

氏 名	た 田 浦 晶 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3031 号
学位授与の日付	平 成 19 年 1 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Recovery of hair cell function after damage induced by gentamicin in organ culture of rat vestibular maculae (ラット前庭器官培養におけるゲンタマイシン障害後の有毛細胞の機能回復に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 金 子 武 嗣 教 授 鈴 木 茂 彦 教 授 福 山 秀 直

論 文 内 容 の 要 旨

難聴や眩暈を引き起こす内耳障害は社会生活に支障を来しうる疾患であるにもかかわらず、現在も有効な治療法がほとんどない。聴覚及び前庭感覚の受容器細胞である有毛細胞、とくに感覚毛に音響外傷や薬物などによる障害が起こると、内耳機能は障害される。内耳感覚受容機構が障害から回復するためには、有毛細胞の機械受容器としての機能の回復が必須である。鳥類では、形態学的には有毛細胞感覚毛が再生し、機能的にも感覚受容機構が回復することが知られている。しかし、ほ乳類では前庭系の有毛細胞で感覚毛の再生が形態学的に一部報告されているのみである。ほ乳類における内耳感覚機能再生の可能性を明らかにするために、本研究では *in vitro* 実験により、ラット前庭有毛細胞を対象として、薬物による障害の後、機械受容器としての有毛細胞機能回復の可能性を検討した。

生後1-3日齢のラットのの前庭器官を培養し、ゲンタマイシン(GM)にて有毛細胞に障害を与え、その後再生した感覚毛の形態および機械受容器としての機能を検討した。形態学的にはF-actinのphalloidin染色により有毛細胞頂部・網状板部分における細胞間結合および感覚毛を観察し、走査電子顕微鏡(SEM)により感覚毛を観察した。機能的には有毛細胞の機械受容器として機能、即ちMET(mechano-electrical transduction, 機械電気変換)機能を評価した。有毛細胞はMETチャンネルにより、機械刺激量を電気信号に変換する。このチャンネルの機能が失われる事により、有毛細胞の機能、および感覚情報の神経伝達機能が失われる。本研究では有毛細胞のMET機能を機械刺激に対する細胞内Caイオン濃度変化として蛍光指示薬fura2を用いて評価した。機械刺激に応じてCaイオン濃度が上昇する標本をMET機能ありと判断した。

対照群では培養日数と共に感覚毛を有する細胞数および、MET機能を保持する標本の割合は減少し、培養17日目以降ではMET機能は認められなかった。SEMでも培養7日目頃までは感覚毛の正常形態は保持されているが、培養20日目頃では正常形態は消失した。感覚毛の正常形態とMET機能の発現には強い関連があり、正常形態の喪失によりMET機能も消失すると結論した。GM障害では急激に感覚毛は減少しMET機能は消失するが、その後感覚毛を持つ細胞は次第に増加し、培養2週間目以降には再びMET機能を確認できた。これより機械受容器としての有毛細胞機能は回復可能と考えられる。さらに蛍光指示薬FM1-43を用いてMET機能を評価した。FM1-43はMETチャンネルを透過し細胞内に蓄積される。GM障害後、再生した感覚毛を持つ有毛細胞にもFM1-43の取り込みを認めたことから、MET機能が確認出来た。またステロイド投与により、MET機能を有する標本の割合が増加したことより、機能回復にステロイドは有効であると考えられた。

以上よりほ乳類前庭器官で形態学的に有毛細胞感覚毛が再生し、機能的にも機械刺激受容機構が回復することが示された。また、アポトーシスを検出するTUNELではGM障害で一部陽性反応があったが、増殖の有無を見るKi-67は陰性であった。これは機械刺激受容機構の回復には、有毛細胞の増殖を伴わないことを示す。さらにFM1-43を取り込んだ後GM処理で感覚毛を消失した有毛細胞からも、12日後に再び短い感覚毛が認められた。一連の結果より有毛細胞感覚毛の再生は分化転換や増殖を介するものではなく自己修復による事の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

内耳障害は現在でもなお治療困難な疾患であるが、近年、哺乳類での前庭系有毛細胞の再生が形態学的に報告され、内耳障害の回復が期待されている。臨床応用の為には形態学的のみならず機能的にも回復する必要がある。本研究は哺乳類における内耳感覚機能回復の可能性を追求することを目的とした。ラット前庭の器官培養を行い、機能評価方法として感覚毛刺激に伴う細胞内カルシウム濃度変化を測定した。この方法は細胞レベルでの生理学的機能を検討できるので非常に有用である。また蛍光色素 FM1-43 を用いても感覚機能を検討した。結果、薬物障害にて感覚毛は一旦殆ど消失し、機能も失われるが、10日目以降では新しく感覚毛を観察することが出来た。さらに機械刺激に応じたカルシウム濃度上昇も認め、有毛細胞としての機能も確認できた。以上より哺乳類前庭器官で形態学的に有毛細胞感覚毛が再生し、機能的にも機械刺激受容機構が回復することが示された。さらに感覚機能の維持および回復にステロイドが有効であった。またアボトシスおよび増殖の有無を検討することにより、障害回復のメカニズムについても言及し得た。

本研究より、哺乳類の前庭において機能回復の可能性が示唆され、それはステロイド投与により増長されることがわかった。

以上の研究は哺乳類内耳機能回復の解明に貢献し、内耳障害の治療に寄与するところが多い。従って本論文は、博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。尚、本学位授与申請者は平成18年10月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。