— 原 著 —

高脂食負荷モルモット内耳蝸牛の機能的, 形態学的変化

柏戸 泉¹⁾・服部 康夫¹⁾・喬 炎²⁾¹⁾ 日本医科大学耳鼻咽喉科学教室²⁾ 日本医科大学病理学第2教室

Functional and morphological changes in the cochlea of cholesterolfed guinea pigs

Izumi Kashiwado¹⁾, Yasuo Hattori¹⁾ and Yan Qiao²⁾¹⁾Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School²⁾Department of Pathology, Nippon Medical School

Although sensory neural hearing loss stemming from hypercholesterolemia has received attention in recent years, no information is available about inner ear injuries resulting from this condition. In this study, we prepared guinea pig models at hypercholesterolemia and observed the inner ear with a transmission electron microscope, and also investigated the effect of vitamin E (Vit. E) on these injuries. One hundred and thirty-nine white male Hartley guinea pigs weighing a mean of 250 g each were divided into three groups. Group A consisted of the control animals, which were fed by a stock diet. Group B animals were fed by a hyperlipid diet (2.5% cholesterol, 0.25% cholic acid, and 7.5% cattle fat). Group C animals were fed by a Vit. E-added (50 units/100 g) hyperlipid diet. All the animals were sacrificed either one, two or three months after treatment and the cochlea duct vasculature, cochlear nerve fiber under spiral limbus, stria vascularis and inner hair cell and outer hair cell of Corti's organ was observed with a transmission electron microscope. Cholesterol, triglyceride, and TBARS values were concurrently measured in the serum. Auditory threshold was measured by auditory brain stem response (ABR).

In groups B and C, cholesterol and triglyceride levels remained high. The TBARS level elevated in group B but remained unchanged in groups A and C. In groups B and C, the threshold of ABR increased mildly. The cholesterol load led to injuries in the endothelium of the vasculature dominating the cochlea. This is followed by an anomaly affecting cochlear lipid metabolism that results in ultrastructural changes of cochlear nerve fiber under spiral limbus, stria vascularis and inner hair cell and outer hair cell of Corti's organ. However, in the Vit. E-added hyperlipid diet group, blood vessel and cell injuries seemed to have been inhibited by the antioxidation activity of Vit. E.

Key words: hypercholesterolemia, cochlea, ultrastructure, ABR, Vit. E

緒 言

高脂血症は、糖尿病や高血圧症に合併し、動脈硬化など多くの病態の発生に関与する。特に、近年高脂血症の臨床的研究が進み、高脂血症による感音難聴が注目されている。しかし、その発症機序については未だ不明な点が多い。

そこで今回、その発症機序解明の目的で高脂血

症動物モデルを作成し、難聴の発現を聴性脳幹反応 (ABR) にて検討した。さらに、蝸牛管の支配血管、らせん縁下部の蝸牛神経、血管条およびらせん器の内毛細胞と外毛細胞の形態的变化を経時的に透過型電子顕微鏡下に観察するとともに、高脂血症による動脈硬化病変などを抑制することが知られている^{1,2)} Vitamin E (Vit. E) 摂取の影響についても検討した。

Correspondence to Izumi Kashiwado, Department of Otorhinolaryngology, Nippon Medical School. First Hospital, 3-5-5 Iidabashi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

研究材料と方法

(1) 研究材料

実験動物には、ブライエル耳介反射正常の Har-

tley 系雄性白色モルモット 139 匹 (平均 250 g) を用い、これを A, B, C の 3 群に分けて飼育した。

(2) 方法

対照モルモット (A 群) の 30 匹にはモルモット用の通常固型飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社製, RC 4) を自由に摂取させた。一方、高脂食負荷モルモット (B 群) の 52 匹には 2.5% コレステロール, 0.25% コール酸, 7.5% 牛脂肪を含む高脂食固型飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社製) を自由に摂取させた。また、高脂食負荷 + Vit. E 投与モルモット (C 群) の 57 匹には上記高脂食飼料に 100 g 当たり 50 単位の Vit. E を添加 (オリエンタル酵母工業株式会社製) して自由に摂取させた。

A, B, C の各群ともに ABR の測定、血清コレステロール、トリグリセライド、TBARS (thiobarbituric acid reaction substance) の各値の測定を行うとともに蝸牛の電子顕微鏡的観察を行った。

ABR の測定については各群とも飼育 3 カ月後の動物 (A 群 10 匹, B 群 12 匹, C 群 10 匹) を用いた。動物は pentobarbital sodium (35 mg/kg) の腹腔内注射で麻酔した。記録電極は、針電極を用い頭頂部を陽極、検査側耳介を陰極に導き、項部を接地した。この際、対側耳は、90 dB のホワイトノイズでマスキングし、測定は電氣的に遮蔽された部屋で行った。刺激音は、持続 100 μ sec の矩形波によるクリックを用い、open field で与えた。クリック刺激の間隔は 100 msec とした。加算回数は 200 回、解析時間は 12.8 msec とした。加算平均処理はシグナルプロセッサ (日本電気三栄 7 T 08) で行い、加算波形を X-Y レコーダーに出力した。また、刺激音圧の測定は動物の耳の位置で行った。域値の判定は、クリックを 103 dBpe-SPL より、ABR 波形が消失するまで 10 dB ステップで減衰させ、域値付近では必要に応じて 5 dB ステップを用いた。波間潜時の検討は、波形が明瞭な N1 と N3 波間潜時を指標とし、103 dBpe-SPL 刺激時の反応を用いた。

血液生化学検査については各群とも飼育 1 カ月後、2 カ月後および 3 カ月後の動物 (A, B, C 群ともそれぞれ 1 カ月は 10 匹, 2 カ月は 10 匹, 3

カ月は 12 匹) を用いた。

透過電子顕微鏡的観察については、A 群, B 群, C 群ともに、飼育 1 カ月後、2 カ月後および 3 カ月後の動物を用いた。

一部では ABR 測定、血液生化学的検査および透過電子顕微鏡的観察を同一動物で行った。これらの動物では 10% pentobarbital sodium (35 mg/kg) を腹腔内に注射し、ABR を測定した後に 10% pentobarbital sodium (35 mg/kg) を追加注射した。呼吸停止直後に開胸、左心室より採血し、これを血清コレステロール、トリグリセライドおよび TBARS 値の測定に供した。採血後直ちに断頭し、外耳道經由で鼓室内に 4°C の 2.5% グルタルアルデヒド液 (りん酸緩衝液にて pH 7.4 に調整) を注入固定した。素早く側頭骨を摘出し骨胞を開放した後、アブミ骨を除去して前庭窓を開放し、同時に、蝸牛窓も開放した。前庭窓より 4°C の 2.5% グルタルアルデヒド液を緩徐に還流し、蝸牛頂を開窓した後、蝸牛を摘出して 4°C の 2.5% グルタルアルデヒド液に 2 時間浸漬固定した。その後、蝸牛を 4°C のりん酸緩衝液にて洗浄し、4°C の 1% 四酸化オスミウム液 (りん酸緩衝液にて pH 7.4 に調整) にて 2 時間後固定した。ついで、実体顕微鏡下に骨壁を可及的に除去し、標本をエタノール系列にて脱水、QY 2 にて置換を行い、Quetol 812 に包埋した。薄切後の準超薄切片にてメチレンブルー染色を施行し、光学顕微鏡的に観察するとともに、超薄切片には酢酸ウランと硝酸鉛の二重染色、あるいはタンニン酸、酢酸ウランと硝酸鉛の三重染色を施し、日立 H-7100 型透過電子顕微鏡にて観察した。

結果の有意差検定には、Scheffe の多重比較検定法と Fisher の直接確率検定法を用いた。

結 果

1. 肉眼的所見

A 群では動物の動きは活発で飼育期間中、終始体毛の艶は良好で、体重は順調に増加した。飼育 1 カ月後に体重は平均 497.6 ± 62 g, 2 カ月後には平均 607 ± 71 g, 3 カ月後には平均 695 ± 83 g であった。飼育途中で死亡した動物は、30 匹中 1 匹

であった。

B 群では飼育 1 カ月後に体毛の艶が悪くなり平均体重は 399 ± 92 g で、2 カ月目に入ると、体毛の艶がさらに悪くなり、脱毛をみる動物が見られ、動きが不活発となった。体重増加は遅延し、飼育 2 カ月後の平均は 457 ± 32 g、3 カ月目に入るとすべての動物に脱毛が見られた。体重増加は少なく、飼育 3 カ月後の平均は 521 ± 56 g であった。飼育 1 カ月、2 カ月と 3 カ月後のいずれの群でも平均体重は A 群に比し有意に低かった ($p < 0.05$)。この間に死亡した動物は、52 匹中 14 匹であった。

C 群では飼育 1 カ月後の平均体重は 416 ± 59 g、飼育 2 カ月目に入ると、体毛の艶と動きが僅かに悪くなり、体重増加が遅延した。飼育 2 カ月後の平均体重は 459 ± 43 g、飼育 3 カ月目に入っても同様に平均体重は 567 ± 62 g であった。飼育 1 カ月、2 カ月と 3 カ月後のいずれの群でも平均体重は A 群に比し有意に低く ($p < 0.05$)、B 群とは有意差はなかった。この間に死亡した動物は、57 匹中 6 匹であった。

飼育途上の死亡率については Fisher の直接確率検定法を用いて有効率を計算した結果、死亡率はそれぞれ A 群では 3.3、B 群では 26.9、C 群では 10.5 の値を示し、C 群が B 群に比し有意に死亡率 ($p < 0.05$) が小さかった。

2. 聴性脳幹反応 (ABR) による聴覚検査所見

ABR の域値は、A 群の飼育 3 カ月後で 37.0 ± 7.4 dBpeSPL、B 群では、 50.5 ± 11.2 dBpeSPL、C 群では 51.0 ± 10.6 dBpeSPL であった。B 群と C 群では、A 群と比して有意な ABR 域値の上昇 ($p < 0.05$) を認めた。一方、B 群と C 群の間には、ABR 域値に差は認められなかった。また、N1 と N3 波間潜時は A 群、B 群と C 群の間に統計的に有意な変化は認められなかった。

3. 血液生化学的検査所見

血清中の総コレステロール値は、Table 1 に示すように A 群では飼育 2 カ月後に 75.6 ± 12.6 mg/dl と最高値を示し、B 群では終始 A 群に比して 7 倍以上の値であり、明らかな高脂血症病態を示した。C 群においても終始 A 群に比して 4 倍以上の高い値を示していたが、B 群に比較して低値であった。トリグリセライド (TG) については、有意差を認めなかった。TBARS 値は Table 1 のように A 群、B 群と C 群の飼育 1 カ月、2 カ月、3 カ月後の比較をすると、各飼育月数とも B 群が A 群と C 群に比して有意に上昇 ($p < 0.05$) しており、A 群と C 群の間には有意差を認めなかった。

Table 1 The biochemical examination of blood on each group

Group	TCHO mean $\pm$ SD	(n)	TRG mean $\pm$ SD	(n)	TBARS mean $\pm$ SD	(n)
A 1	58.9 ± 13.9	(10)	72.7 ± 25.9	(10)	2.2 ± 0.5	(10)
A 2	75.6 ± 12.6	(10)	76.7 ± 21.6	(10)	2.9 ± 0.6	(10)
A 3	48.9 ± 4.8	(12)	68.3 ± 22.9	(12)	2.1 ± 0.3	(12)
B 1	548.1 ± 68.1	(10)	94.2 ± 15.9	(10)	3.8 ± 0.4	(10)
B 2	451.2 ± 97.2	(10)	56.1 ± 23.1	(10)	3.8 ± 1.3	(10)
B 3	525.6 ± 162.5	(12)	84.6 ± 46.3	(12)	4.6 ± 3.0	(12)
C 1	416.3 ± 106.9	(10)	81.4 ± 27.9	(10)	2.1 ± 0.2	(10)
C 2	403.9 ± 82.8	(10)	77.7 ± 20.4	(10)	2.4 ± 0.6	(10)
C 3	398.3 ± 99.3	(12)	86.8 ± 18.2	(12)	2.2 ± 0.2	(12)

A 1: control group (1 month), A 2: control group (2 month), A 3: control group (3 month), B 1: hyperlipid fed group (1 month), B 2: hyperlipid fed group (2 month), B 3: hyperlipid fed group (3 month), C 1: hyperlipid and Vit. E fed group (1 month), C 2: hyperlipid and Vit. E fed group (2 month), C 3: hyperlipid and Vit. E fed group (3 month)

4. 電子顕微鏡的所見

(1) 対照モルモット (A 群) の蝸牛管の微細構造

1) 蝸牛管

i) 蝸牛管の支配血管：蝸牛管を取り巻く血管系には、血管条上皮細胞間の毛細血管 (Fig. 1), らせん靱帯内の毛細血管, らせん器直下の基板下に接するらせん血管, らせん縁内の血管, らせん縁下部の蝸牛神経線維間の血管が観察された。これらの血管はすべて連続性の毛細血管で外径は $5\sim 10\ \mu\text{m}$ で、基底膜を有し一層に配列する内皮細胞と、その外側には不連続性に取り巻く基底膜を有する周皮細胞がみられ、内皮細胞と周皮細胞の間に接合はなかった。内皮細胞の細胞内小器官は未発達で、飲小胞が散見された。飲小胞の分布は毛細血管の存在部位によって異なり、切片上毛細血管の内皮細胞 $1\ \mu\text{m}^2$ 当たりの飲小胞数を見ると、Table 2 に示すように A 群飼育 1 カ月後では蝸牛神経線維間の毛細血管で最大値を示し、次いでらせん縁の血管, らせん血管, らせん靱帯の毛細血管, 血管条の毛細血管の順に少なくなっていた。周皮細胞の特徴は飲小胞と、僅かではあるが筋原線維が見られることであった。

ii) らせん縁下部の蝸牛神経 (Fig. 2)：蝸牛神経は大部分が外径 $1.8\sim 2.5\ \mu\text{m}$ の有髄神経線維

の束よりなり、軸索は 1～2 個の糸粒体と、少数の粗面小胞体が認められた。無構造な神経内膜には少数の線維芽細胞の細胞質突起が見られ、一部に無髄神経線維が観察された。

iii) 血管条 (Fig. 3)：血管条は上皮細胞と毛細血管よりなり、上皮細胞には辺縁細胞、中間細胞と基底細胞の三種が観察された。辺縁細胞は不正形の核を持ち、豊富な糸粒体、少数の RNA 顆粒、豊富な小胞、少数の粗面小胞体とゴルジ体が見られ細胞質は暗調を呈していた。細胞膜は自由表面では平滑、時に少数の微絨毛が見られ、閉鎖接合が発達していた。隣接する辺縁細胞あるいは中間細胞との間に多数の細胞質突起が発達し、隣接細胞と互いに絡み合って嵌合していた。この部位には大きな糸粒体が見られ、リンパ内腔近くの細胞上部にいくにしたがって小さくなっていた。中間細胞は円形の核を持ち、辺縁細胞より小さい糸粒体、少数の RNA 顆粒、少数の粗面小胞体とゴルジ体が観察され、細胞質は辺縁細胞に比し明調を呈していた。辺縁細胞と中間細胞の多くは、毛細血管の基底膜に接していた。基底細胞は楕円形の核を持ち、中間細胞より小さい糸粒体、比較的多数の RNA 顆粒、少数の粗面小胞体とゴルジ体が観察された。この細胞では細胞質突起は少なく、細胞質は紡錘形で中間細胞と同程度に明調を呈して

Table 2 Mean number of pinocytotic vesicles/ μm^2 in capillary endothelia

Group	SVa mean $\pm$ SD(n=12)	SL mean $\pm$ SD(n=12)	SVe mean $\pm$ SD(n=12)	SLi mean $\pm$ SD(n=12)	CN mean $\pm$ SD
A 1	5.8 $\pm$ 3.2	7.9 $\pm$ 4.4	10.8 $\pm$ 6.2	11.8 $\pm$ 6.2	14.1 $\pm$ 6.8
A 2	6.8 $\pm$ 3.1	8.8 $\pm$ 3.8	12.8 $\pm$ 4.0	12.8 $\pm$ 4.6	16.5 $\pm$ 3.9
A 3	6.3 $\pm$ 3.6	9.0 $\pm$ 5.9	11.7 $\pm$ 3.7	10.9 $\pm$ 4.6	15.0 $\pm$ 5.6
B 1	18.0 $\pm$ 3.4	13.5 $\pm$ 4.1	24.8 $\pm$ 4.5	18.0 $\pm$ 5.5	22.0 $\pm$ 6.6
B 2	25.6 $\pm$ 4.6	25.8 $\pm$ 5.5	28.1 $\pm$ 8.7	25.8 $\pm$ 8.4	31.8 $\pm$ 8.7
B 3	30.9 $\pm$ 9.4	27.2 $\pm$ 7.5	28.8 $\pm$ 6.1	26.7 $\pm$ 7.2	29.5 $\pm$ 6.9
C 1	15.2 $\pm$ 2.1	20.5 $\pm$ 5.7	19.5 $\pm$ 7.5	17.3 $\pm$ 8.2	18.0 $\pm$ 5.8
C 2	13.9 $\pm$ 4.5	15.8 $\pm$ 5.5	15.8 $\pm$ 7.0	14.0 $\pm$ 7.2	13.8 $\pm$ 5.9
C 3	15.4 $\pm$ 4.0	15.3 $\pm$ 5.5	15.0 $\pm$ 6.8	14.0 $\pm$ 5.9	16.0 $\pm$ 5.9

Abbreviations: SVa; Stria vascularis, SL; Sprial ligament, SVe; Sprial vessel, SLi; Spiral limbus, CN; Cochlear nerve fiber gap.

A 1: control group (1 month), A 2: control group (2 month), A 3: control group (3 month), B 1: hyperlipid fed group (1 month), B 2: hyperlipid fed group (2 month), B 3: hyperlipid fed group (3 month), C 1: hyperlipid and Vit. E fed group (1 month), C 2: hyperlipid and Vit. E fed group (2 month), C 3: hyperlipid and Vit. E fed group (3 month)

おり、トノフィラメント様の線維が観察された。基底細胞には基底膜が見られず、らせん靱帯へと移行していた。

iv) らせん器：らせん器は、基底板上に存在し、支持細胞としてコルチトンネルを支える様に内側に内柱細胞、内指節細胞、境界細胞、外側に外柱細胞、外指節細胞 (Deiters 細胞)、Hensen 細胞と Claudius 細胞より構成されていた。感覚細胞としては、内毛細胞と外毛細胞の二種が観察された (Fig. 4, 5)。内毛細胞は上部が細くなった三角プラスコ状を呈し、核は中央よりやや上部に位置し糸粒体は内毛細胞の上部、核周囲に多くみられた。外毛細胞は胞体が試験管状を呈し、滑面小胞体が細胞上部に多く見られ、細胞壁に沿っても数層に渡ってみられた。糸粒体は細胞上部、核下部に多く、細胞壁に沿っても散見された。内外毛細胞の自由表面には聴毛が観察された。

(2) 高脂食負荷モルモット (B 群) の蝸牛管の微細構造変化

1) 蝸牛管

i) 蝸牛管の支配血管：毛細血管系内皮細胞の、細胞内小器官の分布状況と形態に変化がみられた。Table 2 に示したように内皮細胞の平均飲小胞数は増加し、飼育 1 カ月後では、らせん縁の毛細血管では A 群に比し有意差はなかったが、2 カ月、3 カ月後では有意に平均飲小胞数が増加していた ($p < 0.05$)。その他の毛細血管では、1 カ月、2 カ月、3 カ月後でそれぞれ A 群に比し飲小胞数は有意に増加していた ($p < 0.05$)。各毛細血管別に比較すると、飼育 1 カ月後でのみ、らせん血管と血管条、らせん血管とらせん靱帯、蝸牛神経線維間とらせん靱帯およびらせん縁とらせん血管、それぞれの間で前者の飲小胞数が有意に多かった。しかし、飼育 2 カ月、3 カ月後では各毛細血管の飲小胞数間に有意差はみられなかった。毛細血管のその他の変化として、飼育 1 カ月後で血管条の毛細血管内皮細胞と周皮細胞に糸粒体の大きさの違いや空胞が観察される個体があった。また、他の部位の蝸牛支配血管領域にも程度は軽度であったが同様の所見があった。飼育 2 カ月後で、蝸牛支配血管領域の毛細血管内皮細胞と周皮細胞

には、糸粒体の大きさの違いや空胞が飼育 1 カ月の所見より増強して観察された。飼育 3 カ月後では、蝸牛支配血管領域の毛細血管の内皮細胞と周皮細胞には糸粒体の大きさの違い、空胞とライソゾームの増加が明らかであった。これらの所見は飼育 1 カ月、2 カ月後よりさらに著明になっていた。また、lipid droplet、脂肪変性、飲小胞の大小不揃いが目立っていた。

すなわち、lipid droplet が血管周囲側と内腔側に見られ、ときにミエリン様物質も認められた (Fig. 6)。

ii) らせん縁下部の蝸牛神経：飼育 1 カ月後には著変はなかったが、2 カ月後の軸索内に糸粒体の大きさの違い、ライソゾームとミエリン様構造物が出現し、髄鞘とシュワン鞘の膨化が観察できる神経線維を認めた。飼育 3 カ月後には、シュワン細胞、軸索と神経内膜内に lipid droplet、糸粒体の大きさの違い、ミエリン様構造物の出現が顕著となり、髄鞘では膨化と層構造の解離が見られた (Fig. 7)。

iii) 血管条：血管条上皮における著明な変化は辺縁細胞と中間細胞における糸粒体数の変動と、その他の細胞内小器官の障害による細胞質の明調化であった。血管条上皮の辺縁細胞と中間細胞の糸粒体数は、飼育期間ごとに変動し、飼育の各段階で A 群に比し減少していた。また、飼育 1 カ月後には、中間細胞に明調化がみられ、辺縁細胞には lipid droplet、ライソゾーム、大きさの違う膨化変性した糸粒体、飼育 2 カ月後には辺縁細胞の糸粒体の縮小がみられた。中間細胞では、RNA 顆粒の著明な減少、粗面小胞体とゴルジ体の変性消失による著明な細胞質の明調化が認められた。飼育 3 カ月後の辺縁細胞には lipid の蓄積、糸粒体の大きさの違いが顕著となり、ライソゾームの出現頻度の増加がみられた。中間細胞では、飼育 2 カ月後よりさらに高頻度に RNA 顆粒の著明な減少、粗面小胞体とゴルジ体の変性消失による著明な細胞質の明調化が半数以上の細胞に認められた (Fig. 8)。

iv) らせん器：有毛細胞の変化は、糸粒体数の減少、ライソゾームの出現増加であった。有毛細

Table 3 Mean number of mitochondria/ μm^2 in hair cells

	IC mean $\pm$ SD(n=11)	OC mean $\pm$ SD(n=11)
A 1	1.3 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.7
A 2	0.7 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.5
A 3	1.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5
B 1	0.8 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.5
B 2	0.7 $\pm$ 0.4	0.4 $\pm$ 0.2
B 3	0.6 $\pm$ 0.3	0.3 $\pm$ 0.2
C 1	1.0 $\pm$ 0.5	0.7 $\pm$ 0.5
C 2	1.1 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.5
C 3	1.0 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.5

Abbreviations: IC; Inner hair cell, OC; Outer hair.

A 1: control group (1 month), A 2: control group (2 month), A 3: control group (3 month), B 1: hyperlipid fed group (1 month), B 2: hyperlipid fed group (2 month), B 3: hyperlipid fed group (3 month), C 1: hyperlipid and Vit. E fed group (1 month), C 2: hyperlipid and Vit. E fed group (2 month), C 3: hyperlipid and Vit. E fed group (3 month)

胞の糸粒体数は、Table 3 に示すように A 群に比較して減少し、飼育 1 カ月後より内有毛細胞と外有毛細胞がそれぞれ A 群に比し有意に少なかった ($p < 0.05$)。飼育 1 カ月後には外有毛細胞にライソゾームの出現頻度が増し、飼育 2 カ月後には外有毛細胞に小さい糸粒体が増加した。3 カ月後でも内有毛細胞の変化は、軽度であったが、外有毛細胞ではライソゾームの増大と増加、脂肪の蓄積、空胞変性と小胞体の変性と思われる糸状の構造物が増加した。特に、空胞変性は大きなものが目立った (Fig. 9, 10)。また、飼育 3 カ月後には支持細胞の lipid droplet が増加した。しかし、内有毛細胞は外有毛細胞に比しその変化は軽度であった。

(3) Vitamin E 投与モルモット (C 群) の微細構造変化

1) 蝸牛管

i) 蝸牛管の支配血管：各毛細血管の構造は良く保たれていた。飼育 2.3 カ月後 (Fig. 11) には、空胞変性, lipid droplet, 大きい糸粒体が観察された。しかし、個体差があり、内皮細胞内の lipid droplet の増加や空胞変性といった病的変化は B 群に比し軽微であった。蝸牛の支配血管別に血管

条, らせん靱帯, らせん血管, らせん縁と蝸牛神経線維間にある毛細血管の内皮細胞の平均飲小胞数をみると, C 群の飲小胞は飼育 2 カ月後ですべての蝸牛支配毛細血管で B 群に比し有意に少なく, 血管条とラセン靱帯でのみ A 群に比し有意に多かった。飼育 3 カ月後ではすべての蝸牛支配毛細血管で B 群に比し有意に少なく, 血管条のみ A 群に比し有意に多かった (Table 2)。

ii) らせん縁下部の蝸牛神経：飼育 1 カ月後, 2 カ月後では著変はみられなかった。3 カ月後では B 群に比して軸索内に dense body の出現は見られたが, 糸粒体の大きさの違い, 髄鞘の層構造の膨化といった病的変化は軽微であった (Fig. 12)。

iii) 血管条：飼育 1 カ月後, 2 カ月後では著変はみられなかった。しかし, 飼育 1 カ月後に比し飼育 2 カ月, 3 カ月後ではかなり個体差があり, lipid droplet, 糸粒体の大きさの違い, ライソゾーム, ミエリン様小体の出現, また辺縁細胞と中間細胞に明調化が観察される個体もあった (Fig. 13)。血管条上皮においても, B 群に比し病的変化は軽微であった。

iv) らせん器：飼育 1 カ月後では内外有毛細胞に著変はみられなかったが, 支持細胞では lipid droplet と空胞が観察された。2 カ月後では, 1 カ月後の所見に加えて内外有毛細胞に空胞が観察された。飼育 3 カ月後では, 外有毛細胞 (Fig. 15) で 2 カ月後とほぼ著変はなかった。また, 外有毛細胞に比較して, 内有毛細胞 (Fig. 14) の変化は軽微であった。個体差はあるが細胞内小器官の構造は B 群に比しおおむね良く保たれており, 空胞やライソゾームの出現は B 群に比し軽微であった。

考 察

今回の実験では血液生化学検査所見から B 群と C 群は明らかに高脂血症状態になっていたが, TBARS 値は, B 群では C 群と A 群に比し有意に上昇していることから, 内因性抗酸化物質の減少と過酸化脂質の上昇が起こり^{3,4)}, 一方 C 群では Vit. E 投与によって抗酸化作用が働き, TBARS

値の上昇を抑制した³⁻⁶⁾ものと推測される。

形態学的には A 群, B 群と C 群の各飼育月後別の蝸牛支配毛細血管の内皮細胞内の平均飲小胞数は, B 群は C 群に比し増加し, 血管条の中間細胞の細胞質内の細胞内小器官の崩壊による明調化と, 外有毛細胞の変性像も最も激しかった。B 群の形態学的変化は概ね経月的に増悪した。C 群ではラセン靱帯で飼育 3 カ月後より形態学的に改善傾向が認められ, 血管条では終始, 他の蝸牛支配毛細血管の部位より形態学的変化が強かった。らせん器では内有毛細胞の糸粒体は, 飼育 2 カ月, 3 カ月後で, A 群に比し B 群では有意に少なかった。一方, 外有毛細胞では, A 群と B 群および B 群と C 群を比較すると B 群が有意に少なくなっていた。このように外有毛細胞に比して内有毛細胞の微細構造は比較的良好に保たれていた。このことは内有毛細胞が外有毛細胞に比し障害を受けにくいことを示唆している。

高コレステロール血症と形態学的変化について, 蝸牛障害のメカニズムは, 高コレステロール血症下では血液中の脂質が増量し, 血液性状の変化が起こり⁷⁻⁹⁾, 蝸牛微小循環路に循環障害が発生し¹⁰⁾, 毛細血管内皮細胞ではフリーラジカルにより過酸化脂質の上昇をきたし, 内皮細胞内の膜系障害が発生する^{11,12)}。同時に代謝経路に異常をきたし¹³⁾, 内皮細胞の飲小胞の増加を伴う機能的および形態的变化が起こり, ついには無選択的透過亢進が生じてくる^{14,15)}。この変化は逐一内皮細胞の周辺実質細胞へも波及して¹¹⁾, 蝸牛ではまず血管条の中間細胞から変化が起こり, 漸次蝸牛全体に障害が波及すると推測される。一方, C 群では, Vit. E のラジカル反応停止作用^{6,16)}と過酸化脂質生成の抑制作用^{5,17)}により, 蝸牛の形態学的変化を軽減した¹⁾ものと推察される。さらに, 飼育 3 カ月以後でも Vit. E の継続投与によって, 血管条の障害が軽減される可能性のあることも示唆している。

著者らの実験で, 聴覚機能を聴性脳幹反応 (ABR) 域値よりみた結果では, B 群と C 群とともに A 群に比して域値が有意に上昇していたが, B 群と C 群間には有意差はなかった。しかし, B

群と C 群の間では形態学上の差異が認められた。この ABR という機能的検討結果との間に差が認められたことについては, この程度の形態変化では機能的異常を生ぜしめないのか, あるいは ABR では, 蝸牛機能の微細な変化を同定できないかのいずれかと思われる。後者の場合は, さらに蝸電図あるいは耳音響放射などの方法により, 詳細に分析することが可能であり, 今後の検討が必要であろう。N 1 と N 3 波間潜時は A 群, B 群と C 群の間に有意な変化が認められなかった。このことは, 脳幹機能, 少なくとも脳幹聴覚路に病的状態がなかったことを示している。

著者らと類似した報告として, Gratton ら¹⁸⁾はコレステロールを負荷したチンチラの血管条で, ライソゾームの増加を認め, 山根ら¹⁹⁾, 斉藤²⁰⁾はコレステロールを負荷したモルモットで, 血管条の中間細胞に著明な変性所見を認めているが, ABR と形態学的変化との関連について, 深くは触れず, また Vit. E の投与は行っていない。

さらに, コレステロール負荷による過酸化脂質の発生を TBARS 値の上昇により確認できたが, この TBARS 値が指標となるフリーラジカル²¹⁾による障害は, 生体膜すべてに共通しており¹¹⁾, 微小循環レベルでの障害は, 実質細胞へも波及する¹¹⁾。そしてこれら過酸化脂質の働きを抑制する抗酸化物質である Vit. E の生体保護効果が脚光を浴びてきており, 現在生体膜のラジカル反応停止剤として作用することがわかっている¹⁵⁾。

以上より, 著者らが作成した食餌性高脂血症モルモットにおいては, 血清脂質の増量とともに, 蝸牛支配毛細血管の内皮細胞内の平均飲小胞数の増加, 中間細胞の明調化, 細胞内 lysosome の増多, 糸粒体の大小不同性と蝸牛神経の髄鞘の層構造の解離などの形態変化を示したが, Vit. E 投与によってこれらの変化が軽減されたと考える。

結 語

1) コレステロール負荷によりモルモットに高脂血症病態が惹起され, 血清 TBARS 値が増加し, 蝸牛支配毛細血管内皮細胞の平均飲小胞数の増加, 蝸牛神経の髄鞘の層構造の解離, 血管条中

間細胞の細胞質の明調化, 外有毛細胞の空胞の増加といった特異な微細構造変化が観察された。

2) Vit. E の投与によって, Vit. E 非投与群に比して TBARS 値が減少し蝸牛支配毛細血管内皮細胞, 蝸牛神経, 血管条, 外有毛細胞の形態変化が軽微であった。

3) 3 カ月以上の Vit. E の継続投与で, 高脂血症による障害を是正できる可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました日本医科大学耳鼻咽喉科学教室八木聡明教授ならびに病理学第2教室浅野伍朗教授に深謝致します。また, 適切な御助言と御援助を賜りました耳鼻咽喉科学教室弓削庫太前教授に厚く御礼申し上げます。さらに研究に御協力を頂きました日本医科大学耳鼻咽喉科学教室の諸先生ならびに日本医科大学付属第一病院電子顕微鏡室並松茂樹係長, エーザイ株式会社藤本祐一郎氏に感謝いたします。

なお, 本論文の一部は第94回日本耳鼻咽喉科学会総会(1993年5月)および51st Annual Meeting of Microscopy Society of America (August, 1993年)において発表した。

文 献

- 1) 高野達也: 動脈硬化巣と過酸化脂質. *J. Act. Oxyg. Free Rad.*, 2, 461~471, 1991.
- 2) 吉川敏一: 疾患. (内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝 編): 過酸化脂質と生体. p. 289~332, 学会出版センター, 東京, 1987.
- 3) Raji, L., Nagy, J., Coffee, K., and DeMaster, E., G.: Hypercholesterolemia, promotes endothelial dysfunction in vitamin E- and selenium-deficient rats. *Hypertension*, 22, 156~161, 1993.
- 4) 福沢健治: 過酸化脂質の生成防止 (内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝 編), 過酸化脂質と生体. p. 45~76, 学会出版センター, 東京, 1987.
- 5) 森崎信尋, 齊藤 康: ビタミンEと血管壁代謝 (五十嵐脩 編): ビタミンE—基礎と臨床—. p. 363~376, 医歯薬出版, 東京, 1985.
- 6) Prasad, K., and Kalra, J.: Oxygen free radicals and hypercholesterolemia: atherosclerosis; Effect of vitamin E. *Am. Heart J.*, 125, 958~973, 1993.
- 7) 浅野牧茂, 広川章子, 大久保千代次, 小川庄吉, 佐々木昭彦, 沢登公勇, 四ツ谷輝久, 国立公衆衛生院生理衛生学部: ウサギ皮膚微細循環系におけるコレステロール経口負荷時の血液レオロジー的变化について. 広域循環系血液性状および微細循環系血管内細胞成分挙動の変化と四肢褥創様潰瘍発生との関係ならびに2, 3の薬物の影響. p. 147~150, 日本バイオレオロジー学会論文集, 1983.
- 8) 浅野牧茂, 佐々木昭彦, 広川章子, 大久保千代次, 小川庄吉, 沢登公勇, 四ツ谷輝久, 国立公衆衛生院生理衛生学部: 臨床からみた血液粘度に対する基礎医学系立場からの発現; 実験的高脂血症時の褥創様潰瘍発生と血液粘度および微細循環の変化. p. 29~32, 日本バイオレオロジー学会論文集, 1983.
- 9) 喬 炎, 横山宗伯, 亀山孝二, 浅野伍朗: 動脈硬化病変成立ちの上での関門としての内皮細胞の役割. 動脈硬化, 18(別冊), 711~717, 1990.
- 10) 高島莊二: 遺伝性高脂血症ウサギ (WHHL rabbit) の内耳病態. *耳鼻臨床*, 78, 2823~2839, 1985.
- 11) Kaneko, T., Kaji, K., and Matsuo, M.: Cytotoxicities of a linoleic acid hydroperoxide and its related aliphatic aldehydes to cultured human umbilical vein endothelial cells. *Chem. Biol. Interact.*, 67, 295~304, 1988.
- 12) 内藤裕二: 消化器疾患 (近藤元治 編), p. 92~98, フリーラジカル・メディカルトリビューン社, 東京, 1992.
- 13) Henning, B., and Chow, C.K.: Lipid peroxidation and endothelial cell injury; Implications in atherosclerosis. *Free Radicals Biol. Med.*, 4, 99~106, 1988.
- 14) 島野 仁: 血管壁の面から—内皮細胞 (大野好文 編), 現代医療, 高脂血症と動脈硬化. p. 26~30, 現代医療社, 東京, 1990.
- 15) Qiao, Y., Yokoyama, M., Kameyama, K., and Asano, G.: Effect of vitamin E on vascular integrity in cholesterol-fed guinea pigs. *Arteriosclerosis Thromb.* 13, 1885~1892, 1993.
- 16) 皆川信子, 島崎弘幸: 抗酸化剤 (近藤元治 編), p. 156~162, フリーラジカル・メディカルビュー社, 東京, 1992.
- 17) 福沢健治: ビタミンEと脂質過酸化反応. (五十嵐脩 編): ビタミンE—基礎と臨床—. 医歯薬出版, 東京, p. 77~83, 1985.
- 18) Gratton, M.A., and Wright, C.G.: Alterations of inner ear morphology in experimental hypercholesterolemia. *Hear. Res.*, 61, 97~105, 1992.
- 19) 山根英雄, 中井義明, 張 寛正, 原田博文, 佐藤喜一: 高脂血症モルモットの内耳の実験的研究. *耳鼻臨床*, 76, 1611~1623, 1983.
- 20) 齊藤武久: 高脂血症と難聴に関する実験的研究. *日耳鼻*, 88, 319~329, 1985.
- 21) 八木國夫: フリーラジカル・過酸化脂質と疾病. *日本臨床*, 46, 64~68, 1988.

(1994年2月10日)

Legends of figures

Fig. 1 Control capillary structure of stria vascularis (group A). E: endothelial cell, BM: basement membrane, L: vascular lumen. (TEM: transmission electron micrograph $\times 30,000$)

- Fig. 2 Cochlear nerve fiber under spiral limbus. (group A). My: myelinated nerves. (TEM, $\times 18,000$)
- Fig. 3 Stria vascularis (group A). MC: marginal cell, IC: intermediate cell. (TEM, $\times 3,400$)
- Fig. 4 Inner hair cell (group A). IH: inner hair cell, OH: outer hair cell. (TEM, $\times 10,200$)
- Fig. 5 Outer hair cell (group A). OH: outer hair cell. (TEM, $\times 10,200$)
- Fig. 6 Stria vascularis capillary (group B). The endothelial cell has degenerated mitochondria (M) and increasing numbers of pinocytic vesicles (arrow) with varying sizes. (TEM, $\times 30,000$) basement membrane (BM)
- Fig. 7 Cochlear nerve fiber under spiral limbus (group B). The nerve cell has a lysosomes in axon, dissociation of lamellar organization in myelin sheath (My) and mitochondria. (TEM, $\times 18,000$)
- Fig. 8 Stria vascularis (group B). The intermediate cell has lysosome and more less density cytoplasm (*). The marginal cell shows less density cytoplasm. (TEM, $\times 3,400$)
- Fig. 9 (group B). The mitochondria (M) of inner hair cell are seen (TEM, $\times 10,200$)
- Fig. 10 (group B). The cytoplasm of outer hair cell appears less dense. The lysosome (Ly) and vacuoles (v) increase in number. (TEM, $\times 10,200$)
- Fig. 11 (group C). Mitochondria and pinocytic vesicles of stria vascularis capillary are shown in endothelial cell. (TEM, $\times 30,000$)
- Fig. 12 (group C). Dense body and mitochondria of cochlear nerve fiber under spiral limbus are noted in axon of nerve cell. (TEM, $\times 18,000$)
- Fig. 13 (group C). The marginal cell and intermediate cell of stria vascularis has clear cytoplasm. (TEM, $\times 3,400$)
- Fig. 14 (group C). Rough endoplasmic reticulum (rER) of inner hair cell increase in the cytoplasm. (TEM, $\times 10,200$)
- Fig. 15 (group C). Mitochondria of outer hair cell are noted in edamatus cytoplasm. (TEM, $\times 10,200$)
-

Plate (1)

Plate (2)

Plate (3)