成熟蝸牛コルチ器支持細胞の修復機転に関する細胞動態的研究 ——外有毛細胞障害蝸牛における支持細胞の核 DNA 合成から——

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：村上 泰教授）

村 上 匡 孝

STUDY OF THE MECHANISM OF SUPPORTING CELLS REPAIRING THE ORGAN OF CORTI IN TERMS OF CELL KINETICS ——NUCLEAR DNA SYNTHESIS OF SUPPORTING CELL OF THE ORGAN OF CORTI IN THE COCHLEA DAMAGED BY NITROMIN ADMINISTRATION ——

MASATAKA MURAKAMI, M.D.

Department of Otolaryngology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto

^3H -thymidine autoradiography in vivo was carried out on normal mature mice, whose organs of Corti were securely damaged by Nitrogen Mustard-N-oxide (nitromin). The cell kinetics of supporting cells of the organ of Corti were examined and relation between these changes and mechanism of supporting cells to maintain the organ of Corti was discussed in this paper.

A few grains in various kinds of supporting cells in S stage, which were not found in control mice without nitromin injection, were discovered. Those were detected in Hensen's cell, Deiters' cell, Claudius' cells, and inner phalangeal cell. Mitosis was seen in one Claudius' cell in addition. Therefore some supporting cells seem to be able to synthesize DNA and proliferate in the acutely damaged organ of Corti even in mature cochlea and those in G_0 stage begin to go around cell cycle as occasion demands.

Although labelled supporting cells decreased over time, the portion of supporting cell is likely to change in proportion as the extension of damage in the organ of Corti. If this new dynamic change of cell kinetics in the acutely damaged organ of Corti means the reaction to repair the organ of Corti, the supporting cells seem to have a reasonable role to maintain the organ of Corti including repairment of reticular lamina.

成熟蝸牛, コルチ器修復機転, 支持細胞, 核 DNA 合成

Key words: ^3H -thymidine autoradiography

A 94—0386—23010

ナイトロミン (Nitrogen Mustard-N-oxide)

1. 結 言

胎生期と異なり成熟蝸牛についての細胞動態に関する研究は少なく、成熟蝸牛とりわけコルチ器は、細胞動態上極めて静的であると信じられていた感がある。Yasuda らは顕微蛍光核 DNA 定量法を蝸牛に導入し¹⁾、剖検で得たヒトのコルチ器の一部に、ヘンゼン細

胞の多倍体細胞を発見した²⁾。核の多倍体化現象は過去のある時点で核 DNA 合成が存在したが分裂しないで留まっている状態³⁾と考えられており、成熟蝸牛のコルチ器支持細胞は、神経細胞のように分裂増殖しない静的な細胞集団 (static cell population⁴⁾) には属しないと考えられる。一方、有毛細胞が障害されたコル

図1 実験方法

(^3H -thymidine・ナイトロミンの投与スケジュール)

^3H -thymidine は $2\mu\text{Ci/g}$ を 8 時間毎に 9 回投与する cumulative labeling とした。ナイトロミンは 40mg/kg (NMO40) または 60mg/kg (NMO60) を 1 回のみ投与した。実験 I は標識直後の動物、実験 II は標識からの時間が経過した動物を対象とし、断頭までの時間を変えて検討した。

チ器では形態的に代償機転と考えられる支持細胞の膨化像⁵⁾が知られることから、支持細胞の細胞動態上の変化は加齢現象の一つかあるいはコルチ器の構造維持に関係すると推測されている²⁾。本研究はこの考えを進め、支持細胞の細胞動態上の動きは障害を受けたコルチ器の修復に関連するのではないかという仮説に立って、障害負荷後の反応として支持細胞に細胞動態上の変化が生じるかを調べ、コルチ器修復機転の動的把握の一助とすることを目的とした。実験には、外有毛細胞を確実かつ選択的に障害することが定説となっている Nitrogen Mustard-N-Oxide^{6,7)} (ナイトロミン: 以下、NMO と記す) をコルチ器障害の手段とし、コルチ器障害を加えた成熟動物モデルに ^3H -thymidine autoradiography を施行して核 DNA 合成が存在する細胞を観察し、細胞増殖を伴った再生系の反応があるかを検討した。

2. 材料、方法 (図1)

動物には成熟 ICR-JcL 系雄マウス (6 週齢、平均体重 18g) を用いた。NMO は注射用蒸留水に溶解して腹腔内に投与した。核 DNA 合成細胞の標識は Cumulative labeling とし、 ^3H -thymidine の 1 回注射量を $2\mu\text{Ci/g}$ 体重として、5%ブドウ糖液に希釈し、0 時、8 時、16 時の 8 時間間隔で 3 日間連続して腹腔内に投

図2 NMO 投与後のコルチ器 (NMO₄₀)

40mg/kg のナイトロミンを 1 回投与し標識終了から 3 日後に断頭した動物のコルチ器 (頂回転) である。外有毛細胞が消失しており、コルチ器の障害像を認める。断頭時期によって核濃縮から細胞の脱落まで程度の差があるが、ナイトロミンを投与したすべての動物に外有毛細胞の変性を形態的に確認した。

与した。

実験 1: ^3H -thymidine 標識の直後における核 DNA 合成細胞を検討するため、最終標識から 2 時間後のコルチ器を、NMO 投与量の異なる動物群で比較した。第 1 群は 60mg/kg 体重の NMO を 1 回投与し、その 1 時間後から ^3H -thymidine 標識を行い断頭した群である (NMO₆₀)。第 2 群は 40mg/kg 体重の NMO を 1 回投与した後に ^3H -thymidine 標識を行い断頭した群である (NMO₄₀)。対象群となる第 3 群は、NMO を投与せずに ^3H -thymidine の Cumulative labeling のみを行い断頭した群である (Control)。3 群ともに NMO 投与の 67 時間後に断頭したことになる。

実験 2: ^3H -thymidine の Cumulative labeling の期間に核 DNA 合成を行った細胞の経時的な位置の変化を検討するため、60mg/kg 体重の NMO を投与した場合 (NMO₆₀) と NMO を投与しない場合 (Control) を比較した。NMO₆₀ では、実験 1 と同様に 60mg/kg 体重の NMO を 1 回投与した後に ^3H -thymidine の Cumulative labeling を行い、断頭までの時間を 1 日

後、3 日後、5 日後、7 日後、14 日後、21 日後とする 6 群に分けた。Control では、 ^3H -thymidine の Cumulative labeling のみを行い、断頭までの時間を 1 日後、3 日後、5 日後、7 日後、14 日後とする 5 群に分けた。

すべての動物について断頭後は以下の操作を行った。まず、直ちに両耳骨胞を摘出し、生理食塩水中で蝸牛を露出した。卵円窓から 5% glutaraldehyde 液を注入後、5% glutaraldehyde 液中に 72 時間において固定した。次に、リン酸緩衝液を用いた飽和 Na-EDTA 溶液中に 72 時間において蝸牛全体を脱灰した。エタノール上昇系列で型のごとく脱水した後、glycolmethacrylate 樹脂に包埋し、LKB ultratome にてガラスナイフを用いて蝸牛軸に平行に 3 μm の厚さに薄切した。autoradiography の positive control として骨髄を含む組織を、negative control として ^3H -thymidine を投与しないマウスで同方法で作製した蝸牛切片を、作製した切片と共に同じスライドガラス上に貼付配列した。すべてのスライドガラスは写真感光乳剤 (Kodak-NTB2) で dipping 処理し、暗箱中で 4 週間

	無 負 荷 (対照群)	ナイトロミン 40mg/kg	ナイトロミン 60mg/kg
コルチ器 支持細胞	0 % (0/3840)	0.14 % (3/2240)	0.29 % (6/2080)
骨 髄	83 %	33.4 %	3 %

A: ^3H -thymidine 最終投与から 2 時間後に断頭した群

^3H -thymidine 最終投与 から断頭までの時間		1 日	3 日	5 日	(1 週) 7 日	(2 週) 14 日	(3 週) 21 日
無 負 荷 (対照群)	コルチ器 支持細胞	0 % (0/1140)	0 % (0/1700)	0 % (0/1420)	0 % (0/960)	0 % (0/1580)	—
	骨 髄	35 %	8.2 %	3.5 %	0.12 %	0.03 %	—
ナイトロミン 60mg/kg	コルチ器 支持細胞	0 % (0/1824)	0.1 % (2/2064)	0.05 % (1/2032)	0.09 % (1/1056)	0 % (0/1120)	0 % (0/1440)
	骨 髄	25.3 %	20.4 %	10.9 %	2 %	0.13 %	0.06 %

B: ^3H -thymidine 最終投与からの時間経過群

図 3 ^3H -thymidine による標識細胞率の比較

A: 実験 1 (標識直後に断頭した動物群):

ナイトロミンを投与した群に支持細胞の標識細胞を認め、投与量が多いほど標識率も高かった。

B: 実験 2 (標識後に時間が経過した動物群):

標識直後に比して標識率は低くなり、標識された細胞は長期にわたって留まらなると考えられる。

図4 Deiters'細胞にみられた標識細胞
(ナイトロミン 40mg/kg 投与, 最終標識の
2時間後断頭)
第3列の外有毛細胞に隣接した Deiters'
細胞の核に ^3H -thymidine の取り込みを認
め(矢印), 周囲の外有毛細胞はやや萎縮し
ている. この蝸牛では基底板上皮にも標識
細胞を認める.
(OHC: 外有毛細胞, IHC: 内有毛細胞)

露光させた後に, 現像, 定着処理を施し, 十分な水洗
の後に HE 染色を施して封入し, 光学顕微鏡下に観察
した. control 切片における細胞核の標識が良好なも
のを完成したオートラジオグラムとして採用し, コル
チ器における銀粒子の集積を認める細胞(以下, 標識
細胞と記す)の種類や位置およびその変化を詳細に観
察し, 活発な核DNA合成と増殖, すなわち, 確実に
 ^3H -thymidine を取り込む細胞モデルである骨髄の細胞
と比較して検討した.

3. 結 果

NMO を投与した動物群について, 実験 1 では
 NMO_{40} , NMO_{60} のいずれの動物においても外有毛細胞
の変性像を認め(図 2), NMO によって確かにコル
チ器障害が生じたことを形態的に確認した.

NMO を投与しない control 群のすべてにコルチ器
支持細胞の標識細胞を全く認めなかったのに対して,

図5 Hensen's細胞にみられた標識細胞
(ナイトロミン 40mg/kg 投与, 最終標識の
2時間後断頭)
このコルチ器では外有毛細胞が脱落・消失
し, 外有毛細胞に近く内リンパに面した
Hensen's細胞の核に ^3H -thymidine の取
り込みを認めた(矢印).
(OHC: 外有毛細胞, IHC: 内有毛細胞,
BM: 基底板)

NMO 投与群では最終標識後 2 時間後, 3 日後, 6 日
後, 8 日後, 10 日後に断頭した動物のコルチ器の中に
核標識された支持細胞を発見した. 観察したコルチ器
支持細胞の総数を分母とし, 標識された支持細胞の総
数を分子とした, 細胞の占める割合(標識細胞率)を
図 3 に示す.

標識直後に断頭した群について(実験 1): コルチ器
支持細胞の標識率を, 骨髄の細胞の標識率と比較する
と, 骨髄では核標識率は NMO 投与量が多い群ほど著
明に低いのにに対して, コルチ器支持細胞においては
NMO 投与量が多い群ほど標識率が高いという結果を
得た. 標識された支持細胞は, NMO_{40} , NMO_{60} とも
に観察した 6 耳中の 3 耳において認められ, 部位とし
ては, 頂回転に多く基底回転には認めなかった. 標識
された支持細胞の種類は, NMO_{40} では, 外有毛細胞の
周囲の支持細胞であるダイテルス細胞, ヘンゼン細胞,
中でも外有毛細胞に隣接した標識細胞が特徴的であり
(図 4, 5), また, 内有毛細胞に隣接する内指節細胞

図6 内毛細胞周囲の支持細胞の標識細胞
(ナイトロミン 40mg/kg 投与, 最終標識の
2 時間後断頭)
内指節細胞と思われる細胞の核に ^3H -
thymidine の取り込みを認めた(矢印)。外
有毛細胞には軽度の萎縮所見を認めるが,
内毛細胞には形態上の変化を認めない。
(OHC: 外有毛細胞, IHC: 内毛細胞,
BM: 基底板)

と思われる標識細胞(図6)も認めた。NMO₆₀ではヘンゼン細胞とクラウドウス細胞に標識細胞を認め、内指節細胞やダイテルス細胞など有毛細胞に隣接した標識細胞は認めなかった。一部のクラウドウス細胞には mitosis 像を呈する標識細胞を認めた(図7)。図4では標識されたダイテルス細胞周囲の外有毛細胞が萎縮、図5では標識されたヘンゼン細胞周囲の外有毛細胞が脱落しており、標識された支持細胞に隣接した外有毛細胞は核濃縮から細胞全体の萎縮や脱落まで様々な変性所見を呈していた。

最終標識から2時間以上時間が経過した群について(実験2): 最終標識から2時間後に断頭した群に比べて時間経過群では、標識率は明らかに低くなっていたが、7日後(NMOを投与してから10日後)までの断頭群に標識細胞を認めた。標識細胞の大半はクラウドウス細胞であり(図8)、ヘンゼン細胞の標識細胞はクラウドウス細胞に近いものであった。ダイテルス細胞や内指節細胞など有毛細胞に隣接した標識細胞は認め

図7 Mitosis 像を呈する Claudius' 細胞
(ナイトロミン 60mg/kg 投与, 最終標識の
2 時間後断頭)
外有毛細胞は萎縮顕著で変性が強いが、コ
ルチ器でも外側に位置する Claudius' 細胞
に Mitosis の像とそれに一致した銀粒子の
集積を認めた(矢印)。
(OHC: 外有毛細胞, DT: Deiters' 細胞,
HC: Hensen's 細胞, BM: 基底板)

図8 Claudius' 細胞にみられた標識細胞
(ナイトロミン 60mg/kg 投与, 最終標識の
5 日後に断頭)
60mg/kg のナイトロミンを投与した群で
標識された支持細胞は Claudius' 細胞のみ
であり(矢印)、コルチ器の外側に位置する
細胞が多い傾向があった。

ず、時間経過群では外有毛細胞からより遠く離れた支持細胞が標識されていた。

4. 考 察

1) ナイトロミンとコルチ器障害

耳鼻咽喉科領域ではNMOの副作用である蝸牛障害が目目され、形態や電気生理がモルモットを用いて研究され、耳毒性の詳細なメカニズムは不明ながら特

微的な外有毛細胞障害が知られている。角田⁶⁾は NMO 投与と外有毛細胞の形態的変性を詳細に検討し、5mg/kg 以上の NMO を 1 回投与するだけでコルチ器の外有毛細胞のみが選択的に傷害され動物個体差がないこと、投与量が多いほど障害された外有毛細胞が多くなるが、20mg/kg 以上では障害は拡大しないことを報告している。片野⁷⁾は NMO を投与して 24～48 時間後のコルチ器の外有毛細胞障害を詳細に観察し、障害は蝸牛底側（基底回転）の内側第 1 列から始まり、外有毛細胞形態に初期変化が出現した段階からダイテルス細胞の膨化像が観察されることを報告し、NMO は外リンパからコルチリンパを経て外有毛細胞に到達すると推察している。機能面から朝隈⁹⁾は 20mg/kg の NMO を静注して 2～4 時間を経過してからブライエル反射が低下し始め、投与量を 80mg/kg 以上にしても内耳障害が発現するまでに 60～90 分を要することを報告し、蝸牛内直流電位 (EP) について Asakuma ら⁹⁾は、NMO を投与して 3～6 時間後から低下し 24 時間後に最低となり 14 日後には NMO 投与前のレベルまで回復する現象を報告している。そして、NMO の投与量を 20mg/kg から 80mg/kg に増やしても EP の変化は大きくならないことから、EP の低下は NMO 投与量に依存しないこと、さらに、血管条の変化を認めないことから、コルチ器の変性が EP の変化に大きく関与していることを推論した。コルチ器の変性について川出ら¹⁰⁾は、外有毛細胞の障害は NMO 投与後 4～7 時間から始まり 24 時間後には完成していること、NMO を投与後 2～4 時間の間は耳介反射閾値の上昇を認めるが外有毛細胞の形態的異常は認めないことから、形態的障害に先行する機能的障害の存在を強調している。

支持細胞の変化に関しては、ダイテルス細胞やヘンゼン細胞の膨化やヌエル腔への突出所見が観察され⁶⁾⁷⁾、カナマイシンの反復投与による障害蝸牛に認められる代償性肥大⁵⁾と類似した所見が報告されているが、マウスに NMO を投与した蝸牛障害の実験報告はない。本研究は NMO によって有毛細胞障害を惹起させ、その結果起こると予想されるコルチ器構成細胞の増殖を伴った代償性変化を捉えることが目的であったので、NMO の投与量は種差を考慮してモルモットより多めに、LD₅₀ の 1/2 を基準に 40mg/kg と 60mg/kg の 2 種類とした。その結果、40mg/kg、60mg/kg のいずれの投与量でも NMO の 1 回投与のみで、外有毛細胞を中心としたコルチ器障害を形態的に確認すること

ができた。従って、今回の投与量は本研究に適すると判断でき、コルチ器障害のモデルとして良いと考える。

2) ³H-thymidine autoradiography 法の実用

³H-thymidine autoradiography は、同一切片上で細胞形態と細胞動態を同時に観察できるので、動物モデルでコルチ器の細胞動態を検討するには顕微蛍光測光法よりも有用と考えられる。理論や手法について文献的に⁴⁾¹¹⁾¹²⁾まとめる。in vivo 標識では投与された ³H-thymidine は数回の体内循環で全身に一樣に行き渡り、核 DNA 合成はきわめて短時間に行われ、DNA 合成に用いられた thymidine が他の未標識 thymidine base と置換されることはなく、³H は水中の H と置換されず細胞分裂か核崩壊以外は核内に留まるとされる。核 DNA に取り込まれた ³H-thymidine を切片上の感光乳剤膜上で局在部位に一致した黒化像として捉えることで、細胞動態の追求が可能であり、DNA 合成が細胞分裂の前提条件とすれば標識細胞は少なくともあと 1 回は分裂する能力があるといえる。

実験における標識方法 (³H-thymidine 投与法) の決定には、NMO 本来の作用による DNA 合成抑制と、動物体内特に蝸牛における薬物動態を考慮しなければならない。そもそも NMO は抗腫瘍薬 (アルキル化剤) であり、DNA の 2 本鎖の間に架橋を形成することで DNA の合成や修復を阻害する作用を有している。そして、効果は増殖分画の高低に依存し、G₁ 後期から S 期早期に高感受性であるが細胞周期に非特異的に作用し、作用発現は濃度に依存するとされる¹³⁾。従って、NMO が蝸牛内に残存すると推定される 1～2 日以内、特に投与後早期には核 DNA 合成がかなり抑制されると考えられ、標識率を高める必要がある。³H-thymidine autoradiography を用いた他臓器における組織修復機転の研究^{14)~17)}では cumulative labeling が用いられている。この方法であれば標識回数が増えるため標識率を高めることができ、投与時刻を一定にすれば生体内に生理的に存在する thymidine 取り込みの日内変動¹⁾の影響も避けることが出来る。さらに、NMO によるコルチ器障害が形態的に出現するより前の時期に、隣接している障害を受けていない細胞に新たな再生系の変化が生じているとすれば、それを捉えるためには 8 時間間隔の 3 日間の cumulative labeling が最適と考察した。

3) 実験結果の検討とコルチ器修復に関する一考

マウスのコルチ器における ³H-thymidine autoradiography には以下の報告がある。胎生期蝸牛につい

図9 細胞動態からの考察 (Cell cycle)

^3H -thymidine autoradiography で核に銀粒子を認める細胞は S 期, mitosis を認める細胞は M 期の細胞である. ナイトロミンによるコルチ器障害群で発見されたことから支持細胞には G_0 期 (休止期) の細胞があることが判明した. 図中に正常なコルチ器 (上) とナイトロミンによる障害コルチ器 (下) を対比して示すが, 黒丸で示した今回同定された S 期細胞は G_0 細胞であり, 2 次的に Cell cycle を回ったものと理解できる.

て Ruben¹⁸⁾ は, コルチ器のほとんどの細胞が胎生 13~15日の間に最終分裂を終了するとし, 成熟蝸牛について Koberg¹⁹⁾ は, 何も操作しない動物のコルチ器支持細胞には ^3H -thymidine の取り込みがないことを示している. 支持細胞について西村²⁰⁾ は, ダイテルス細胞とヘンゼン細胞の分化は遅く有毛細胞に比べて分化から成熟までに長時間を要すとしているが, 成熟蝸牛のコルチ器支持細胞に関する検討はいまだなされていない.

今回の実験では, control とした無負荷の動物群に限ってはコルチ器支持細胞に標識細胞を認めなかった. ところが, コルチ器障害モデルである NMO 投与動物群においては, 支持細胞の核 DNA 合成の証拠である標識細胞を少数ながら初めて発見し, 一部に mitosis を捉えた. NMO は増殖活性を低下させる直接作用を有しており, 今回の実験でも NMO を投与した動物の骨髄においては標識率が低下している. 一方, コルチ器については, NMO を投与しない動物には認めなかった支持細胞の標識細胞が NMO 投与動物に認められた. この相反する結果は, NMO によって障害されたコルチ器においては増殖が抑制されている状況にもかかわらず新たに細胞新生を伴った再生系の反応が起こっているに他ならないと考える. しかも, 標識細胞は S 期細胞, 分裂像を呈する細胞は M 期細胞であるので (図 9), 成熟蝸牛の G_0 に属す支持細胞が

図10 コルチ器の修復に関する考察

蝸牛管内の高 K^+ 濃度は血管条からの能動的流入 (太矢印) と鼓室階への流出 (細矢印) の和であり, コルチ器における K^+ 濃度の境界は網状膜とされている. 機能的障害は形態的障害より広い範囲で先行していると考えられるが (上図), 核 DNA 合成した支持細胞の位置からは, 障害領域に隣接した G_0 期の支持細胞に細胞動態上の新たな変化が生じ時間経過とともに外側の支持細胞が変化すると推察される (下図). 蝸牛管の K^+ 維持からみると, コルチ器障害における網状膜の破壊に対する支持細胞の修復機転と考えれば, 一連の変化は網状膜の維持を含めたコルチ器の構造保持に合目的と思われる.

NMO 投与後のコルチ器に生じた変化を誘因として cell cycle を回り始めたことが, 少数ながら cell cycle 上の S 期や M 期の支持細胞を捉えたことから推測され, 支持細胞が再生系の細胞群である可能性が強く示唆される.

次に, 標識された支持細胞の位置について考察する. 標識直後に断頭した動物群においては (実験 1), NMO の投与量が多い方 (NMO_{60}) に外有毛細胞から離れた位置の標識細胞が多い傾向がある. NMO_{60} と NMO_{40} との間で形態的変性像の範囲に差異は認めなかったが, 他の電気生理学的側面⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾ を考慮すると, ある程度までは NMO 投与量が多いほど機能的障害の範囲が広いことが類推される. NMO_{60} と NMO_{40} に

おける標識細胞の位置の差異を機能的障害範囲の大小と関連付けることによって、障害領域に隣接する健全な支持細胞に増殖を伴った修復反応が起こっていると考えることができる(図10)。加えて、機能障害は形態的変性像の出現に先行するので、支持細胞に生じた反応は障害が形態的に明らかになる以前に開始されたものと考えられる。どこまでを障害範囲とするかは今回の実験のみからは判断が困難であるが、障害を受けた細胞がどこまでで健全な支持細胞がどこからかによって動き出す支持細胞が異なり、結果として修復形態が異なるものとする。たとえばストレプトマイシンの外リンパ灌流による急性コルチ器障害では、長時間経過後最終的に外ラセン溝付近の細胞に由来すると思われる一層の細胞が残存することが報告されている²¹⁾が、この現象はストレプトマイシンの直接大量投与のために有毛細胞のみならずコルチ器の大部分が破壊され、障害を免れた最外層の支持細胞から増殖性反応が生じて結局一層の細胞が残ったと考えれば理解し易いと思われる。

次に、標識された支持細胞と時間経過について考察する。最終標識から2時間後の断頭群に比べ2時間以上経過してからの断頭群では標識率がかなり低下していること(図3-B)は、新しく核DNA合成を行った支持細胞はいつまでも同じ位置に存在せず時間経過と共に減少することを意味し、7日までの断頭群には標識細胞が残存していたこと(図3-B)から、少なくとも7日間はコルチ器内に留まるものと考えられる。更に、標識細胞は標識からの時間が短いほど外有毛細胞に近い位置に多いのに対し、標識からの時間経過が長いほど外有毛細胞から離れた位置に多い傾向がある。このように時間経過と共に標識細胞の位置が変わったという結果は、NMOによるコルチ器障害が外有毛細胞から周囲に波及するまでの時間経過を反映するの、それとも標識された支持細胞が時間経過と共に移動して行ったのか、2つの理由が考えられるが、今回の実験だけで結論付けることはできない。

一方、コルチ器周辺の環境に注目すると、高 K^+ である蝸牛管内の内リンパ液と低 K^+ である鼓室階の外リンパ液とではイオン組成に著しい差異があり、コルチ器の網状膜(Reticular lamina)が境界とされている²²⁾。網状膜を介してはわずかな受動的な K^+ の拡散のみが存在し²³⁾、内リンパ液の高 K^+ 動態は蝸牛内直流電位(EP)の発生機構として電気生理的に重要であることから²³⁾²⁴⁾、網状膜の機能や形態を維持すること

は生理的にも重要であると推測される。Lim²⁵⁾は、機械的なコルチ器障害では支持細胞は網状膜を介した電位のリークを防止すべく代償的に肥大すると述べており、Forgeら²⁶⁾は、ゲンタマイシンによる慢性コルチ器障害では、変性してゆく外有毛細胞の間のtight junctionは支持細胞間の新しいtight junctionが完成するまで残存することを電顕的に観察し、網状膜の維持という生理的意義を指摘している。従って、網状膜の修復を含めた基板上構造としてのコルチ器構造の保持は、蝸牛内の生理的環境の維持にとって非常に有意義であると考えられ、今回発見した支持細胞の変化はその目的に合うものとする。

今回明らかとなったコルチ器支持細胞と同様に、損傷を受けた組織の周囲にあって修復機転として2次の細胞動態上の動きを開始する G_0 細胞集団には、骨端軟骨細胞¹⁴⁾や膀胱粘膜の移行上皮¹⁵⁾がやはり 3H -thymidine autoradiographyによって証明されている。また、Kitamuraら¹⁷⁾は、脳におけるグリア細胞に生じる組織修復機転としての細胞動態上の変化を 3H -thymidine autoradiographyによって明らかにした。神経細胞のように静的な細胞集団で占められる脳においても、障害が加わった場合は修復機転として動き出すグリア細胞の例があることは、脳と同様に静的な細胞集団と思われていたコルチ器の修復機転と支持細胞の細胞動態上の変化との関連性を支持するものとして興味深い。

5. 結 語

1) 外有毛細胞の選択的障害物質であるNitrogen Mustard-N-oxide(ナイトロミン)を蝸牛障害の手段として用いて、コルチ器障害の動物モデルで 3H -thymidine autoradiographyを行い、成熟蝸牛の障害コルチ器における支持細胞の細胞動態を検討し、修復機転との関連を考察した。

2) ナイトロミンを負荷しない動物では発見できなかったコルチ器支持細胞の 3H -thymidine取り込みを、ナイトロミン負荷動物に初めて発見し、成熟蝸牛においても支持細胞にはDNA合成を行い増殖する能力があることが明らかになった。

3) 核DNA合成を行った支持細胞は、ダイテルス細胞、ヘンゼン細胞など外有毛細胞に隣接した細胞のみならず、内指節細胞、クラウゼウス細胞にも存在した。また、いつまでもその位置に留まるのではなく時間経過と共に減少する傾向にあった。一方、隣接した

有毛細胞の形態的障害像は様々であり、コルチ器の形態的変性像の出現に先行するコルチ器の広範な変化が示唆された。

4) コルチ器急性障害における核 DNA 合成した S 期の支持細胞の出現から、支持細胞には G₀ 期の細胞があり、必要に応じて cell cycle を回り始める、いわば再生系の細胞集団であることが示唆された。

5) ナイトロミン投与後、同時間であれば投与量が多いほど、ナイトロミン量が同じであれば投与後の時間が長いほど、核 DNA 合成細胞は外有毛細胞から離れた支持細胞に多く、その位置はコルチ器障害の拡大と並行していると思われた。障害範囲に隣接した支持細胞に新しく細胞動態上の変化が生じたと思われ、増殖をとまなうコルチ器の修復機転と関連づけた。

6) コルチ器保持のために重要な網状膜の維持修復は生理的に合目的であり、急性障害下のコルチ器に認める支持細胞の動的変化はコルチ器構造の保持、再建の一面を担っていると考察した。

文 献

- 1) Yasuda N, Tachibana M, Mizukoshi O et al: Serial section method for cytofluorometric determination of the DNA content of component cells of the human cochlea. *Histochemistry* 87: 115-122, 1987.
- 2) 安田範夫: 連続切片法によるヒト蝸牛コルチ器支持細胞の顕微蛍光核 DNA 定量. 京府医大誌 95: 61-71, 1986.
- 3) 中西和夫, 藤田哲也: Polyploid cell および二核細胞出現のメカニズム. 医学のあゆみ 100: 621-622, 1977.
- 4) Messier B, Lebmond CP: Cell proliferation and migration as revealed by radioautography after injection of thymidine-H3 into male rats and mice. *J Anat* 106: 247-264, 1980.
- 5) Nakai M, Zushi K, Chang KC et al: An experimental study on the progressiveness of cochlear damage by aminoglycoside drug. *Acta Otolaryngol* 91: 199-206, 1981.
- 6) 角田由美子: Nitrogen Mustard-N-oxide (Nitromin) の聴器毒性について. 日耳鼻 73: 581-598, 1970.
- 7) 片野明夫: Nitrogen Mustard-N-oxide の聴器毒性に関する電子顕微鏡的観察. 日耳鼻 747: 1523-1532, 1971.
- 8) 朝隈真一郎, 平島健二郎, 鳥谷陽一, 吉田雅文, 有馬敏夫他: Nitromin による内耳障害の実験的研究. 耳鼻 28: 315-320, 1982.
- 9) Asakuma S, Yoshida N, Toriya Y et al: Experimental study of the mechanism of the damage in endocochlea d.c. potential after administration of Nitrogen Mustard-N-oxide. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 97: 273-282, 1984.
- 10) 川出和彦, 横井 久, 柳田則之: 抗腫瘍剤(ナイトロミン, シスプラチン)による蝸牛障害とステロイドの影響. 日耳鼻 89: 177-191, 1988.
- 11) Hughes WL, Bond VP, Brecher G et al: Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine. *Proc Nat Acad* 44: 476-483, 1958.
- 12) Bryant BJ: The incorporation of ³H from thymidine into proteins of the mouse. *J Cell Biol* 29: 29-36, 1966.
- 13) 涌井 昭: アルキル化剤. 臨床医 9: 1532-1535, 1983.
- 14) 山下文治: ³H-thymidine autoradiography による骨端軟骨損傷の修復に関する実験的研究. 京府医大誌 89: 101-118, 1980.
- 15) 金子 宏: 微小発破により障害を受けたラット膀胱粘膜の細胞動態に関する研究. 京府医大誌 91: 935-947, 1982.
- 16) 清水正啓: オートラジオグラフによる消化管吻合創の創傷治癒過程に関する実験的研究. 京府医大誌 92: 1139-1155, 1983.
- 17) Kitamura T, Hattori H, Fujita S: Autoradiographic studies on histogenesis of brain macrophages in the mouse. *Neuropathology and experimental Neurology* 31: 502-518, 1972.
- 18) Ruben RJ: Development of the ear of the mouse; A radioautographic study of terminal mitoses. *Acta Otolaryng Suppl* 220, 1967.
- 19) Koberg E: Autoradiographische Untersuchungen zum Nucleinsaurestoffwechsel der Cochlea. *Arch Ohr-Nas-Kehlk-Heilk* 1798: 150-161, 1961.
- 20) 西村武重: 胎生マウス内耳諸細胞の完成時期に関する研究—³H-thymidine autoradiography による—. 日耳鼻 71: 178-188, 1968.
- 21) Kaneko Y, Terayama Y, Kawamoto K et al: Single-cell layer membrane covering the degenerated cochlea duct after perilymphatic perfusion of streptomycin. *Acta Otolaryngol* 86: 375-384, 1978.
- 22) Tanaka Y, Asanuma A, Yanagisawa K et al: Electrical potentials of the subtektorial space in the guinea pig cochlea. *JPN J Physiol* 27: 539-549,

- 1977.
- 23) Kuijpers W, Bonting SL : The cochlear potentials II. The nature of the cochlear endolymphatic resting potential. *Pfugers Arch* 320 : 359-372, 1970.
- 24) Sellick PM : Evidence for an electrogenic potassium pump as the origin of the component of the endocochlear potential. *Pfugers Arch* 352 : 351-361, 1974.
- 25) Lim DJ, Dunn DE : Anatomic correlates of noise induced hearing loss. *Otolaryng Clin N Am* 12 : 493-513, 1979.
- 26) Forge A : Outer hair cell loss and supporting cell expansion following chronic gentamycin treatment. *Hearing Res* 19 : 171-182, 1985.

授に深甚なる謝意を表します。直接のご指導と懇切なご教示を賜った安田範夫講師に衷心より謝意を表します。また、研究を始めるに当たりご指導とご助言を頂戴した水越 治名誉教授、ならびに橘 正芳明治鍼灸大学教授に深謝致します。最後に、多岐にわたり力添えを頂いた京都市立医科大学耳鼻咽喉科学教室の教室員各位に心より感謝致します。

なお、本研究の一部は第33・34・35回日本基礎耳科学会、第90回日本耳鼻咽喉科学会、第14回 WORLD CONGRESS OF OTORHINOLARYNGOLOGY HEAD & NECK SURGERY において発表した。

(1990年12月4日受稿 1991年1月11日受理 急載)

別刷請求先 〒602 京都府上京区河原町広小路梶井町465

京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室 村上匡孝

稿を終えるに臨み、ご指導とご校閲を賜った村上 泰教