

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16835

研究課題名（和文）蝸牛外側壁構成細胞の加齢性変化-連続切片走査型電子顕微鏡法による3次元解析-

研究課題名（英文）Age-related changes in the lateral cochlear wall component cells
Three-dimensional analysis by serial section scanning electron microscopy

研究代表者

正道 隆介（Shodo, Ryusuke）

新潟大学・医歯学総合病院・専任助教

研究者番号：00815764

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：2か月齢のラット蝸牛を摘出し固定、脱灰、エポン樹脂に包埋し、準超薄切連続切片を作成、走査型電子顕微鏡で撮影した画像をパソコン上で立体再構築した。また、6か月齢、12か月齢、24か月齢のラットについても同様の作業を試みたが、電子顕微鏡用の試料作成に難渋した。月齢の異なるラットについて、細胞毎の体積や蝸牛外側壁における占有率、基底回転・中回転・頂回転の差異などの統計学的な検討を行う段階に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蝸牛外側壁は血管条を中心として内リンパ液の特殊な高電位かつ高カリウムイオン環境に不可欠であることが知られており、その組織学的な変化は加齢性難聴に大きく影響していると推測される。通常は立体的観察が困難である蝸牛外側壁を、準超薄連続切片を走査型電子顕微鏡で観察し3次元再構築を行うことで立体像を得ることができ、蝸牛外側壁を構成する諸細胞の3次元像を解明できると考えられる。本研究の中では月齢毎のラットの差異について決定的な所見は得ることができなかったが、この手法の発展は加齢性難聴の病態解明、予防法または治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Two-month-old rat cochleae were removed, fixed, demineralized, embedded in Epon resin, semi-ultrathin serial sections were prepared, and images taken by scanning electron microscopy, and images were reconstructed three-dimensionally on a personal computer. The same process was also attempted for 6-, 12-, and 24-month-old rats, but the preparation of samples for electron microscopy was difficult. We did not reach the stage of statistical examination of the volume of each cell, occupancy in the outer lateral wall of the cochlea, and differences in basal, mid, and apical rotations for rats of different ages.

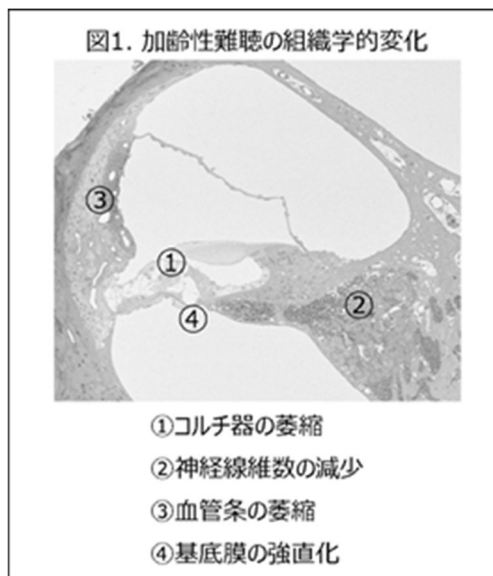
研究分野：耳鼻咽喉科・頭頸部外科

キーワード：加齢性難聴 内耳 蝸牛 組織学

1. 研究開始当初の背景

加齢性難聴はコミュニケーション障害をきたし高齢者の孤立、抑うつ、認知機能低下にも繋がり、国民的課題であると言えるが、有効な予防法や治療法は確立されていない。加齢性難聴の組織学的所見は 蝸牛基底回転起始部の神経線維、コルチ器の萎縮、 蝸牛神経を含む中枢神経系の神経線維数の減少、 血管条の萎縮、基底膜の強直化や他の機械的な障害、の4型に分類され(図1)、そのうち血管条に着目した。

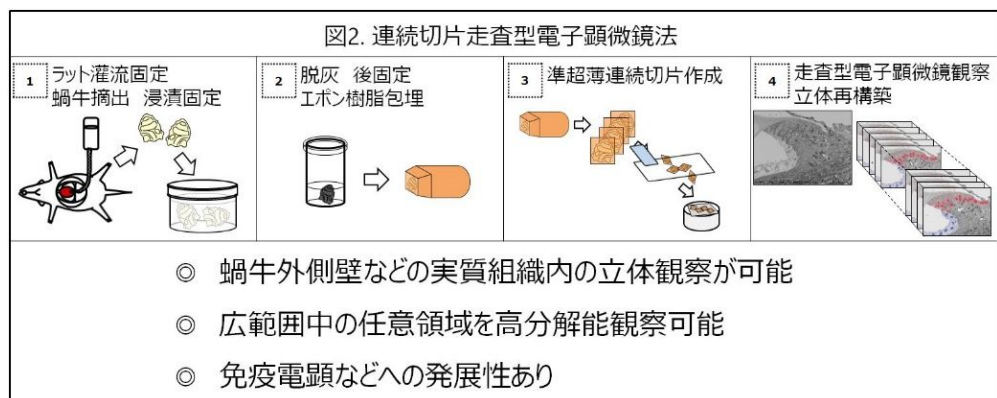
血管条は蝸牛外側壁に位置し、内リンパ液の高カリウムイオン環境、高電位環境を維持するために不可欠な機構である。しかし、血管条を含む蝸牛外側壁はコルチ器のような管腔構造ではないため、断面の観察は容易であるのに対して立体構造の観察は困難であり、構成細胞の立体構造や立体配列についての研究はほとんど行われていない。



2. 研究の目的

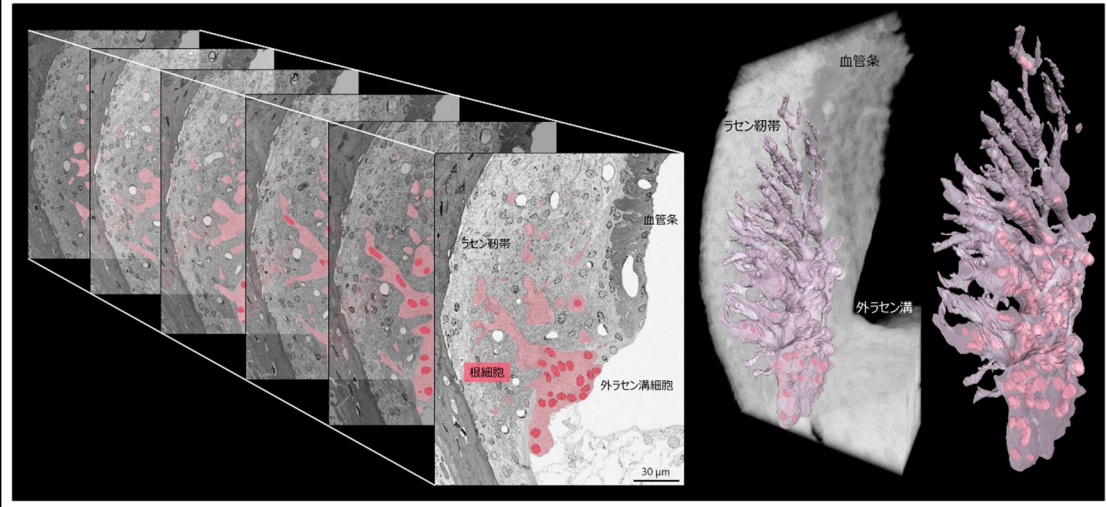
目的は、観察が困難な蝸牛外側壁の構成細胞(血管条基底細胞・中間細胞・辺縁細胞、ラセン靭帯線維細胞I型・II型・III型・IV型・V型、根細胞)の立体構造および立体配列を解明することである。申請者がこれまでに準超薄連続切片を用いた、連続切片走査型電子顕微鏡法

法(図2)により解析、報告した根細胞の立体配列(図3)は、まさに樹状



にラセン靭帯内の広範囲に広がる構造であり、内リンパ液へのカリウムイオン循環に有利と考えられた。根細胞の変性や萎縮で内リンパ液の恒常性が維持できずに、加齢性難聴を含む難聴疾患を来す可能性があると考えられた。また根細胞周囲に分布するII型線維細胞や、蝸牛内リンパ液の高電位・高カリウムイオン環境の恒常性に必須である血管条は、聴覚機能において重要な役割を果たしていると考えられるが、これらの細胞の組織学的研究では立体構造や立体配列に言及したものがほとんどない。本研究の目的は、根細胞からラセン靭帯、さらに血管条を構成する細胞の立体配列を解明し、月齢の異なる動物を用いることで加齢性難聴の原因解明を行うことである。

図3. 連続切片走査型電子顕微鏡法による根細胞の立体配列



3. 研究の方法

ラット蝸牛を摘出し固定、脱灰、エポン樹脂に包埋し、準超薄切連続切片を作成、走査型電子顕微鏡で撮影した画像をパソコン上で立体再構築する。具体的には Photoshop 上で画像から任意の細胞領域を抽出し領域選択、そのデータを Amira で立体再構築する。細胞毎の体積や蝸牛外側壁における占有率、基底回転・中回転・頂回転の差異も書くにする。月齢毎の組織変化を確認し、再構築画像から蝸牛外側壁の体積や、各構成細胞の体積を算出して比較検討する。

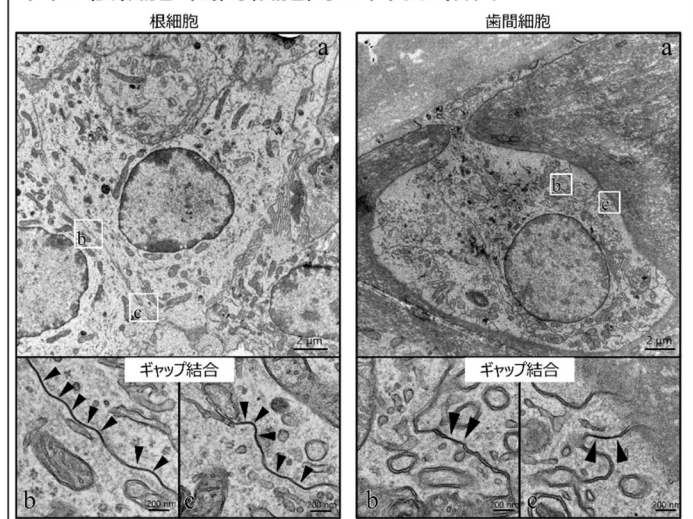
4. 研究成果

2 か月齢のラット蝸牛を摘出し固定、脱灰、エポン樹脂に包埋し、準超薄切連続切片を作成、走査型電子顕微鏡で撮影した画像をパソコン上で立体再構築した。また、6 か月齢、12 か月齢、24 か月齢のラットについても同様の作業を試みたが、電子顕微鏡用の試料作成に難渋した。月齢の異なるラットについて、細胞毎の体積や蝸牛外側壁における占有率、基底回転・中回転・頂回転の差異などの統計学的な検討を行う段階に至らなかった。一方で、透過型電子顕微鏡による観察では根細胞また歯間細胞には、カリウムイオンの循環

に関するギャップ結合を多数認めめた(図4)。

蝸牛外側壁は血管条を中心として内リンパ液の特殊な高電位かつ高カリウムイオン環境に不可欠であることが知られており、その組織学的な変化は加齢性難聴に大きく影響していると推測される。通常は立体的観察が困難である蝸牛外側壁を、準超薄連続切片を走査

図4. 根細胞・歯間細胞間のギャップ結合



型電子顕微鏡で観察し3次元再構築を行うことで立体像を得ることができ、蝸牛外側壁を構成する諸細胞の3次元像を解明できると考えられる。本研究の中では月齢毎のラットの差異について決定的な所見は得ることができなかったが、この手法の発展は加齢性難聴の病態解明、予防法または治療法の開発につながることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------