

成熟後の内耳奇形ゴールデンハムスターの評価

矢田 和子

数年前、無治療飼育群に、偶然に、発見された内耳奇形ゴールデンハムスターを継代飼育中である。これを使用し、成熟後の蝸牛に見られた所見を観察し、新知見を得、この奇形の原因が細胞の成熟障害に起因することを検証した。また、他に例を見ない、特異な水泳行動について検討した。中枢神経系に光顕では顕著な異常を認めないことから、前庭耳石器の異常であることが、強く示唆された。(平成5年10月18日採用)

Evaluation of an Inner Ear Anomaly in the Adult Golden Hamster

Kazuko Yada

A new mutation of the inner ear structures was found in the golden hamster. Scanning electron micrographs revealed a drastic difference in the height of the rotated cilia rows in a reversed OHC₁ from the upper apical turn and severe OHC and IHC misalignment in the hook region.

These findings indicated a certain correlation with a cytomaturation disorder.

Our mutant golden hamsters did not exhibit any external anomalous manifestations, nor did they show any symptoms such as hyperactivity, jerking, vertical head movement, or rotary motion tendencies. However, these hamsters did have a very specific swimming behavior. They turned on their side with their head stretched back, and swam in a clockwise or counterclockwise direction over the water surface.

Some hamsters swam in a circular manner in a vertical plane while submerged in the water. With regard to the central nervous system, light micrographs show no difference between control hamsters and the affected ones. In our mutant hamsters, due to their abnormal swimming behavior, we strongly suspect the existence of an abnormality in the vestibular area, in particular, in the otolith organs. (Accepted on October 18, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19 (4) : 275-281, 1993

Key Words ① Mutant golden hamster ② Swimming behavior
 ③ Cytomaturatation ④ Otolith organs

はじめに

我々は数年前、独自の内耳奇形ゴールデンハ

ムスターを飼育繁殖群の中に、偶然に、発見しこの中から奇形群と正常群を分け、継代飼育してきた。内耳奇形動物は従来、数多くの報告が

あるが、重度の聴覚障害を伴うか、その形態においても、顕著な障害が多くみられる。このゴールデンハムスターは初め、蝸牛外有毛細胞第1列における極性異常に着目し、形態学的研究に加えて聴性脳幹反応 (ABR) および、電気生理学的検討を行ってきた。Fujita は、これらの研究により ABR I 波潜時比較で正常と奇形群には有意差を認めず、加重電位は正常であるが、蝸牛マイクロフォン電位の出力、蝸牛神経活動電位の振幅は奇形群で低下していたことを報告している^{1), 2)}。

その後の研究によって、著者は胎生期および生後発達を追及した結果、奇形群では生後3日目以降は、蝸牛外有毛細胞第1列に著しい細胞の回転を認めるのみで内有毛細胞、外有毛細胞第2, 3列の回転はほとんどみられない。ただし、胎生期から生後2日目までは、内有毛細胞また外有毛細胞各列にほぼ同等の、著しい回転が見られることを報告した³⁾。

また奇形群では、特異な遊泳行動を示すことが確認されたので、特に、成熟後の状態また世代別の評価に焦点をあて、中枢神経系の所見を含めて報告する。

材料と方法

1. 蝸牛形態観察

内耳奇形ゴールデンハムスターの蝸牛の胎生期から成熟後まで86匹を観察、また、各時期に合わせて、継代飼育中の正常ハムスターを用いた。ゴールデンハムスターを、麻酔下にて断頭し内耳を摘出し、2%グルタルアルデヒド-1%パラフォルムアルデヒドで第1固定し24時間後、磷酸緩衝液 (PBS) にてリンスし、1%四酸化オスミウム液 (pH 7.4) で第2固定した。その後上昇エタノール系列で脱水し、臨界点乾燥あるいはt-ブチルアルコール処理を経てpt-pd蒸着後、日立S-570型走査電子顕微鏡で観察した。

2. 中枢神経系観察

成熟後の内耳奇形ハムスターおよび正常ハムスター各8匹を使用した。

中枢神経系の光顕切片作製には、2%グルタルアルデヒド-1%パラフォルムアルデヒドにて全身灌流後、さらに同液中にて固定後、切片作製し、Klüver-Barrera's 染色を行った。

3. 行動観察

成熟後の内耳奇形ゴールデンハムスターの12世代から16世代、59匹、生後5カ月から17カ月を使用した。

水面1m上から落下させ、水平、垂直の二方向よりビデオ撮影した。各例5回の試技を行ったが、1日1回の試技とし、次回の施行まで数日をあけた。月齢別に、水面での旋回方向を検討した。

結 果

1. 蝸牛形態

(1) 成熟後：成熟後の内耳奇形ゴールデン

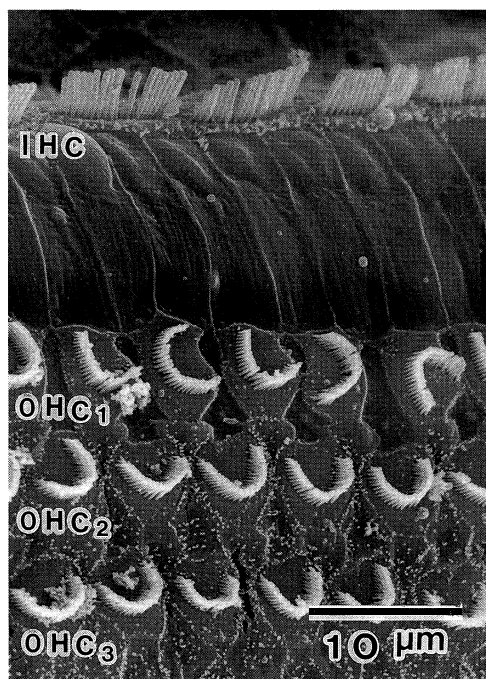


Fig. 1. The middle apical turn in the adult mutant golden hamster. The OHC stereocilia bundles are facing in random directions with frequent abnormal positioning of OHC₁ (the first row of outer hair cells).

ハムスターでは蝸牛外有毛細胞第1列における有毛細胞の回転の第1例を **Figure 1** に示す。それ以外に特徴的な所見として、蝸牛鉤部において有毛細胞の配列に著しい乱れが観察される (**Fig. 2**)。奇形群でも正常群と差はなく、外有毛細胞は第3～4列の聴毛からなる。しかし、奇形群の頂回転先端部分の180度回転した外有

毛細胞第1列にのみ見られる特徴的な所見として、聴毛の丈に長短があり調和がとれず、パイプオルガン状を示さないものが散見される (**Fig. 3**)。このような外有毛細胞の聴毛間にも、聴毛どうしを連結している tip-link が存在するのが確かめられた (**Fig. 4**)。また回転した内有毛細胞の聴毛間にも、tip-link が存在する (**Fig. 5-a, 5-b**)。

(2) 生後発達：奇形群で胎生期から生後2日目までは、内有毛細胞、また外有毛細胞各列にほぼ同等の、著しい回転が見られる。しかし、生後3日目以降は成熟後の所見と同様に、蝸牛外有毛細胞第1列に著しい細胞の回転を認めるのみで内有毛細胞、外有毛細胞第2, 3列の回転はほとんどみられない。正常群および奇形群とも動毛は生後8日目あたりから徐々に消失し始め生後12日目で完全に消失する。また動毛が完全消失した位置に空胞化が出現するが、奇形においては、空胞化の出現位置に多少のずれがみられる (**Fig. 6-a, 6-b**)。

2. 中枢神経系

成熟後の内耳奇形ハムスターおよび正常ハム

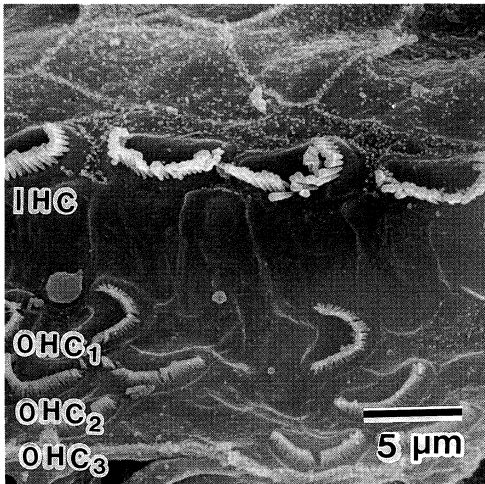


Fig. 2. In the hook region, the OHC and IHC misalignment is severe in this adult mutant golden hamster.

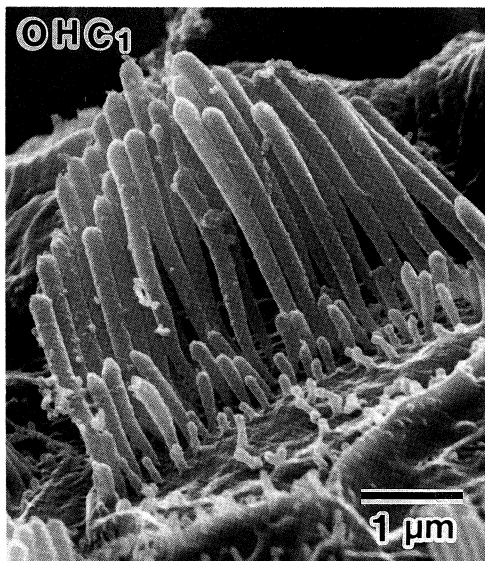


Fig. 3. In a reversed OHC₁ from the upper apical turn, the rotated cilia rows show a drastic difference in height in this adult mutant golden hamster.

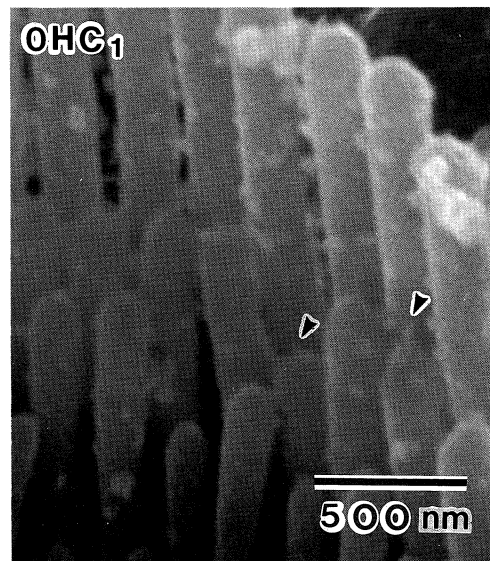


Fig. 4. Normal linkages observed in OHC₁ in a mutant golden hamster. Arrowheads indicate tip-link.

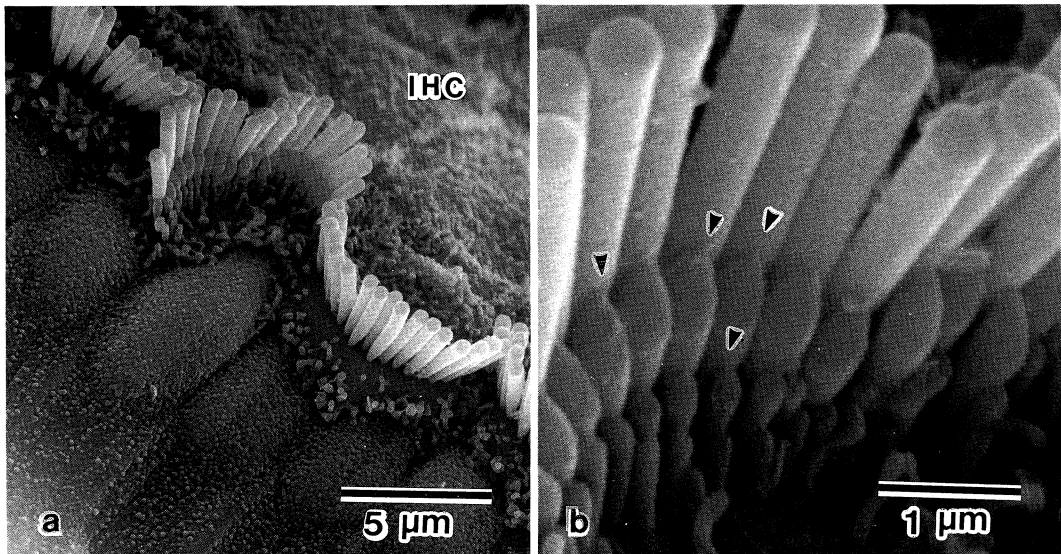


Fig. 5-a. The middle turn in a mutant hamster. A rotated IHC sporadically appears in every turn at about the same frequency in each turn.

Fig. 5-b. Normal linkages observed in IHC in a mutant golden hamster. Arrowheads indicate tip-link.

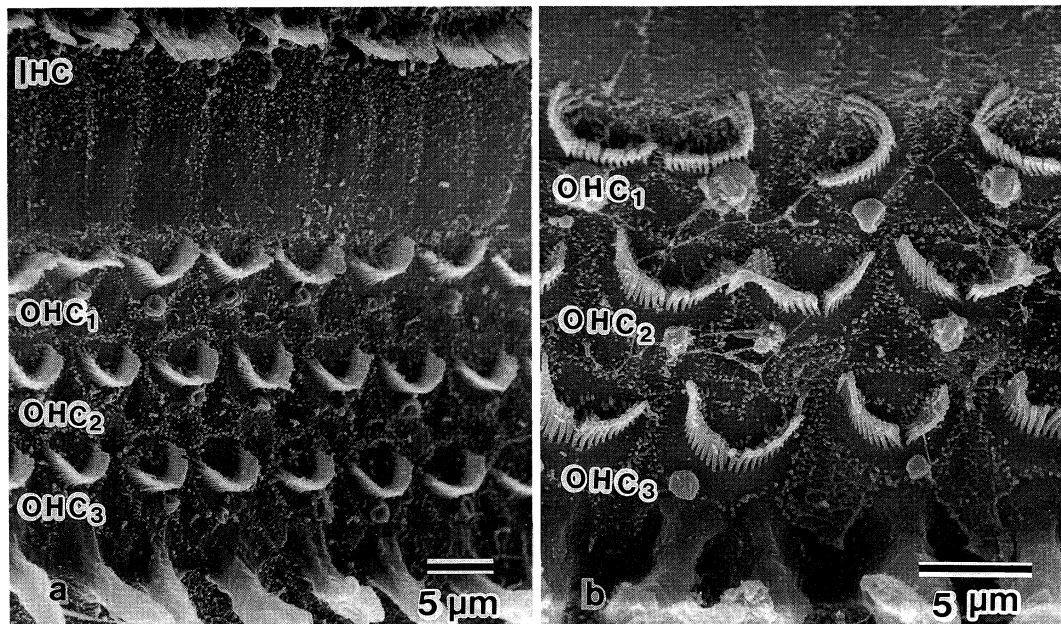


Fig. 6-a. The middle turn in a 12-day old normal hamster. The vacuolations appeared at the same position where the kinocilium once existed.

Fig. 6-b. The middle turn in a 12-day old mutant hamster. The position of the vacuolation is in misalignment.

スターの中樞神経には光顕では顕著な差はなく、ことに小脳と前庭神経核に著変はなかった(**Fig. 7-a, 7-b**)。

3. 行 動

水泳行動は正常群, 奇形群とも生後15日あたりから見られる。成熟後の正常群では安定した

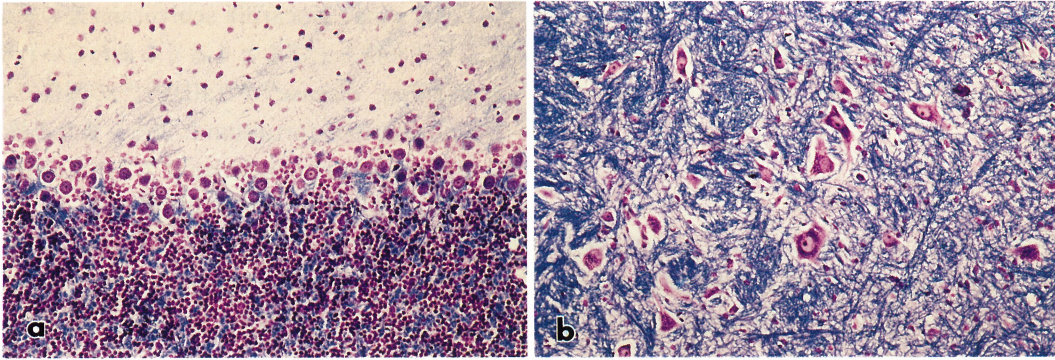


Fig. 7-a. Light micrograph of a normal cerebellum in a mutant hamster. (×20)

Fig. 7-b. Light micrograph of a normal vestibular nucleus in a mutant hamster. (×20)



Fig. 8. The mutant hamsters had a very specific swimming behavior. They turned on their side with their head stretched back, and swam in a clockwise or counterclockwise direction over the water surface.

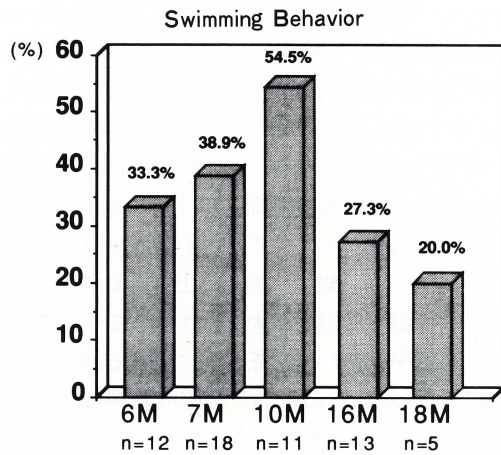


Fig. 10. Correlation between the month after their birth (horizontal axis) and the direction of swimming (vertical axis). There was no specific tendency.

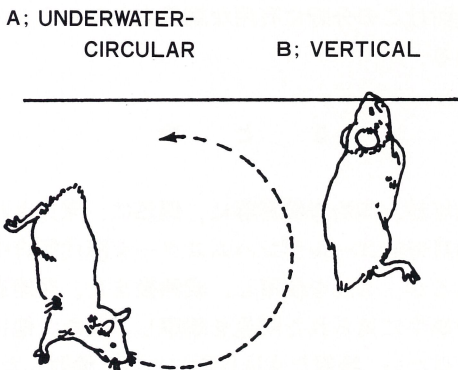


Fig. 9. Additional swimming behavior is classified as: A-underwater-circular, B-vertical swimmer.

犬かき様であるが、奇形群では、接水後突然、急旋回を始め、その姿勢は体幹を側位にし、頸を後屈する (Fig. 8)。水面での旋回が主体であるが、時折、水面下での回転運動、ごく短い垂直姿勢も随伴してあらわれる (Fig. 9)。水面での旋回時間は個体差があるものの、10分程度であり、その後、徐々に水面下に、潜水したまま旋回し続けるため、放置すれば溺水の転機を取ることとなり、早期の救出は不可欠である。旋回方向は時計方向回旋、反時計方向回旋と一定せず、旋回方向が切り替わることもある。なお正常ハムスターには、どの年齢層においても、安定した犬かき様で遊泳に、成長過程の変化もみ

られなかった。

月齢別に、旋回方向を検討したが、一定の傾向を認めなかった (Fig. 10)。

考 察

現在まで多く内耳奇形の報告があるが、外表奇形や重度の聴覚障害、また平衡機能障害を伴うものがその大半である。内耳形態においても顕著な障害が多くみられる。このゴールデンハムスターでは、蝸牛では有毛細胞の極性はまちまちであるものの、形態での大きな異常は見られない。このような内耳奇形をおこす要因として細胞成熟障害が考えられる。たとえば、成熟後の内耳奇形ゴールデンハムスターの蝸牛に焦点をあてれば、蝸牛鉤部における有毛細胞の配列や極性の乱れが著しい、また頂回転先端部分の180度回転した外有毛細胞第1列に聴毛の丈に長短があり調和がとれず、パイプオルガン状を示さないものが散見される。正常群においてもこれらの部分は生後発達が遅れがちでやや未成熟な形態が残存する。奇形群における同部分の未成熟な所見はこの奇形が細胞成熟機転に障害があったことを示唆するものである。また著者は胎生期から生後発達における蝸牛有毛細胞の発達を観察して奇形群では生後3日目以降は蝸牛外有毛細胞第1列に著しい細胞の回転を認めるのみだが、胎生期から生後2日目までは、内有毛細胞また外有毛細胞各列にほぼ同等の、著しい回転が見られることを報告している。この発達段階における異常も細胞成熟障害を強くうかがわせる所見である。

さて、発生学上、蝸牛と前庭は同じ起源をもつため、なんらかの奇形が前庭にもあってしかるべきである。中枢神経系に光顕では顕著な異常を見ないため特に前庭耳石器の異常を考慮し、平衡機能障害の指標に水泳行動を採用したが、他に例を見ない水泳行動を示した。内耳奇形動物のその他の報告例では水泳不可能ないしは水泳異常を示すものが見られる。マウスを使用した報告では、Gorrillによれば⁴⁾、*Ps. pyocyanea*,

mycobacteria, *Nocardia sebiovorans*等の感染により尾を持ち上げるとくるくるまわるいわゆる spinning disease⁴⁾や工田ら^{5)~8)}の報告では *Mycobacterium fortuitum* による、また高橋⁹⁾は *Mycobacterium chelonae* による内耳障害ことに耳石器の変成で平衡機能障害を示したことを報告している。Limら¹⁰⁾または喜多村ら¹¹⁾は遺伝的に耳石器の形態異常を示すマウスを使用し、耳石器形態と行動異常の関連を報告している。これらの報告例はすべて行動上頭部を傾斜させていたり、首ふり運動や回転する傾向を普段の生活上認め一見して他のものと区別できる。しかし、このゴールデンハムスターは他に例を見ない水泳異常以外は行動上の変化を認めない。おそらくは耳石器の形態異常も軽度のものとして推測される。今回、行動発達において特異な水泳に着目し、検討したが、その対象は生後5カ月から17カ月と十分老化の影響を受けていると考えられる。ただしこの内耳奇形ゴールデンハムスターは生後1カ月あたりより、旋回水泳が明瞭にみられるようになるため発達時に何らかの変成機転が耳石器におこるものと考えられる。内耳障害のうちで平衡機能の障害についての行動面での検索は Igarasi¹²⁾による歩行状態の計数的解析、木村¹³⁾による回転刺激、温度刺激の眼振による電気生理学的観察等がなされているが、未だ不明な問題が多く残されているこの耳石器の形態および、生後発達の行動評価における詳細な検討はこの分野に有用な結果をもたらすものである。

ま と め

数年前、無治療飼育群に、偶然に、発見された内耳奇形ゴールデンハムスターを継代飼育中であるが、これを使用し、成熟後また、発達過程の蝸牛に見られた所見を観察し、また、他に例を見ない、特異な水泳行動について検討した。

1. 成熟後の蝸牛：蝸牛鉤部の乱れが著しい。奇形群の頂回転先端部分の180度回転した外有毛細胞第1列にのみ、見られる特徴的な所見と

して、聴毛の丈に長短があり調和がとれず、パイオルガン状を示さないものが散見される。また回転した内外有毛細胞の聴毛間にも、tip-linkが存在する。

2. 生後12日目の蝸牛：動毛が完全消失した位置に空胞化の出現するが、奇形においては、空胞化の出現位置に多少のずれがみられる。

3. 成熟後の奇形群では、接水後突然、急旋回を始め、その姿勢は体幹を側位にし、頸を後屈する。水面での旋回が主体であるが、時折、水面下での旋回運動、ごく短い垂直姿勢も随伴してあらわれる。旋回方向は、時計方向、反時計方向また両者間の切り替えが見られる。また月齢別に旋回方向を検討したが一定の傾向を認めなかった。

4. 以上の結果および生後3日目以降は、内

有毛細胞、また外有毛細胞各列の、著しい回転が矯正されることから、この奇形の原因が細胞の成熟障害に起因することを検証した。また、他に例を見ない、特異な水泳行動は中枢神経系に光顕では顕著な異常を認めないことから、前庭耳石器の異常であることが、強く示唆された。

稿を終えるにあたり、ご指導いただきました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室 折田洋造教授に深く感謝する。また、終始ご協力いただいた守屋真理子氏に感謝する。本研究は、折田洋造教授あての川崎医科大学プロジェクト研究費(5-708)、また、文部省科学研究費(5771375)の援助によって行われたものである。

本論文の要旨は、第2回耳鼻科学会基礎学会(平成5年2月19日)、第19回日本耳鼻咽喉科学会中国地方部会連合講演会(平成5年6月6日)において発表した。

文 献

- 1) Fujita H, Orita Y: An inner ear anomaly in golden hamster. *Am. J. Otolaryngol.* 9: 224-231, 1988
- 2) Fujita H: Mutant golden hamsters with an abnormal outer hair cell stereocilia arrangement. *Hear. Res.* 44: 63-70, 1990
- 3) 矢田和子: 内耳奇形ハムスター蝸牛有毛細胞の生後発達. *川崎医学会誌* 18: 109-113, 1992
- 4) Gorrill RH: Spinning disease of mice. *J. Pathol. Bacteriol.* 71: 353-358, 1956
- 5) 工田昌也, 田頭宣治: 細菌(*Mycobacterium Fortuitum*)による内耳障害. *耳鼻臨床* 78: 2479-2486, 1985
- 6) 工田昌也, 原田康夫: 細菌(*Mycobacterium Fortuitum*)による内耳障害(平衡機能障害について). *耳鼻臨床 補* 8: 35-43, 1986
- 7) 工田昌也, 田頭宣治: 細菌(*Mycobacterium Fortuitum*)による内耳障害. *耳鼻臨床* 79: 1489-1494, 1986
- 8) Takumida M, Harada Y: Inner ear damage induced by *Mycobacterium fortuitum*. *Arch. Otolaryngol.* 243: 121-125, 1986
- 9) 高橋宏幸: 細菌(*M. chelonae*)による内耳障害. *日耳鼻* 93: 244-255, 1990
- 10) Lim DJ, Erway LC: Vestibular mechanisms in health and disease. *In Tilted-head mice with genetic otoconial anomaly. behavioural and morphological correlates*, by Hood JH, ed. London, Academic Press. 1978, pp 195-206
- 11) 喜多村 健, 八木昌人: Seal moving mouse 前庭の組織学的検討. *Ear. Res. Jpn.* 21: 109-110, 1990
- 12) Igarasi M: Dynamic equilibrium in squirrel monkeys after unilateral and bilatera labyrinthectomy. *Acta. Otolaryngol. (Stockh)* 69: 247-253, 1970
- 13) 木村訓子: 長時間反復回転刺激の水平半器官膨大部稜に及ぼす影響に関する実験的研究. *日耳鼻* 86: 870-880, 1983