シンポジウム「耳科領域における画像診断法の最前線」

Optical Coherence Tomography による蝸牛内部構造の観察

柿木 章伸

Evaluation of the internal structure of cochleae using optical coherence tomography

Akinobu Kakigi

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

Optical coherence tomography (OCT) visualizes the internal structures of a number of organs such as the eyes. Although visualization of the internal structures of the inner ear has been used to try and identify certain pathological conditions, attempts have had limited success owing to the thick bony capsule. After decalcifying the bony wall of the cochlea, we could clearly and widely visualize its internal structures with OCT. Specimens embedded in paraffin, sliced, and stained with hematoxylin and eosin (HE) were then examined under a light microscope. HE specimens exhibited several artifacts unrecognized in the OCT images, which were considered to be induced during the preparation process. This result suggests that our technique would be useful for examining cochlear pathologies without or prior to histological evaluations.

Key words: cochlea, optical coherence tomography, endolymphatic hydrops, stria atrophy, organ of Corti.

はじめに

Optical Coherence Tomography (OCT) は、赤外光を用いて非侵襲的に生体組織などの不透明な構造物の断層画像を得る方法である。眼科領域ではすでに臨床応用されており¹⁾、網膜や前房部の診断に用いられている。また、血管カテーテルに挿入し冠動脈壁の観察にも応用されている²⁾。しかし、耳科領域では実験動物での報告がみられるのみである^{3)~8)}。

今回、OCTを用いて正常および内耳傷害モルモットの蝸牛を観察し、パラフィン切片を用いた

組織標本と比較した結果を報告する。

動物と方法

雄の白色モルモット4-8週齢、400-600 gを使用し、正常群と内耳傷害群に分類した。

正常群はケタミン、キシラジンの深麻酔下に生理食塩水および10%ホルマリンで経心灌流の後、側頭骨を摘出し10%ホルマリンに浸漬固定を1週間行った。さらにEDTAにて2週間脱灰を行った後、OCTにて蝸牛を観察した。OCTはsantec社製OCTシステム「Inner Vision」を使用した。探査光は中心周波数1320 nmで波長帯域は90 nmとした。垂直方向と水平方向の解像度はそれぞれ12.0および17.0 μmである。OCT観察後は

図1 正常蝸牛のOCTとHE標本

迷路骨胞, 前庭鼓室階隔壁, 蝸牛軸, ライスネル膜, コルチ器, ラセン板縁, 蝸牛外側壁(ラセン靱帯・血管条を含む)が描出されている。パラフィン固定HE標本では, 迷路骨胞のひずみ, 前庭鼓室階隔壁のひずみ, ラセン靱帯が骨壁からはがれライスネル膜に雛壁などのアーチファクト(矢印)が認められる。

図2 内リンパ嚢閉塞手術群のOCTとHE標本

蝸牛第3回転を示す。著明な内リンパ水腫を認める。HE標本では, ラセン靱帯が骨壁から剥がれライスネル膜に雛壁, 基板のひずみをみとめる。

パラフィン固定にてHE染色標本を作製し, 光学顕微鏡にて蝸牛を観察した。

内耳傷害群として, 内リンパ嚢閉塞手術群, カナマイシン・エタクリン酸投与群, ストレプトマイシン外リンパ灌流群を作成し, 正常群と同様に側頭骨を摘出および標本を作製し, OCT, 光学顕微鏡にて観察した。

内リンパ嚢閉塞手術群はこれまでの報告⁹⁾に準

じ, ケタミン, キシラジンの深麻酔下にキシロカイン局麻を適宜用いながら以下の処置を行った。後頭部正中切開を行い, 左側後頭骨を開放して内リンパ嚢を明視下に置き, 内リンパ嚢を電気焼灼し閉鎖した。処置後4週間飼育し蝸牛観察を行った。

カナマイシン・エタクリン酸投与群はYamasoba and Kondoの報告¹⁰⁾に準じ, 同様の深麻酔

図3 カナマイシン・エタクリン酸投与群の OCT と HE 標本

蝸牛頂回転を示す。コルチ器の扁平化を認める。HE 標本では、ラセン靱帯が骨壁からはがれたりコルチ器の扁平化がより著明である。

図4 ストレプトマイシン外リンパ灌流群の OCT と HE 標本

蝸牛第2回転を示す。血管条萎縮，ライスネル膜の collapse，コルチ器の扁平化などが認められる。HE 標本では、コルチ器の扁平化が著明である。

下にカナマイシン 400 mg/kg を皮下注 2 時間後、エタクリン酸 50 mg/kg を静注した。処置後 2 日間飼育し蝸牛観察を行った。

ストレプトマイシン外リンパ灌流群は Terayama らの報告¹¹⁾ に準じ、同様の深麻酔下に中耳骨法を開放し、正円窓から卵円窓のすぐ隣に作成した小孔の間を 20% ストレプトマイシンで外リンパ灌流を行い閉創した。処置後 4 週間飼育し蝸牛観察を行った。

結 果

正常群では、OCT により蝸牛の骨壁だけでなく、その内部構造、ライスネル膜、らせん靱帯、コルチ器、基底板が観察され、HE 標本で見られるのと同様の形態が認められた。しかしながら、OCT 画像では、HE 標本にみられる迷路骨胞のひずみ、前庭鼓室階隔壁のひずみ、ラセン靱帯が骨

壁からはがれライスネル膜に雛壁が生じるなどのアーチファクトは認められなかった (図 1)。内リンパ嚢閉塞手術群では、OCT により HE 標本と同様に内リンパ水腫を描出でき、らせん靱帯やコルチ器は正常群との差を認めなかった (図 2)。カナマイシン・エタクリン酸投与群ではプライエル反射が消失し、コルチ器が扁平化していた (図 3)。コルチ器の扁平化は HE 標本でより高度にみられ、標本作成時の脱水による影響が考えられる。ストレプトマイシン外リンパ灌流群では、コルチ器が扁平化し、血管条萎縮に伴いらせん靱帯の菲薄化が認められた (図 4)。これらの変化は HE 標本でより高度にみられ、カナマイシン・エタクリン酸投与群と同様に標本作成時の脱水による影響が考えられる。内耳傷害群でも正常群と同様に、HE 標本では迷路骨胞のひずみ、前庭鼓室

階隔壁のひずみ、ラセン靱帯が骨壁からはがれライスネル膜に雛壁が生じるなどのアーチファクトが認められたが、OCTでは認められなかった。

考 察

モルモットの蝸牛は週齢が進むにつれ骨壁に石灰化と思われる白色の沈着物が付着し、表面が不正となり、透光性が減少する。今回の結果から内耳骨迷路をEDTAにて脱灰することで透光性が増加し、正常のみならず傷害された蝸牛内構造の描出が可能であることが判明した。今回の正常蝸牛の描出はこれまでの報告^{3)~6)}に比べて格段に解像度が上がっている。OCTは基礎実験において、組織標本作成にかかわるアーチファクトを軽減でき、より簡便に蝸牛形態を観察できること、より生体に近い蝸牛内部構造を観察できる利点である。

内リンパ水腫動物に関しては、HE標本に比べアーチファクトが認められないことにより、より正確な内リンパ水腫の測定が可能である。さらに、OCTでは標本を動かすことにより、任意の断面像を得ることができるのでより詳細な水腫の観察が可能である。

カナマイシン・エタクリン酸投与群、ストレプトマイシン外リンパ灌流群ではコルチ器の扁平化やラセン靱帯の菲薄化が認められた。これらの組織学的変化はHE標本においても認められたが、標本作成時の脱水操作によりコルチ器がより扁平化していたり、ラセン靱帯が骨壁から剥がれることがある。OCTではこれらのアーチファクトが認められないので、より正確なコルチ器やラセン靱帯傷害を観察可能である。これらの結果より、OCTにより障害蝸牛においてもより生体に近い状態で組織変化を観察できることが示された。また、脱パラフィンが不要なので、OCT観察後に分子生物学的手法などによる検討が行いやすい利点が挙げられる。

今後の展望としては、光源等の改良により非侵襲的に蝸牛内を観察できる可能性があり、CT、MRIに続く新たな画像診断機器として、臨床応用が期待される。今後、臨床応用に向けin vivoでの研究を進めていく予定である。

ま と め

側頭骨をEDTAで脱灰するとOCTで正常および傷害蝸牛の内部構造を描出できた。

従来の組織学的手法でみられるアーチファクトが無く、より生体に近い状態が観察できた。

透光性により深さの解像度が制限される。

臨床応用には更なる改良が必要である。

謝 辞

本研究は、東京大学先端科学研究センター山下真司教授、田久保勇也先生、東京大学医学部耳鼻咽喉科山唄達也教授、江上直也先生、松本 有先生、榎尾明憲先生との共同研究であり、皆様のご協力に深謝いたします。

文 献

- 1) Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, et al.: Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in vivo with optical coherence tomography. Arch Ophthalmol 112: 1584-1589, 1994
- 2) Jang IK, Bouma BE, Kang DH, et al.: Visualization of coronary atherosclerotic plaques in patients using optical coherence tomography: comparison with intravascular ultrasound. J Am Coll Cardiol 39: 604-609, 2002
- 3) Wong BJ, Zhao Y, Yamaguchi M, et al.: Imaging the internal structure of the rat cochlea using optical coherence tomography at 0.827 microm and 1.3 microm. Otolaryngol Head Neck Surg 130: 334-338, 2004
- 4) Lin J, Staeker H, Jafri MS: Optical coherence tomography imaging of the inner ear: a feasibility study with implications for cochlear implantation. Ann Otol Rhinol Laryngol 117: 341-346, 2008
- 5) Sepehr A, Djalilian HR, Chang JE, et al.: Optical coherence tomography of the cochlea in the porcine model. Laryngoscope 118: 1449-1451, 2008
- 6) Subhash HM, Davila V, Sun H, et al.: Volumetric in vivo imaging of intracochlear microstructures in mice by high-speed spectral domain optical coherence tomography. J Biomed Opt 15: 036024, 2010
- 7) Kakigi A, Takubo Y, Egami N, et al.: Evaluation of the internal structure of normal and pathological Guinea pig cochleae using opti-

- cal coherence tomography. *Audiol Neurotol* 18: 335-343, 2013
- 8) Tona Y, Sakamoto T, Nakagawa T, et al.: In vivo imaging of mouse cochlea by optical coherence tomography. *Otol Neurotol* 35: e 84-89, 2014
- 9) Kakigi A, Taguchi T, Takeda T, et al.: Time course of vestibular function changes of experimental endolymphatic hydrops in guinea pigs. *ORL* 71 (Suppl 1): 19-25, 2010
- 10) Yamasoba T, Kondo K: Supporting cell proliferation after hair cell injury in mature guinea pig cochlea in vivo. *Cell Tissue Res* 325: 23-31, 2006
- 11) Terayama Y, Kaneko Y, Kawamoto K, et al.: Ultrastructural changes of the nerve elements following disruption of the organ of Corti. I. Nerve elements in the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 83: 291-302, 1977
- 利益相反に該当する事項は無い。