

## 22 らせん神経節細胞の組織培養系の確立

研究所 感覚機能系障害研究部 武田 湖太郎, 森 浩一

【目的】耳鳴はその多くが原因不明で、感音難聴に伴うことが多いため治療が困難である。ある程度の有効性が報告されている治療法として低反応レベルレーザーの耳内照射がある。しかしその作用機序は不詳である。本研究はレーザーの細胞レベルでの作用を調べ、耳鳴の治療に役立つ研究の一環として、内耳のらせん神経節細胞の培養系を確立した。らせん神経節細胞へ効果を及ぼす神経成長因子の研究では、単離培養を用い、神経細胞の生存・維持への効果を調べた報告が多いが、細胞突起の伸長への効果など、確定していない効果がある。本研究では単離培養よりも生体に近い状態で培養できる組織培養の系を確立し、神経突起を維持・伸長させる条件を評価した。【方法】生後2-4日のラットよりらせん神経節細胞を無菌下に摘出し、200  $\mu\text{m}$  毎の切片を作成した。各切片はPoly-L-Lysineにより1時間コーティングしたカバーガラス上へ配置し、培養液に浸した。神経成長因子がらせん神経節細胞の成長におよぼす効果を比較するため、NGF (Nerve Growth Factor), BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), NT-3 (Neurotrophin-3) をそれぞれ投与した試料、および成長因子なしの試料をそれぞれ作成し、37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  存在下で無血清培養を行った。3日後、各試料を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、ニューロフィラメント抗体によりらせん神経節細胞の神経突起を免疫染色した。染色した神経突起の長さを切片ごとに計測し、各神経成長因子のらせん神経節への成長効果を比較した。【結果】BDNF投与群・NT-3投与群は共に、成長因子無し・NGF投与群と比較して神経突起の数および神経突起あたりの長さにおいて、BDNFでは2 ng/ml, NT-3では10 ng/ml以上の濃度で、濃度依存的に有意な神経成長効果があることが確認された。【考察】過去の報告では、単離培養においてBDNFはらせん神経節細胞の生存・神経突起の伸長に、NT-3は生存のみに効果があるとされてきたが、組織培養における本研究の結果ではNT-3はらせん神経節細胞の生存だけではなく神経突起の伸長に対しても効果的であることがわかった。聴覚末梢神経細胞への神経成長因子の効果は、聴覚有毛細胞・らせん神経節細胞の再生分野や、人工内耳埋め込み手術前に神経細胞の死滅・縮退を防ぐための処置への利用として期待されている。我々は本研究で確立した組織培養系によって成長した神経細胞を用いることにより、耳鳴への低反応レベルレーザー治療の効果を検証するための細胞内カルシウムイメージング実験系を構築している。