

(第3号様式)

学位論文要旨

氏名 高木太郎

論文 一過性内耳虚血に対する骨髄単核球細胞の静脈内投与の効果

学位論文要旨

<はじめに>

骨髄単核球細胞は、骨髄細胞のうちの単核球分画の総称であり、血管内皮前駆細胞や骨髄間質細胞を含む。これらの細胞は様々な虚血性疾患で局所における血管新生を促進し、組織の修復作用があることが知られている。血管内皮前駆細胞は、血管内皮細胞への分化、血管新生因子の分泌により、虚血局所での血管新生を促す。また、骨髄間質細胞も様々な血管新生因子を分泌する。骨髄単核球細胞を用いた細胞治療は、現在、脳梗塞、心筋梗塞などの虚血性疾患において、すでに臨床で応用されている。

突発性難聴の原因はいまだ不明であるが、ウィルス説とともに内耳虚血説が有力である。今回われわれは、突発性難聴治療に対する臨床応用に向けて、この骨髄単核球細胞を用いた内耳障害防御効果を検討した。

<対象および方法>

1. 骨髄単核球細胞の分離抽出法：8～16週齢のスナネズミ大腿骨および脛骨から骨髄細胞を取り出し、比重遠心分離法にて抽出した。最終的に一匹あたり $4\sim 5 \times 10^6$ 個の細胞を得た。
2. 一過性内耳虚血負荷：雄スナネズミ（8～12週齢）に全身麻酔をかけ、経口的に気管内挿管し人工呼吸管理を行った。前頸部皮膚切開を行い、両側の椎骨動脈に絹糸を掛けて5gの重りで牽引することで血流を遮断した。スナネズミは後交通動脈が欠損しており、椎骨動脈の血流遮断により内耳虚血を引き起こすことができる。虚血負荷15分後に牽引を解除し、血流を再開通させた。
3. 骨髄単核球細胞の静脈内投与：内耳への虚血負荷15分後、大腿静脈にカテーテルを留置し、骨髄単核球細胞、phosphate buffered saline (PBS) のいずれか投与した。以下、PBS投与群をcontrol群として細胞投与群と比較検討を行った。
4. 骨髄単核球細胞の局在の評価：骨髄単核球細胞を、緑色の蛍光色素PKH67にて染色した。PKH67陽性細胞を静脈内投与し、虚血負荷4日目に全身灌流固定を行い、蝸牛を採取した。採取標本で凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡にて観察した。
5. 聴力評価：虚血前、虚血1、4、7日後に沈静下に聴性脳幹反応を記録した。刺激には8000、16000、32000Hzのtone burst音を用いた。
6. 組織学的評価：虚血7日後に蝸牛を採取した。4%PFA液にて局所灌流固定を行った後、surfa

ce preparation 法にてコルチ器を取り出した。Rhodamine-phalloidin、Hoechst33342 による二重染色を行い、蛍光顕微鏡で観察し、有毛細胞の脱落割合を算出した。

7. ウェスタンブロット解析：本実験には、虚血 7 日後に蝸牛を摘出した骨髄単核球細胞投与群、control 群の比較検討を行った。サンプルは摘出した蝸牛を浸漬、細片化し、超音波破碎を加えホモジナイズした後、遠心分離で得られた上清の可溶性蛋白質を用いた。一次抗体として抗 GDNF、抗 BDNF、抗 VEGF、抗 Ang1、抗 FGF2、抗 NT3 抗体と反応させ、二次抗体以後は ECL Western blotting Kit を用いて施行し、神経栄養因子の発現量を比較検討した。

<結果>

骨髄単核球細胞の局在：PKH67 陽性細胞は迷路動脈やらせん動脈の内腔にみられたが、コルチ器や周辺組織への侵入像や融合像はみられず、有毛細胞と置換や融合することはなかった。

ABR 閾値変化：虚血前の ABR 閾値を 0dB として、ABR 閾値変化について比較検討した。8000、1600 0Hz においては、1、4、7 日後いずれにおいても骨髄単核球細胞投与群では control 群と比較して、ABR 閾値の上昇を有意に抑制していた。32000Hz においては、1、4 日後は有意差がみられたが、7 日後のみ有意差がみられなかった。

内有毛細胞の脱落割合：骨髄単核球細胞投与群と control 群において、内有毛細胞の核の消失と聴毛の脱落所見を観察したところ、control 群と比較して細胞投与群では内有毛細胞の脱落割合が有意に抑制されていた。

神経栄養因子蛋白の発現：骨髄単核球細胞投与群と control 群において、6 種類（GDNF、BDNF、VEGF、Ang1、FGF2、NT3）の神経栄養因子の発現を比較したところ、GDNF と NT3 の発現が、細胞投与群では有意に上昇していた。

<考察>

今回の実験では、虚血負荷直後に骨髄単核球細胞を静脈内投与し、内耳障害を防御するか否かを検討した。ABR 閾値変化や内有毛細胞脱落割合の結果から、細胞投与群は control 群よりも内耳障害が軽微であり、虚血性内耳障害を保護する効果をもつことが確認された。

骨髄単核球細胞による内耳保護作用効果のメカニズムは明らかではない。静脈内投与した細胞はらせん動脈内には確認されたがコルチ器には観察されず、この結果からは投与した細胞がコルチ器内へ沈着し、有毛細胞への分化や細胞融合による保護効果を示した可能性は低いと考えられる。神経栄養因子の発現が内耳において上昇していたことを考えると、骨髄単核球細胞が栄養因子を分泌し、これが障害部位に作用することによって内耳障害を抑制したという機序が最も考えられる。神経栄養因子の発現をウェスタンブロット法にて解析することにより、骨髄単核球細胞は神経栄養因子を活性化し、虚血性内耳障害に対して内耳機能保護効果に働いた可能性が推察された。

キーワード	骨髄単核球細胞、内耳虚血、突発性難聴、GDNF、NT-3
-------	------------------------------