

4) 30分間負荷群: 音響負荷後3日目のものでは, 細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型のやゝ著明な増加(72%)をみ, 核膜周辺部および細胞質辺縁部に濃厚像を示すものが多く(21%)なっているが, 負荷後1週間目および2週間目のものでは, 濃厚像を示した部位も PY 好性顆粒の減少が認められた1型(40~42%), 逆に PY 好性顆粒欠如型は増加している(22%)。負荷後3週間目のものでは, 細胞質 PY 好性顆粒の減少を認めるが, 核膜周辺部の PY 好性顆粒の軽度の濃厚像も認められた。その細胞百分率は第5表の通りである。なお写真6は, 30分負荷後3日目, 写真13は, 30分負荷後1週間目, 写真20は, 30分負荷後2週間目, 写真27は, 30分負荷後3週間目の MG-PY 染色標本を示したものである。

第5表

日数	1型	2型	3型	4型
3日目	72%	4%	21%	3%
7	40	28	10	22
14	42	27	9	22
21	60	13	13	14

5) 長時間負荷群: 音響負荷1時間, 2時間および3時間の群では, 負荷後3日目の群では共に細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型を示すものが多く(73~75%)なり, また, 核膜周辺部および細胞質辺縁部に著明な濃厚

第6表

日数	1型	2型	3型	4型
3日目	74%	3%	20%	3%
7	34	34	8	24
14	32	35	9	24
21	40	32	8	20

第7表

日数	1型	2型	3型	4型
3日目	73%	4%	20%	3%
7	30	38	6	26
14	34	35	6	25
21	38	33	8	21

像を認めた(20%)が, 負荷後1週間目および2週間目

においては、細胞質 PY 好性顆粒の著明な減少 (27~30%) を認め、さらに前述の各群とことなり負荷後3週間目のものでも著明な PY 好性顆粒の減少 (35%) を認めた。しかもその減少の度合は、音響負荷時間が増すにつれて著しくなる。その細胞百分率は第6表、第7表および第8表の通りである。

第 8 表

180分音響負荷群 細胞型百分率

細胞型	1 型	2 型	3 型	4 型
3 日目	75 %	3 %	20 %	2 %
7	27	39	8	26
14	30	40	7	23
21	35	41	7	17

(なお写真7は、1時間負荷後3日目、写真8は、2時間負荷後3日目、写真9は、3時間負荷後3日目、写真14は、1時間負荷後1週間目、写真15は、2時間負荷後1週間目、写真16は、3時間負荷後1週間目、写真21は、1時間負荷後2週間目、写真22は、2時間負荷後2週間目、写真23は、3時間負荷後2週間目、写真28は、1時間負荷後3週間目、写真29は、2時間負荷後3週間目、写真30は、3時間負荷後3週間目の MG-PY 染色標本を示したものである。)

音響刺激後の神経節細胞内の RNA 量的変化が時間の経過と共に一定の段階を踏んでゆくことは上述の通りであるが、その時間的推移に伴う量的変化には個体差も認められ、かつ細胞個々についても、種々の段階のものが混在するので、鏡検像のみによる比較検討には満足で

第 9 表

要因分析表

F	S.S.	D.F.	M.S.
T	4926	7-1=6	824 **
D	1311.4	4-1=3	337.1 **
T×D	3580	9×3=18	199 **
B(TD)	12.94	56	7.2
T D B	22679	84-1=83	

F: 要因 (**) 危険率 1% で有意
D.F.: 自由度 S.S.: 総変平方和 M.S.: 平均平方和
T: 音響時間 D: 経過日数 T×D: 交互作用
B(TD): 誤差

$$|D| = \sqrt{2CF(x) V_0}$$

差の検定

1 型	T	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
T ₁		*	*	*	*	*	*	*
T ₂	*		*	*	*	*	*	*
T ₃	*	*		*	*	*	*	*
T ₄	*	*	*		*	*	*	*
T ₅	*	*	*	*		*	*	*
T ₆	*	*	*	*	*		*	*
T ₇	*	*	*	*	*	*		*

* $|D| \geq 46$ 危険率 5% で有意
* $|D| \geq 61$ 危険率 1% で有意

$$|D| = \sqrt{2 \times 12 \times 22 \times 4.02} = 46$$

$$|D| = \sqrt{2 \times 21 \times 22 \times 4.02} = 61$$

第 10 表

要因分析表

F	S.S.	D.F.	M.S.
T	2646	6	441 **
D	9132	3	3044 **
T×D	2731	18	152 **
B(TD)	100.7	56	1.8
T D B	15516	83	

(** 危険率 1% で有意)

差の検定

2 型	T	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
T ₁		*	*	*	*	*	*	*
T ₂	*		*	*	*	*	*	*
T ₃	*	*		*	*	*	*	*
T ₄	*	*	*		*	*	*	*
T ₅	*	*	*	*		*	*	*
T ₆	*	*	*	*	*		*	*
T ₇	*	*	*	*	*	*		*

$$|D| = \sqrt{2 \times 12 \times 4.02 \times 18} = 42$$

* $|D| \geq 42$ 危険率 5% で有意

* $|D| \geq 55$ 危険率 1% で有意

2 型	D	D ₁	D ₂	D ₃
D ₁		*	*	*
D ₂	*		*	*
D ₃	*	*		*
D ₄	*	*	*	

* $|D| \geq 55$ 危険率 5% で有意

* $|D| \geq 55$ 危険率 1% で有意

$$|D| = \sqrt{2 \times 21 \times 4.02 \times 18} = 55$$

第 1 1 表
要因 分析表

3 型			
F	S. S.	D. F.	M. s.
T	91	6	15.17
D	1466	3	489.67**
T×D	468	18	26.00*
B(TD)	539	56	9.62
TDB	2564	83	

(** 危険率 1% で有意)
(* 危険率 5% で有意)

差の検定

3 型				
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
D ₁		*	*	*
D ₂	*			*
D ₃	*			*
D ₄	*	*	*	

* $|D| \geq 40$ 危険率 5% で有意

$$|D| = \sqrt{168.84 \times 9.62} = 40$$

第 1 2 表
要因 分析表

4 型			
F	S. S.	D. F.	M. s.
T	777	6	130 **
D	3431	3	1144 **
T×D	1010	18	56 **
B(TD)	681	56	12
TDB	5899	83	

(** 危険率 1% で有意)

差の検定

4 型							
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇
T ₁				*	*	*	*
T ₂				*	*	*	*
T ₃				*	*	*	*
T ₄	*	*	*		*	*	*
T ₅	*	*	*	*		*	*
T ₆	*	*	*	*	*		*
T ₇	*	*	*	*	*	*	

* $|D| \geq 34$ 危険率 5% で有意

*' 10% で有意

$$|D| = \sqrt{96.48 \times 12} = 34$$

4 型				
	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄
D ₁		*	*	*
D ₂	*			*
D ₃	*			*
D ₄	*	*	*	

* $|D| \geq 45$ 危険率 5% で有意

$$|D| = \sqrt{168.84 \times 12} = 45$$

きない点があることを感じたので、便宜上上述の細胞形態百分率として、その推移を表現した。しかし核酸の量的変動を本法から論ずることは非常に危険であると考えられるので、さらに要因分析を行った。各型による要因分析の結果は第 9 表、第 10 表、第 11 表および第 12 表の通りであり、この分析結果より、それぞれ危険率 1% 以下で有意であることがわかった。さらに各型についても差の検定をおこなったが、対照群に比較して負荷時間による危険率は 5% および 10% で、おのおの有意であり、経過日数による危険率は同様 5% および 10% で有意であった。

第 2 節 Feulgen 反応による観察

第 1 項 対 照 群

一規定塩酸を作用させた群では、ラセン神経節細胞は、核のみが紫色発色をなし、核内は粗大および微細顆粒によってみたされ、核内顆粒物質は比較的平等に散在していた。一規定塩酸を作用させない群では全然染色されず、DNA 陰性を示していた。

第 2 項 音響負荷群

1000cps 135db の純音負荷群では Feulgen 反応による変化は、MG-PY 染色による RNA の変化ほど著明に検鏡像では出現しなかった。

1) 音響負荷後 3 日目の群：音響負荷時間 5 分～3 時間の各群共に検鏡的には著明な変化は認めなかった。

2) 音響負荷後 1 週間目～3 週間目の群：音響負荷時間 5 分～30 分の各群はすべて検鏡的には変化を認めなかった。1～3 時間負荷の各群では、すべてやゝ染色性の低下が認められた程度である。

第 3 節 紫外線顕微鏡写真による観察

組織切片はグリセロール (屈折率 $nd_{1.458}$) を用い、

第 5 図 波長に対する露光時間の関係

石英スライドガラスの上のせて 260m μ の紫外線写真を撮影した。

吸光像作製に先立つて、波長に対する露光時間の測定をおこない第5図のごとき結果をえた。すなわち適正露光時間として25"を使用した。使用したフィルムはFUJI NEOPAN PLATE である。

第1項 対 照 群

紫外線の吸光性は核におけるよりも細胞質において強く現われ、そのうちでも核周辺部においてやゝ強く現われていた。総じてプリン・ピリミジン塩基（核酸）は細胞質に強く存することを示している（写真31）。

第2項 音響負荷群

1) 音響負荷後3日目の群：5分間の音響負荷例では対照群の場合と殆んど差はみられないが、それ以上の音響負荷群では、その負荷時間の増大するにつれて、細胞質吸光像は増加を示した。すなわち30分間音響負荷群では、やゝ細胞質核膜周辺部にプリン・ピリミジン塩基の濃厚環状像を認め（写真32）、さらに長時間負荷（1～3時間）群では、特に著明な吸光環状像を認めた（写真33は、1時間負荷後3日目、写真34、写真35は、それぞれ2、3時間負荷後3日目）。しかしいずれの場合にも核には認むべき変化はみられなかった。

2) 音響負荷後1週間および2週間群：対照群にくらべ音響負荷時間の大きなる程、細胞質吸光像は減少を認め3日目の群にみられたプリン・ピリミジン塩基の細胞質核膜周辺部にみられた濃厚像は消失していた。しかし核には著明な変化はみられなかった（写真36は、5分負荷後1週間目、写真37は、30分負荷後1週間目、写真38、39、40は、それぞれ1時間、2時間、3時間負荷後1週間目のものを示している。又写真41は、5分負荷後2週間目、写真42は、30分負荷後2週間目、写真43、44、45は、それぞれ1時間、2時間、3時間負荷後2週間目のものを示している）。

3) 音響負荷後3週間群：音響負荷時間5分～15分群では、1～2週群のそれよりも細胞質における吸光像は回復を認め、特に細胞質核膜周辺部にプリン・ピリミジン塩基の濃厚像を認めた。しかし30分音響負荷群では、あまり1～2週群に比して著明な回復はみられず細胞質の像は全体として減少を示していた。長時間負荷群ではその回復は認められず1～2週間目のものと同じく、細胞質の吸光性は減少を示したまゝであり、染色法による像と一致した所見がみられた。しかし長時間音響負荷群においても核においてはあまり認むべき変化はなかつ

た（写真46は、5分負荷後3週間目、写真47、48、49、50、51、52はそれぞれ10分、15分、30分、1時間、2時間、3時間負荷後3週間目のものを示している）。

第5章 考 按

最近の機械文化の発達は、人類の生活に革命的な恩恵を与えた反面、われわれの聴覚に対して予期せざる影響を与えつゝあり、この影響はやがては、われわれを永久的難聴の結果にいたらしめることは、ふだんの臨床経験に照しても明かな事実であると同時に、われわれの憂慮すべき問題である。一方、実験室内における acoustic trauma の研究においても、その形態学的な病理組織学的研究は古くから行われてきたが、その病変の可逆性の限界については、それが甚だ困難なためあつて研究上の進歩はあまりみられない。しかし音響による聴器病変の可逆性の限界を知ることが学術的興味からのみならず臨床的にも極めて重要なことである。そのためには、聴器の代謝過程に注目することが必要となつてくる。このような観点から、聴器の細胞化学の研究の一環として核酸をとりあげ、音響刺激によるラセン神経節細胞内の核酸の時間的変動を追求したわけである。この問題に関連して河田（1936）³⁾ は持続性強高音響負荷後のテンデクネズミラセン神経節細胞について、独自のニッスル氏小体染色法をおこなつてニッスル氏小体の変化を観察し、その消失、萎縮、細胞核の変化を認め、その結果としてニッスル物質の復帰により神経節細胞は維持されると解釈した。その後 Caspersson（1940）⁴⁾ はニッスル氏小体は RNA にほかならないことを証明し、また丸井（1948）¹⁴⁾ はニッスル氏小体の研究の結果、本小体はスクレオプロテイド顆粒であるとのべている。その後 Caspersson（1941）¹⁵⁾ は、細胞の核酸が蛋白合成に重要な意義をもつことを指適し、こゝに至つて細胞化学は今日の発展にいたる基礎を確立された。その後 Hamberger-Hydén（1945）⁶⁾ らにより、6000cps, 80db, 3時間の純音刺激をおこなつたテンデクネズミのラセン神経節細胞では、細胞化学および紫外線吸収像による検索の結果、細胞質内 Nucleotide および Protein の変化は、最初の24時間後より徐々に始まり、1～2週間でその減少は最高となり、3週間でほぼ正常に回復することが報告された。中村（1955）⁶⁾、水越（1956）⁷⁾ らは聴中枢の組織化学的研究をおこない、MG-PY 染色による神経細胞 RNA の分布について調べ、音響刺激により、細胞質の平等分布濃染型が減少し、平等分布淡染型の増加と核周囲限局型を認め、RNA 代謝の亢進像が

把握できたとのべている。安藤 (1958)¹⁰⁾ も、同様 MG-PY 染色による神経節細胞 RNA の分布について調べ、同様の結果を報告している。Spoendlin (1958)¹⁶⁾ はテンダクネズミ 6 匹を使用し、30 分間、騒音 125 db を負荷して 24 時間後に、電子顕微鏡的に外毛細胞の apical mitochondria の封入体の著明な増加と外毛細胞の神経終末の膨化を認めている。片桐 (1959)⁹⁾ は、紫外線顕微分光光度計による内耳組織内核酸の研究をおこなった結果、騒音 110～120phone、一日 8 時間あて負荷をおこなったものでは Hydén のような著明な変化はみられなかったと報告している。森 (1958)⁸⁾ は、一日 8 時間の騒音曝露によって MG-PY 染色では平均して反応期、飢餓期および回復期を認めることを報告している。宇野 (1958)¹⁷⁾ は Direct ultraviolet microphotometry を使つて音響刺激により、蝸牛神経中枢細胞質 RNA の一過性増加の後減少することを認め、蛋白の消耗が核酸代謝系の活性化をはかるためではないかとのべている。宇野は、この一過性増加後に減少することとは従来の文献にもみず興味深い成績であるとのべている。私は刺激音圧と刺激時間との両因子と、ラセン神経節細胞内核酸の変動との関係を探るために、純音 1000cps, 135db の一回の音響負荷により、ラセン神経節細胞の核酸が音響刺激時間との関連のもとにいかなる量的変動を示すかについて、われわれの教室の聴覚疲労の研究の一端として、probe tube を鼓膜直前に挿入して音圧の測定を正確におこないながら本実験を企てた。先ず標本の作製について考察するに、私の実験では、試獣はすべて実験直後断頭した後大藤式内耳灌流固定をおこなった。標本のうち、MG-PY 染色用としては、Carnoy 氏固定液を使用し、Feulgen 反応用としては昇汞氷醋酸液を使用した。大藤¹⁹⁾ は大藤式内耳灌流固定をおこなつてラセン神経節細胞の変化を速求した結果 3 時間後迄は著明な変化をみなかったことを報告しており、山川²⁰⁾、猪狩²¹⁾ らも同様の結果を報告している。私の結果でも、固定法については組織化学的検査に直接障害をあたえるような死後変化はみられなかった。脱灰については、Hamberger-Hydén⁵⁾ らおよび Hammer²²⁾ は $\text{La}(\text{OOCCH}_3)_3$ 液を使用しているが、脱灰操作はすべて組織化学的研究の目的には適した操作とはいへないので、私の実験では細心の注意のもとに穀軸を含む聴神経を取り出し、さらに Carnoy 固定液で 1 時間 30 分固定、または昇汞氷醋酸液にて一昼夜固定をおこなった。Feulgen 反応のために使用した固定液は、

塩酸の加水分解に要する時間が固定液によつて異なるが、昇汞氷醋酸液は特に強い加水分解のおこなわれる時間が短時間であるために、私は昇汞氷醋酸液を用いた。²⁾ また包埋の条件が組織内核酸にあたえる影響を一定とする目的で、パラフィン 56～58°C のものを使用した。また MG-PY 染色法の核酸染色機構を考えるに、これは核蛋白の分子量が最も大きい因子となつている。すなわち DNA がメチル縁好性を、RNA がピロニン好性をうることも DNA と RNA の分子量の差によるものと考えられている。第 13 表のごとく核酸染色では、その重合度を対象として考えなければならない。RNA の Polynucleotide も Oligonucleotide の状態に近くなれば、当然染色性が失われてくるので正確な核酸染色をなすとはいへない。この点紫外線吸収像では、RNA の核酸の分子量は重要な意味はなく、それを左右するのは、あくまでもプリン・ピリミジン塩基であり、この点より核酸染色にかゝる程度の低分子化した Polynucleotide も容易に立証しえる理点をもつている。この観点から、私は核酸染色の他に、オリンパス製 MOB 型紫外線顕微鏡を使用して検索したが、この顕微鏡は反射対物鏡および反射コンデンサー（無収差反射対物鏡を逆向きに取付けたもの）を装着した顕微鏡にして、これと写真撮影装置とを架台の上にセットし、架台の下には水槽プリズムを使用した紫外線モノクロメーターを備えて 2500Å～5500Å をコンデンサーに入れられるようにし、光源には超高圧水銀灯を使用したものである。

第 13 表

MG-PY 染色の分子量による結果性

	DNA		RNA
	高重合	低重合	
ピロニン染色	—	沈殿性色素塩 (ピロニン好性染色)	沈殿性色素塩 (ピロニン好性染色)
メチル縁染色	沈殿性色素塩 (メチル縁好性)	—	—
ピロニン・メチル縁染色	沈殿性色素塩 (メチル縁好性)	沈殿性色素塩 (ピロニン好性染色)	沈殿性色素塩 (ピロニン好性染色)

次に実験成績を考察するに、私の実験では、細胞質の RNA は音響負荷により一過性に増加した後、減少、ついで回復という比較的顕著な成績を証明することができた。すなわち 1000cps, 135db の音響負荷群では、負荷時間 5 分～3 時間では、負荷時間の増加につれてすべて

負荷後3日目において、MG-PY 染色像を1型~4型に分けてその各型の百分率を求めた所見では、おのおの1型および3型の増加をみた。すなわち5分間負荷群では、1型65%、3型13%、10分間負荷群は1型68%、3型16%にして、これらは対照群(1型=66%、3型=15%)と較べて大差はないが、15分間負荷群では1型70%、3型20%、30分間負荷群では1型72%、3型21%、1時間負荷群では1型74%、3型20%、2時間負荷群では1型73%、3型20%、3時間負荷群では1型75%、3型20%と、いずれも音響負荷時間の延長するにつれて細胞質のRNAの増加した細胞比率は増大している。しかしこの所見はそのまゝ量的見積りすることは危険率が高いので、これらのえられた数値の要因分析をおこなつて検定したが、その結果は先にしめた通りで、それぞれ危険率1%以下で有意であることがわかつた。さらに1型~4型についても差の検定をおこなつたが、負荷時間による危険率は5%および10%でおのおの有意であり、経過日数による危険率は同様5%および10%で有意であつた。一方、260m μ の紫外線顕微鏡像においては、音響負荷15分間頃より、細胞質核膜周辺部の吸光像が現われはじめ、負荷30分より負荷時間の延長するにつれて、この吸光像は著明に出現する。すなわち染色反応像と紫外線吸光像との結果は共に一致して核酸の増加を示した。

こゝで神経細胞の機能に関連する蛋白の消長並びに、それに対する核酸、殊にRNAの意義について考察するに、Caspersson以来多数の学者により核酸が蛋白合成に大きな役割を果していることは既に定説となつており、殊にHydénはRNAなくしては蛋白の合成は順調に営まれないことをのべている。またHamberger-Hydénらによれば、一回の聴覚刺激によつて減少した蛋白は、一定の期間の後には正常の蛋白に回復している。この蛋白減少の期間において、蛋白合成に必要なRNAの機能が発揮されなければならない筈である。活動神経細胞において蛋白が減少し始めれば、同時にRNAの代謝系は活性化されなければ、蛋白の補給が順調に営まれないはずであるから、私のえた成績のようにRNAの増加の時期があつてもよいものと考えられる。実際宇野は神経細胞の刺激に応じた変化は、中枢路の高位、低位の部位により大きな差のあることを実験的に見出しており、ラセン神経節細胞は彼の実験よりすれば低位にあるために、代謝系の活性化度は時間的にも、量的にも早くかつ甚だしいのではないかと

べている。私の実験ではオリンパス製MOB型の構造上より量的測定はできなかつたが、写真黒化度を同一とした条件下では、写真上の所見は核酸の増加を示していた。しかも音響負荷時間15分以内のものでは、RNAの増加は認められ難いが、15分間以上の負荷時間においては、負荷時間の増加にほぼ比例してRNAは増加するものと思われる。音響負荷後1週間目ないし2週間目のものでは、総じて核酸物質の減少を認めた。この点は諸学者の発表と一致した成績である。たゞしこの減少の度合いは、音響負荷時間の短いものでは少なく、負荷時間の増加するにつれて著しく、殊に音響負荷1~3時間の場合においてはRNAの著しい減少を認めた。しかし音響負荷3週間目のものではMG-PY染色、および紫外線写真による成績では、音響負荷5分~15分間の群では、その核酸物質はほぼ対照群の正常値近くまで回復を認めたが、音響負荷時間30分間以上の群では回復にいたらず、殊に1時間以上3時間負荷群ではなおRNAの著明な減少(35%)を示して容易に回復しがたいことを示した。この事実は、刺激音圧は一定でも刺激時間の延長に伴う刺激条件が高度となるにつれて、細胞蛋白の消耗がこう進するために、長時間負荷群(1~3時間負荷)では、音響負荷後3週間目の群でもなおいぜんとして核酸物質の回復がみられないものと考えられる。例えばMG-PY染色像の1~4型の百分率平均によれば、1時間負荷群は1型40%、3型8%(第6表参照)、2時間負荷群は1型38%、3型8%(第7表参照)、3時間負荷群は1型35%、3型7%(第8表参照)であり音響負荷後3週間目においてなお著しい減少を示し、回復がみられない。またこれらの紫外線顕微鏡所見像も同様の傾向を示している。Hamberger-Hydénらはコルト銃による実験では2週間目に核酸減少のピークを認めているが、Hammer²²⁾は同様にコルト銃によるSchock waveの実験後6カ月目のテンデクネズミのラセン神経節細胞においてなお核酸物質の減少を認めている。すなわち過度の刺激ではRNA代謝系の活性化が高度に消耗する結果、このような成績をえたものと考えられる。つぎに核の核酸DNAの音響負荷による推移について考察するに、私の実験方法Feulgen反応では負荷後3週間目の長時間音響負荷群にやゝ減少を認めるようであるが、これはおぼつきりと断定できなかった。宇野¹⁷⁾、Brecht²³⁾、Kaufman²⁴⁾らはMG-PY染色において0.1%リボヌクレアーゼ60°C、60分の処理によつてRNA消化試験を行ったものについての紫外線吸収像に

において DNA がすべて消失する事を報告しており、私の実験における MG-PY 染色で 50°C, 30 分の消化方法でもその DNA の増減をみる事ができなかった。

第6章 結 語

聴器に対する音響刺激の影響を細胞化学的立場から観察するために、刺激音 1000cps, 刺激音圧 135db とし、probe tube により鼓膜直前の音圧を正確に測定しながら実験をすゝめ、この純音刺激がテンデクネズミのラセン神経節細胞の RNA および DNA 代謝におよぼす影響を観察した結果つぎの結論をえた。

1) MG-PY 染色法による核酸の量的変動は紫外線顕微鏡による吸光像とよく一致する。

2) DNA および RNA の音響負荷による変動は、RNA の方が Sensitive であり、DNA についてはみるべき結果がえられなかった。

3) 純音 1000cps, 135db 一回負荷の実験では、その負荷が 15 分～3 時間の範囲内では、その時間が大なる程、負荷後 3 日目にして、MG-PY 染色では細胞質 PY 好性顆粒平等分布濃型および細胞質辺縁部および核膜周辺部等に PY 好性顆粒の濃厚像をみとめ、又紫外線顕微鏡像においてもこれに一致した代謝系の活性化が認められた。

4) 1000cps, 135db, 音響負荷群では負荷後 1 週間目および 2 週間目では MG-PY 染色による PY 好性顆粒の減少を認め、3 週間目にして回復を示してきていた。

5) 1000cps, 135db, 音響負荷 30 分～3 時間群では 1～3 週共すべて MG-PY 染色および紫外線顕微鏡像共に RNA の減少がみられ、特に音響負荷 1～3 時間群では負荷後 3 週間目の群でもなお回復のきざしがみられなかった。

6) 音響刺激によりラセン神経節細胞内の RNA は、刺激後一過性に増加し、第 1～2 週間後において減少し、第 3 週頃に再び増加して回復におもむく傾向を示し、かつその RNA の変動は刺激条件の増大するにつれて著しく、またその回復は著しく遅れる。

文 献

- 1) Yoshii, U.: Experimentelle Untersuchungen über die Schädigung des Gehörorgan durch Schalleinwirkung. Zt. Schr. f. Ohrenk., 58: 201, 1909.
- 2) 山川強四郎: 日本耳鼻咽喉科全書, 第 2 巻, p. 430, 1938.
- 3) Kawata, S.: Experimentelle Studien über die Lärmschädigungen des Gehörorgan. Jap. Journal of medical sciences 12. Oto-Laryngology-Rhinology, Vol. 1, No. 2, p. 77. 1937.
- 4) Caspersson, T.: The reaction between nucleic acid and protein synthesis. Symp. Soc. exp. Biol. 1: 127～125, 1951.
- 5) Hamberger-Hyden: Cytochemical changes in the cochlear ganglion caused by acoustic stimulati-

- on and trauma. Acta Oto-Laryngologie, Suppl. 61: 5～75, 1945.
- 6) 中村文雄: ストマイ性難聴の臨床と病理耳鼻と臨床, 第 3 巻, 第 4 号, p. 227, 1957.
- 7) 水越治: 聴中枢化学の基礎的研究, 日耳鼻, 第 59 巻, 第 1 号, p. 33, 1956.
- 8) 森弘: 騒音に対する螺旋神経節細胞の態度特に核酸の組織化学的研究, 日耳鼻, 昭和 34 年総会号.
- 9) 片桐圭一: 紫外線顕微分光光度計による内耳組織内核酸の研究特に実験的音響外傷について, 日耳鼻, 昭和 34 年総会号.
- 10) 安藤昌人: 音響性外傷に対する Vitamin B₁ の予防的意義に関する実験的研究, 耳鼻と臨床, 第 4 巻, 補冊 6, p. 86, 1958.
- 11) 日本化学会編: 実験化学講座, 24, 生物化学Ⅱ, 九善発行, 昭和 33 年度版.
- 12) 市川収: 細胞化学その理論と術式, 本田書店発行, 昭和 28 年度版.
- 13) Siebenmann F., Entgegnung auf vorstehende Abhandlung von K. Wittmaack: Über experimentelle Schallschädigung etc. Passow-Schäfers Beitr., 9: 38, 1917.
- 14) Marui, K.: A contribution to the Knowledge of cellgranule. Jap. med. J. 1: 155～160, 1948.
- 15) Caspersson, T.: Studie über den Eiweissumsatz der Zelle. Naturwiss., 29: 33～43, 1941.
- 16) Spoendlin.: Submikroskopische Veränderungen am Cortischen Organ des Meerschweinchens nach akustischen belastung. Pract. Oto-Rhino-Laryngo, 20: 197～214, 1958.
- 17) 宇野松雄: 紫外線吸収性より見たる蝸牛神経中枢の核酸成分の研究, 日耳鼻, 第 61 巻, 第 6 号, p. 827, 1958.
- 18) Davis, H. Associates: Acoustic trauma in the guinea pig. Wright Air Development center technical report 53-58, 1953.
- 19) 大藤敏三: 聴器の灌流固定法に就いて, 耳鼻と臨床, 第 2 巻, 第 4 号, p. 186, 1956.
- 20) 山川強四郎: 人体聴器死後の種々な温度と時間における所見, 日耳鼻, 昭和 30 年総会号, p. 154.
- 21) 猪狩統一: 家兎聴器死後変化に関する実験的研究特にコルチ器について, 日耳鼻, 第 55 巻, 第 7 号, p. 491, 1952.
- 22) Gunnar Hammer.: A Quantitative cytochemical study of shock wave effects on spiral ganglion cells. Acta, Oto-Laryngologica, Suppl. 127, 1956.
- 23) J.N. Davidson: 石田政弘訳: 核酸の生化学, 共立出版社, 昭和 34 年度版, p. 74.
- 24) Kaufman: Cold Spring Harb. 14: 85, 1950.

稿を閉ずるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった恩師中村四郎教授に深甚なる謝意を表します。又種々御援助を頂いた本学病理学教室馬場正郎教授、衛生学教室白石信尚助教授に深く感謝致します。本研究に御協力をいただいた教室員菊地、山藤、中本の諸兄に心からなる謝意を表します。

なお本論文の要旨は、昭和 35 年 4 月 24 日日本耳鼻咽喉科学会関東地方会大会第 38 回において発表した。

(原稿到着＝昭和 35.5.27 日)

石 山 論 文 付 図 (I)

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

石 山 論 文 付 図 (Ⅰ)

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12

Fig. 13

Fig. 14

Fig. 15

Fig. 16

石 山 論 文 付 図 (Ⅲ)

Fig. 17

Fig. 18

Fig. 19

Fig. 20

Fig. 21

Fig. 22

Fig. 23

Fig. 24

石 山 論 文 付 図 (Ⅳ)

Fig. 25

Fig. 26

Fig. 27

Fig. 28

Fig. 29

Fig. 30

石 山 論 文 付 図 (V)

Fig. 31

Fig. 32

Fig. 33

Fig. 34

Fig. 35

Fig. 36

Fig. 37

Fig. 38

石 山 論 文 付 図 (VI)

Fig. 39

Fig. 40

Fig. 41

Fig. 42

Fig. 43

Fig. 44

Fig. 45

Fig. 46

石 山 論 文 付 図 (Ⅶ)

Fig. 47

Fig. 48

Fig. 49

Fig. 50

Fig. 51

Fig. 52