

内耳蝸牛における内有毛細胞感覚毛と 蓋膜との接着状態に関する研究

学位論文内容の要旨

【目的】

蝸牛コルチ器には内有毛細胞,外有毛細胞の2種類の感覚細胞が存在し,その細胞表面には多数の感覚毛が配列している.さらにその上を覆うように,蓋膜という膜状の構造物が存在する.コルチ器は有毛細胞の感覚毛が屈曲することによって機械的振動の電気変換をおこなっている.したがって蓋膜下面と内外有毛細胞感覚毛の先端の接着状態に関しては感覚毛の屈曲様式,すなわち機械電気変換機構を考察する上で極めて重要な部位となる.

これまでの研究から,外有毛細胞感覚毛は蓋膜にささり込むように接着があることがあきらかにされている.この接着の証明には,透過型電子顕微鏡で直接ささり込んでいる部位を観察する方法と,走査型電子顕微鏡でささり込む外有毛細胞感覚毛の配列と一致して蓋膜の裏側に残された圧痕を観察する方法とがある.しかし透過型電子顕微鏡では広範囲の観察は難しいため,実際の接着状態の研究には圧痕の観察が広く用いられている.

一方,内有毛細胞感覚毛に関しては,多くの幼若,成熟高等動物で詳細な研究がなされているにも関わらず,いまだ一致した結論が得られていない.幼若なネコやマウスの蝸牛回転の基底回転の限局した部位に圧痕の報告例が存在するが,成熟したネコやマウスにはいまだ認められていない.成熟高等動物ではヒト1耳に圧痕が認められたとする報告,透過型電子顕微鏡によるラットの接着の報告,ラットの基底回転の圧痕の観察の報告がある.しかし一方で,ラットも幼若期には圧痕が存在するが成長に伴い消失するとする報告も存在する.現時点では生後初期の蝸牛の形態変化の時期に内有毛細胞の感覚毛は蓋膜と接着しており,成長の過程で蝸牛が成熟した時点で蓋膜と離れるのではないかとする説が一般的に受け入れられている.しかしながら蓋膜の研究に最も用いられているモルモットでは,いまだに成長の段階に関わらず接着を認めたとする報告はない.蝸牛神経の95%が内有毛細胞から発しており,この部位の接着状態については古くから関心を持たれながらも矛盾に満ちた状態で残されている.

蓋膜は標本作製過程で著しく変形するため,たとえ接着していても観察が困難になっている可能性があり,また高等動物内での内耳構造の種差があるとは考えにくい.今回われわれは,内有毛細胞感覚毛と蓋膜との間の接着が標本作製の過程で失われてしまうのではないかと仮説を立て,聴覚実験に最も普遍的に用いられるモルモット,マウスにおいて固定方法の工夫によりこの証明を試みた.

【材料と方法】

プライエル耳介反射正常の体重450~800gの成熟ハートレイ種モルモット10匹,および生後12~24週の成熟 dd マウス12匹を使用し,両種ともに蓋膜観察用の以下の固定を行った.ネブタール腹腔内注射による麻酔後に,左心室から2.5%グルタールアルデヒドの全身環流を行い,可及的迅速に断頭し蝸牛を採取,正円窓および卵円窓から1%四酸化オスミウムを急速注入し,同固定液中に室温で10時間浸漬した.さらに2%タン

ニン酸中に4℃で2時間,再度1%四酸化オスミウム中に20℃で2時間浸漬固定を行った.その後,上昇アルコール系列で脱水し酢酸イソアミルで置換,液体炭酸ガスによる臨界面乾燥を行った.試料を試料台にのせ実体顕微鏡下で蝸牛骨包,膜迷路組織を除去しコルチ器を露出した.蓋膜は蝸牛から取り外さずにコルチ器をくずす形で直接裏側を観察できる状態とし白金,パラジウムによる金属コーティングを行い,走査型電子顕微鏡で観察した.

【結果】

両種ともに各蝸牛の基底回転から頂回転までの蓋膜裏面を観察した.モルモットの蝸牛は全部で4回転存在した.基底回転から3回転目中央まで,つまり蝸牛全体の下方約3分の2において,蓋膜の裏側中央に帯状に観察されるヘンゼン条の外側縁に内有毛細胞の感覚毛の配列と一致して一列に並んだ圧痕が観察された.また一部の内有毛細胞感覚毛がちぎれて蓋膜側に残存しており,その感覚毛の先端がしっかりと蓋膜に刺さり込んでいる像も観察された.ひとつの内有毛細胞あたりの接着個数は,基底回転下方で11から14個,2回転目下方で9から12個,3回転目下方で2から8個と,頂回転側にいくほど少なくなっていく傾向があった.圧痕の大きさは,250から350nmではほぼ内有毛細胞感覚毛の径と一致し回転別に差は無かった.配列は基底回転では直線的で,2回転目以上ではじぐざぐであった.深さは基底回転で深く,頂回転側にいくにしたがって浅くなっていく傾向があった.

マウスの蝸牛は全部で1回転半存在した.このうち,基底回転1回転までの蝸牛の下方約3分の2において,ヘンゼン条の外側縁に内有毛細胞の感覚毛の配列と一致してヘンゼン条の外側に隆起が存在し,その隆起上に極めて浅くまばらに圧痕が観察された.マウスの圧痕はモルモットと異なり極めて浅く不明瞭であった.深さはモルモットと同様の傾向で下方では比較的深く,上方では浅くなっていた.大きさは300から450nmと,モルモットに比較してやや大きめで,部位による差は認めなかった.またマウスにおいても内有毛細胞感覚毛の先端が蓋膜に刺さり込んでいる部分が観察されたが,残存している感覚毛は一定の傾向をもたずにまばらに存在し部位別の差はなかった.

【考察】

従来の聴覚機構は,蓋膜と外有毛細胞感覚毛との接着はあり,内有毛細胞とは接着がないことが前提となって構築されてきた.そのため,内有毛細胞感覚毛の屈曲は,音が入力した際におこる基板振動に伴う内リンパ液の還流によって引き起こされるとされてきた.このような定説に固まりつつある一方,コウモリなどの下等動物で接着が存在する報告や人工内リンパ液を用いた生の蝸牛の観察において,モルモットの蓋膜と内有毛細胞感覚毛は極めて密接な位置関係であることを示唆する報告もある.今回われわれは固定法を工夫することによってこの接着の観察が可能になるのではないかと考え,聴覚生理学実験,内耳形態研究において最も広く使用されている成熟モルモットおよびマウスにおいて検討した.

今回接着の証明に成功したのは,モルモット,マウスともに蝸牛の下方2/3までである.配列している圧痕の形状や蓋膜側に残存した内有毛細胞感覚毛の形態および対応する部位の感覚毛の配列様式から,感覚毛の最外側の1列だけが接着しているものと思われる.これらの圧痕の深さが上方の回転にいくに従って浅くなり数が減少していく傾向があるのは,接着状態が基底回転側でより強く上方の回転にいくほど弱くなっているため,上方の回転ではより丈の長いものだけが緩やかに接着しているものと考えられる.頂回転側の1/3の接着に関しては現在証明できなかったが,さらなる固定方法の工夫によって今後接着を証明できる可能性が残されている.しかし,少なくとも蝸牛の下方2/3の範囲において成熟モルモット,マウスで圧痕の存在が初めて証明されたことは,これまで認められなかった主たる原因がアーチファクトのためであり,高等動物種間の種差の存在や成長過程での一時的な接着というこれまでの定説を否定することができる十分な材料になると考える.すなわち本研究により少なくとも蝸牛の下方2/3の中高音域の音受容機構において,内有毛細胞感覚毛の屈曲は内リンパの環流によらず直接蓋膜によって行われるということが証明された.

【結語】

有毛細胞が脱分極を起こすためには感覚毛が蓋膜と基底板の間に生じる相対的な変位により感覚毛が屈曲する必要がある。外有毛細胞感覚毛は蓋膜に刺さり込むように接着しているために、その剪断力は直接蓋膜より得られていることが知られていた。これに対し、内有毛細胞感覚毛は大部分の高等動物において接着の証拠が認められておらず、その剪断力は周辺の内リンパの環流によって得られると推察されていた。今回、これまで接着が存在しないとされてきた成熟モルモットおよび成熟マウスにおいて、少なくとも蝸牛の下方2/3に内有毛細胞感覚毛の先端が刺さり込んでいたと考えられる圧痕および直接感覚毛先端が刺さり込んで存在することを走査型電子顕微鏡下で明らかにした。この観察結果は、内有毛細胞感覚毛の剪断力も直接蓋膜から得られることを示唆している。また、これまで内有毛細胞の圧痕の証明が困難であった原因は試料作成の際の蓋膜の変形のためであり、蓋膜観察用の固定方法の工夫により、さらなる研究の進展が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 福 島 菊 郎

学 位 論 文 題 名

内耳蝸牛における内有毛細胞感覚毛と

蓋膜との接着状態に関する研究

蝸牛コルチ器には内有毛細胞、外有毛細胞の2種類の感覚細胞が存在し、その細胞表面には多数の感覚毛が配列している。さらにその上を覆うように、蓋膜という膜状の構造物が存在する。これまでの研究から、外有毛細胞感覚毛は蓋膜にささり込むように接着があることがあきらかにされており、この接着の証明には、透過型電子顕微鏡で直接ささり込んでいる部位を観察する方法と、走査型電子顕微鏡でささり込む有毛細胞感覚毛の配列と一致して蓋膜の裏側に残された圧痕を観察する方法とがある。一方、内有毛細胞感覚毛に関しては、多くの幼若、成熟高等動物で詳細な研究がなされているにも関わらず、いまだ一致した結論が得られていない。現時点では生後初期の蝸牛の形態変化の時期に内有毛細胞の感覚毛は蓋膜と接着しており、成長の過程で蝸牛が成熟した時点で蓋膜と離れるのではないかとする説が一般的に受け入れられているが、蓋膜の研究に最も用いられているモルモットでは、いまだに成長の段階に関わらず接着を認めたとする報告はないなど、この接着状態の議論は矛盾に満ちた状態で残されている。

蓋膜は標本作製過程で著しく変形するため、たとえ接着していても観察が困難になっている可能性があり、また高等動物内での内耳構造の種差があるとは考えにくい。今回、内有毛細胞感覚毛と蓋膜との間の接着が標本作製の過程で失われてしまうのではないかとの仮説を立て、聴覚実験に最も普遍的に用いられるモルモット、マウスにおいて固定方法の工夫により走査型電子顕微鏡による内有毛細胞感覚毛の圧痕の証明を試みた。

体重450~800gの成熟ハートレイ種モルモット10匹、および生後12~24週の成熟d dマウス12匹を使用し、両種ともに蓋膜観察用の以下の固定を行った。ネンブタール腹腔内注射による麻酔後に、左心室から2.5%グルタルアルデヒドの全身環流を行い、可及的迅速に断頭し蝸牛を採取、正円窓および卵円窓から1%四酸化オスミウムを急速注入し、同

固定液中に室温で10時間浸漬した。さらに2%タンニン酸中に4℃で2時間、再度1%四酸化オスミウム中に20℃で2時間浸漬固定を行った。その後、上昇アルコール系列で脱水し酢酸イソアミルで置換、液体炭酸ガスによる臨界点乾燥を行った。試料を試料台にのせ実体顕微鏡下でコルチ器を露出した。蓋膜は蝸牛から取り外さずにコルチ器をくずす形で直接裏側を観察できる状態とし白金、パラジウムによる金属コーティングを行い、走査型電子顕微鏡で観察した。

結果、両種ともに蝸牛の下方約3分の2の範囲に内有毛細胞感覚毛の圧痕が存在していることが明らかとなった。さらに蓋膜側に感覚毛の一部が付着している部分が観察され、その先端が蓋膜に刺さり込んでいることを示した。さらに、その圧痕の状態に回転別に違いが存在し、頂回転側にいくほど接着が緩やかになっていることが示唆された。従来その接着が存在しないとされてきた2つの動物種において、初めて接着の証拠が呈示されたことによって、すべての高等動物にこの接着が存在する可能性が示唆される。

公開発表にあたり、阿部教授から接着の有無による聴覚機構への影響、圧痕の部位差の意義、さらに圧痕の配列および数の違いの感覚毛の屈曲様式への影響についての質問があり、次いで福島教授から、従来の固定法で見つからなかった解釈、圧痕の部位差と蓋膜を構成する成分との関連、内有毛細胞、外有毛細胞の役割の違いに関する質問があり、さらに主査の犬山征夫教授より頂回転側の接着状況と機能との関連、研究の将来の展望についての質問がなされたが、申請者は概ね適切な回答をした。

本研究は、モルモット、マウスにおいて内有毛細胞感覚毛と蓋膜との接着を初めて明らかにしたことで、聴覚生理学分野、内耳形態学分野に大きく貢献したものである。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。