SCANNING ELECTRON MICROSCOPIC OBSERVATION ON THE COCHLEA TREATED WITH FROZEN RESIN CRACKING METHOD

TERUYUKI AOKI, M.D.

Department of Otolaryngology, Okayama University Medical School, Okayama

(Director: Y. Ogura, M.D.)

By the use of frozen resin cracking method, scanning electron microscopy (SEM) makes it possible to investigate the deeper and finer structures of the inner ear. Another merit of this method is to obtain any sections of the organs without any significant artifactual damages to the tissues.

The inner ears of the guinea pig were fixed and stained with osmic acid. After the cracking procedure frozen specimens were subjected to CO₂ critical point drying, the conductive coating of carbon and gold successively, and finally submitted to SEM observation.

Some of the remarkable findings are as follows:

1) The cellular pattern of stria vascularis, spiral prominence and outer sulcus was different each other in the lateral wall of the cochlear duct.

2) A considerably big space was found around nerve fibers within the osseous spiral lamina. Small holes of about 3μ in diameter were also noted on the lower surface of the osseous spiral lamina. These holes and the space might be intercommunicated between cortilymph and perilymph in the scala tympani.

3) The tectorial membrane seemed to be composed of two layers, namely, the upper fibrous and the lower basal or granular layer. Regarding the relation of the tectorial membrane to hairs of the hair cells, situations were fairly different between outer and inner hair cells. Tips of hairs in the outermost row of outer hair cells penetrated into the granular layer of the membrane making a firm contact. On the other hand, at the lateral side of the outermost row, hairs of the inner hair cells were attached to the tectorial membrane with granular substances protruding from the undersurface of the granular layer.

4) At the hook region, hair cells became less in number mainly at the outermost row closer to the cecum vestibuli.

A 81—0340—23010

モルモット蝸牛の走査電顕的研究

——樹脂冷凍割断法による——

岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：小倉義郎教授）

青 木 輝 行

緒 言

蝸牛膜迷路の形態学的研究は Alfonso Corti (1851)¹⁾ に始まり、その後、光学顕微鏡を使用した Hensen

(1863)²⁾, Retzius (1884)³⁾, Held (1926)⁴⁾, Kolmer (1927)⁵⁾, らによりかなり詳細にその構造が解明された。近年, Pease & Baker (1948)⁶⁾ により創始された

超薄切片法を Engström, ら (1953)^{7), 9)} が内耳膜迷路の観察に応用し、超薄切片法による透過型電子顕微鏡（以下、透過電顕）学的研究が始められた。以後、多くの研究者により蝸牛膜迷路の内部超微細構造はほとんど解明され、形態学的研究は完成されたように思われる (Engström ら^{9), 10)}, Spöndlin¹¹⁾, Hilding ら¹²⁾, Iurato^{13), 14), 15)}, Kimura¹⁶⁾, 中井^{17), 18)}, 中山^{19), 20)}, 河本ら²¹⁾, 山田²²⁾。しかし、透過電顕による観察方法は内部構造の超微細的解明には非常に秀れているが、蝸牛のような複雑な立体構造を全体的に把握するには困難である。近年開発された走査型電子顕微鏡（以下、走査電顕）は組織の表面構造の立体的観察に適しており、耳鼻科領域に最初に応用したのは、Barber & Boyde (1968) で家兎などの気管粘膜や嗅部粘膜などを観察し、線毛の立体的微細構造を研究した。つづいて Lim & Lane (1969, 1970)^{24), 25), 26)} が走査電顕をモルモット蝸牛の観察に応用し、さらに、小坂²⁷⁾, 小坂ら^{28), 29), 30)}, Lim^{31), 32), 36)}, Lindemanら³³⁾, Engström ら^{34), 35)}, Marovitz ら^{37), 40)}, 滝口³⁹⁾, など、その報告もしいに増加し、この間試料作製法の改良とあいまって、より生体に近い状態での観察が実用化されてきて種々の新知見が得られてきた。しかし、従来の走査電顕による報告は組織の表面構造の観察に限られており、蝸牛のような複雑な立体構造を有する組織の、特に内部構造の解明には不十分である。今回、著者は細胞の内部構造を観察する目的で考案された樹脂冷凍割断法³⁸⁾を用いて、モルモット蝸牛を割断し、表面構造に加えて内部・下部構造までを観察していくつかの新知見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

A 実験材料

実験にはプライエル耳介反射鋭敏な、体重300-350gの有色成熟モルモットを使用した。

B 実験方法

モルモットを断頭後、すみやかに蝸牛骨胞を取り出し、骨胞骨壁をできるだけ広範囲に除去し、蝸牛を露出させた。ついで、実体顕微鏡下にあぶみ骨、正円窓膜を除去し、蝸牛頂に小孔を開けた。蝸牛組織全体を2%オスミウム酸固定液 (0.14M, Veronal buffer pH 7.25-7.40) 中に浸け、正円窓・卵円窓より蝸牛頂部に向けて蝸牛組織がすみやかに、かつ十分に固定されるように micropipette を用いて固定液をゆるやかに灌流した。ひきつづき、この固定液中にて1時間固定後 Veronal buffer にて洗滌し、上昇エタノール系列による脱水を行なっ

た。

この間、70%エタノール中にて試料を小さくし、ゼラチンカプセル (日本薬局法 No. 2) に蝸牛全体が封入できるようにした。エタノール系列による脱水後、樹脂冷凍割断法³⁸⁾を行なった。すなわち、無水アルコール中の試料を酸化プロピレンに置換し、30分間放置した後、酸化プロピレンとセメダイン 1500 (Epoxy resin Cemedine Co. Japan) の等量液に移し、3~4時間放置し、つづいてセメダインだけの液中に24時間放置した。この操作により試料中の酸化プロピレンとセメダインが完全に置換する。試料をセメダインとともにゼラチンカプセルに封入し、-30°C 冷凍庫中に1~2時間放置し、試料を冷凍させた。冷凍庫の中で蝸牛をゼラチンカプセルごと、ノミ・ツチを使用し、衝撃だけで割断しナイフマークが試料に加わらないように注意した。割断された試料をただちに酸化プロピレンに浸けた。この液を30分ごとに8~10回交換し、試料に浸透したセメダインを除去し酸化プロピレンに完全に置換させた。この試料を酢酸イソアミルに置換し、田中式炭酸ガス臨界点乾燥器 (鳥取大・田中敬一教授作製) により試料を乾燥させ、日本電子製試料台に導電塗料 (Dottite paint D 550) で接着し、カーボン・金の二重蒸着を行なった。観察には日本電子製 JSM-U3 型走査型電子顕微鏡を用い、加速電圧 25KV 倍率100~30000倍で行なった。また、一部の試料については、前述のオスミウム酸単独固定を行なったものを脱水途中の70%エタノール中にて従来通りの surface preparation technique を用いて標本作製を行ない、90%エタノール中の試料を液体窒素に浸け、約-150°C に急速冷却したものを日本電子製 Cryoscan にて観察した。

研究成績

(1) 蝸牛外リンパ腔表面

外リンパ腔外側壁は、鼓室階、前庭階とも大差なく、fibrocyte, mesenchymal epithelial cell に似た細胞に被われているが、ところどころに上皮細胞に被われていない網目状組織が露出した部位が認められる (図1, 2)。

(2) 蝸牛管内腔外側壁

蝸牛管内腔外側壁には血管条、ラセン隆起、外ラセン溝があり各部で細胞形態に差が認められる (図3, 4)。血管条の細胞は大型のほぼ正六角形をなしている (図4中のA)。ラセン隆起では、その上縁の細胞は長軸が基底板と平行な細長い六角形の細胞形態を示し、中央部分 (頂部) では血管条よりやや小型のほぼ正六角形からな

る細胞形態を示しており、更に下縁では、細胞形態はしだいに大きくなり、外ラセン溝細胞に移行している（図4中のB、C）。そして、いずれの部位の細胞表面にも多くの微絨毛が認められる。

(3) 骨ラセン板

骨ラセン板の断面を観察すると、骨ラセン板内の神経線維の周囲にはかなりの広さの間隙があり、骨ラセン板の下側面に鼓室階とこの神経線維周囲腔を結ぶ3μ内外の小管腔が認められた（図5、6、7）。骨ラセン板の鼓室階面は軽石状を呈しており大小不同の孔が多数存在するが、これらの孔はそれぞれが直接骨ラセン板内の神経線維周囲腔と交通しているのではなく、数個の孔が集まって上述の小管腔となり、この小管腔を介して神経線維周囲腔と交通している。

(4) コルチトンネル部の基底板

コルチトンネル側のところどころに小孔が認められ（図8）、一方、鼓室階側には紡錘形をなした細胞が蝸牛軸に平行に数珠つなぎのように配列していて、ところどころに細胞に被われていない下部の線維構造の露出した部分が認められる（図9）。しかし、コルチトンネルと鼓室階を結ぶ管腔は認められなかった。

(5) 蓋膜

蓋膜は大きく2層に分けることができる。

上層は放射状に走る線維に富んだ fibrous layer で厚くて蓋膜の大部分を占めており、その表面は網目状の covering net で被われている。一方、下層は無構造な顆粒状物質よりなる薄い granular layer で、ゼラチン様物質から構成されているものと想像される。これら2層の結合は比較的確であると思われるが、内有毛細胞のすぐ内側（border cell の直上部付近）で両層が比較的固く接着している部位が認められた。また、蓋膜の granular layer は内有毛細胞より3個内側の内ラセン溝細胞に付着しており、蓋膜をコルチ器に結びつける錨の役目を果たしているものと推察される（図10、11）。

その他、granular layer は内、外有毛細胞聴毛とも接着しているが、この点に関しては次項で述べる。蓋膜の外縁部の形態については、fibrous layer の外縁部は最外側ダイテルス細胞節板付近で終っているが、granular layer は最外側ダイテルス細胞節板とヘンゼン細胞の境界部に連続的に付着し、さらにヘンゼン細胞の方に延びてその細胞表面を被っている（図12、13）。Cryoscan による観察でも同様に granular layer が連続してヘンゼン細胞表面を被っており、試料観察中に乾燥と思われる

artifact により granular layer がヘンゼン細胞より翻転してゆく像が認められた（図14、15）。

(6) 蓋膜と有毛細胞聴毛との関係

外有毛細胞聴毛と蓋膜の関係を見ると、聴毛はその最外側列の先端が granular layer にはまり込んだ形で接着している。また、聴毛先端に granular layer の一部が剥れて付着している像も認められた（図16、17）。一方、内有毛細胞聴毛と蓋膜の関係は granular layer から下方に突出した顆粒状物質が聴毛最外側列の先端外側面に接着しており、外有毛細胞聴毛の場合と異なった接着様式を示している（図12、18）。

(7) hook 領域の有毛細胞の形態的变化

外有毛細胞は基礎回転では3列存在していたものが hook 領域においては cecum vestibuli に近づくにつれて、最外側列の細胞より配列の不整、消失をきたして2列となり、やがて第2列の細胞も消失し第1列のみとなり、これも消失して内有毛細胞列のみ残るが、ついにはこれも消失している。そして、個々の外有毛細胞聴毛の配列については、聴毛の作るW型の角度は下方に向うにつれてしだいに鈍角となり hook 領域では、ほとんど内有毛細胞聴毛と同様に一直線となっている（図19、20、21）。

考 按

走査電顕観察の試料作製のため、固定、脱水、preparation、乾燥、蒸着、など一連の標準処理が必要であるが、これらの各段階で起こる試料の artifact をなるべく少なくして、組織の自然の状態を維持するよう試料作製技術を研究改善することは、特に内耳のように微細な形態学を研究するうえに極めて重要である。

教室の滝口³⁹⁾はこれらの問題について比較検討を行った。著者も炭酸ガス臨界点乾燥法を用い乾燥時の artifact を少なくした。また、従来より行なわれてきた surface preparation technique では試料の表面のみしか観察できず、内部構造、下部構造を観察するには表面にある組織を除去するか、試料作製中に偶然生じた割れ目などを利用する以外に方法がなく、しかも前者の場合には artifact が加わり自然の状態を観察することができず、後者の場合には偶然性が働き実際には役立たない。

樹脂冷凍割断法は蝸牛のように細胞間隙の多い複雑な構造を解明するには極めて有利な方法であり、この方法によると蝸牛を骨ごと割断するので内部の軟組織に対する artifact は少なく、得られた割断面を観察することにより、表面のみならず蝸牛の内部や下部の構造、形態を

一層明らかにすることができる(図5, 22). 以下、著者の観察した各部の所見について考按を行う

(1) 蝸牛外リンパ腔内壁面

外リンパの分泌、吸収に関してラセン靱帯は重要なものの一つと考えられている。すなわち、透過電顕で観察されるようにラセン靱帯内には無数の細胞間隙が存在し、その空間は外リンパで満たされている⁴¹⁾ (Spoendlin, 1963). また, Ilberg (1968) も thorium dioxide を用いた実験で^{42), 43)}, Tonndorf ら⁴⁴⁾ (1962) の生体染色による実験でも同様に、鼓室階外リンパに注入された tracer がラセン靱帯に移行している所見を述べている。Lim³²⁾ (1972) も走査電顕を用い外リンパ腔内壁を観察し、著者の観察と同様の、ところどころに細胞に被われていない下部組織が網目状に露出した所見を述べている。この網目状構造物はラセン靱帯と思われる。この所見より、外リンパはこれらの穴を通してラセン靱帯内に入り、周囲に存在する豊富な細動脈周囲腔を経て吸収されるものと推察される。

(2) 蝸牛管内腔外側壁面

この部は内リンパの分泌、吸収の機能を行なう部位と従来から述べられている。今回得られた細胞形態の変化の所見は、Lim²⁶⁾ (1970) の走査電顕による観察と一致した。このような血管条、ラセン隆起における細胞形態の変化からもこの部位の内リンパの分泌、吸収に関して役割に差があることが推察される。

すなわち、血管条とラセン靱帯の関係については、Tonndorf ら⁴⁴⁾は前庭階から蝸牛管へのイオン輸送はライスネル膜を通してではなく、血管条とラセン靱帯を経由して行なわれると述べ、血管条とラセン靱帯の交通を示唆している。一方、Masuda ら (1971) は Inulin を用いた tracer 実験で、これらの交通は発見できなかったと述べている。今回の実験では血管条とラセン靱帯を結ぶ交通路は発見できなかった。

(3) 骨ラセン板および基底板

古くはコルチ器の有毛細胞間は内リンパに囲まれていると想像されていたが、Engström⁴⁶⁾ (1960) がラセン器内腔(コルチトンネル、ヌエル氏腔、有毛細胞間、outer tunnel)を満たす液体を特にコルチリンパと名付けた。そして、この液体は外リンパ、内リンパとは交通のない特殊なリンパ液と推論した。一方、Smith⁴⁷⁾ (1954) は内耳液電解質組成の分析を行ない、外リンパは高 Na^+ 、低 K^+ 、で細胞外液に類似し、内リンパは低 Na^+ 、高 K^+ 、で細胞内液に類似していることを証明し

た。また、電気生理学的に見ると Hodgkin⁴⁸⁾ (1951) は液体の電解質と細胞膜の関係についての能動輸送説を提唱した。これによると、神経興奮時には Na^+ は膜を通して細胞内に入り、 K^+ は逆に神経内から外に移動すると述べている。ゆえに、内リンパのように低 Na^+ 、高 K^+ 、の液体の中では神経の興奮伝導は起こり得ない。この意味からもコルチリンパ内を走行する神経の機能が正常に行なわれるためには、コルチリンパは高 Na^+ 、低 K^+ 、のイオン組成を持つ液体、すなわち外リンパに近い性状を持つ液体でなければならないことになる。そして、Rauch⁴⁹⁾ (1964) はコルチリンパの組成を分析しコルチリンパは外リンパに近いイオン組成を持つが外リンパそのものではなく、 Na^+ 、 K^+ 、のイオン濃度は外リンパに近いが、蛋白量は外リンパより多く含まれていると述べた。しからば、コルチリンパはどこに由来するものであろうか。

Schuknecht⁵⁰⁾ (1963) はネコ蝸牛をアセチルコリンエステラーゼで灌流し、反応が骨ラセン板の特定部分、すなわち habenula perforata より 0.2mm の所にある小孔からラセン器に向かって認められたことから外リンパはこの経路を通してラセン器に進入すると考え Schuknecht channel と名付けた。Sando ら⁵¹⁾ (1971) はモルモットのクモ膜下腔にコロイド状炭素粒子(直径、200~500Å)を注入し、これが鼓室階に出現し骨ラセン板下面の小孔を経て骨ラセン板内の神経線維周囲腔に進入している所見を述べた。しかし、habenula perforata からコルチリンパ内には進入せず、これは炭素粒子が大きいためと述べた。

また、Masuda ら⁴⁵⁾ (1971) は Inulin (分子量5000~5500)を鼓室階外リンパに注入したオートラジオグラフィ実験で、Inulin が鼓室階から骨ラセン板下面の小孔を通り、骨ラセン板内の神経線維周囲腔を経て habenula perforata に集中し、さらにコルチリンパ内に検出できたと述べている。Duvall ら⁵²⁾ (1972) はモルモットのクモ膜下腔に horse radish peroxidase を注入し、鼓室階を経てコルチリンパ内の細胞に取り込まれているのを観察した。また、小坂²²⁾、Lim³²⁾は走査電顕による観察を行ない、骨ラセン板の鼓室階面に大小不同の孔を認め、これが Schuknecht channel であろうと推察した。

著者の樹脂冷凍切断法による骨ラセン板の切断面の観察結果から、骨ラセン板の鼓室階面は軽石状を呈し、小坂、Lim、の観察した大小不同の孔が存在するが、これ

らの孔はそれぞれが直接に骨ラセン板内の神経線維周囲腔と交通しているのではなく、数個の孔が集まって生じた一個の小管腔を經由して神経線維周囲腔と交通していた。この所見から、鼓室階外リンパはこの小孔を介して神経線維周囲腔に進入しており、さらに神経線維に沿って *habenula perforata* を通過しコルチリンパと交通している可能性が考えられる。従って、この組成は外リンパに近いものと推察される。

鼓室階外リンパとコルチリンパを結ぶ他の経路としては基底板が考えられる。Altmann ら³³⁾ (1950) は鉄塩をウサギのクモ膜下腔に注入し、これが鼓室階に出現し基底板を経てコルチ器に入るのを観察した。Tonndorf ら⁴⁴⁾ は種々の生体染色法を用いて、鼓室階に注入した染色液が基底板を透過すると述べた。Ilberg⁴³⁾ (1968)、Ilberg ら (1969) は *thorium dioxide* が鼓室階から基底板を通してコルチリンパに進入するのを観察している。野村⁵³⁾ (1968) も生体染色法を用い鼓室階外リンパに注入した染色液が基底板を経てダイテルス細胞とヘンゼン細胞との間隙を通過するのを観察している。一方、基底板鼓室階面の上皮について、中山¹⁹⁾ (1960) は双極性神経節細胞に似た特異な形態を持ち紡錐形の胞体と、その両極から出る細長い突起の2部分から成り、細胞の長軸は基底板の放射状線維と直交する。そして、この細胞配列は基底回転では密であるが、上方回転に向うにつれて疎となると述べている。小坂²⁷⁾、Lim³²⁾ も走査電顕を用いて同様な所見を観察した。

今回の観察における基底板鼓室階面を被う紡錐形をなした *mesenchymal epithelial cell* に似た細胞の数珠状配列は、各細胞の結合がかなり疎で、ところどころに細胞に被われていない下部のセメント様線維構造が露出しており、一方、コルチトンネル側の基底板にも大小不同の小孔が認められ、基底板は比較的疎な組織構造と考えられる。Tonndorf ら、Ilberg ら、などの実験をも考えあわせ、この部を介してのコルチリンパと外リンパの交通の可能性も推察される。

(4) 蓋膜の形態

蓋膜の形態について Held⁴⁾ (1926) は光学顕微鏡を用いて上層より、1) *covering net* 2) *in-between layer* 3) *fibrous main layer* 4) *under border layer* 5) *homogeneous basal layer* と5層に分類している。走査電顕的観察では、蓋膜は大きく分けて2層よりなっている。すなわち、上層は放射状に走る線維に富んだ *fibrous layer* で厚くて蓋膜の大部分を占め、その上表面は薄い

covering net で被われていた。一方、下層は無構造な顆粒状物質より成る薄い *granular layer* でゼラチン様物質からなっていると想像される。両層の結合は比較的弱く、試料作製中に分離しやすいが、内有毛細胞のすぐ内側 (*border cell* の直上部付近) で両層が比較的固く接着している部位が認められた。Lim²⁴⁾ は蓋膜裏面の *Hensen's stripe* の部位に *trabeculae* 様構造物の配列を認め、これが *border cell* 付近のコルチ器表面 (*inner phalangeal cell* の *phalanx*, または *border cell*) に接着し蓋膜をコルチ器に固定するための装置であろうと推察しているが、著者の観察では内有毛細胞より3個内側の内ラセン溝細胞および内有毛細胞聴毛と *granular layer* が接着している所見を認め、これが蓋膜とコルチ器を結びつける錨の役目を果たしていると考えられるが、Lim の言う *border cell* 付近のコルチ器表面との接着は認められなかった。以上の所見から、内ラセン溝細胞付着部と内有毛細胞聴毛との接着部の間が *Hensen's stripe* として観察されるものと推察する。

蓋膜の外縁部の形態については従来、蓋膜の外縁はダイテルス細胞節板に接着している (小坂²⁷⁾)、ヘンゼン細胞に接着している (Hilding⁵⁶⁾、Kimura¹⁶⁾、Marovitz ら³⁷⁾)、ダイテルス細胞節板およびヘンゼン細胞の境界部に接着している (Lim³¹⁾、Lindeman ら³³⁾)、など諸説があるが、いずれの場合にも蓋膜の外縁部は繊細な線維状突起の存在のため内リンパが蓋膜下腔 (後述) と自由に交通できると述べている。たとえば、Lim³¹⁾ は成熟動物では著明ではないが、幼若動物のネコ、リスザルでは規則的な *finger-like process* を、アカゲザルでは *ladder-like process* を形成しているが、モルモットではあまり発達していないと述べ、Lindeman ら³³⁾ も幼若ネコで蓋膜がダイテルス細胞から剥がされた時に *column-like remnant* が存在するが、成熟ネコでは観察できなかった。一方、Tonndorf ら⁴⁴⁾ は生体染色を用いた実験で、蓋膜の外縁はヘンゼン細胞に固く接着していて染色液が蓋膜の下部のリンパ液中に進入しなかったと述べ、Rauch⁴⁹⁾ (1964) は聴毛の浸っている間隙 (*subtektorial space*) は蓋膜、内ラセン溝細胞、*reticular lamina* により取り囲まれた一つの閉ざされた腔間を形成し、ここには内リンパ、コルチリンパと異なった特殊な液体 (*subtektorial lymph*) が存在するのではないかと推察している。今回の観察においても *fibrous layer* の外縁部は最外側ダイテルス細胞節板付近で終わっているが、*granular layer* は最外側ダイテルス細胞節板とへ

ンゼン細胞の境界部に連続的に接着し、さらにヘンゼン細胞の方に延びてその細胞表面を被っているなど、蓋膜下腔が一つの閉鎖腔であることを示唆する所見が得られた。さらに、この点に関して著者は、現在最も artifact の少ない観察方法の一つと言われる Cryoscan による観察で、はじめヘンゼン細胞を被っていた granular layer が観察中の beam damage など乾燥による artifact で回転してゆく像を認めた。

(5) 蓋膜と聴毛の関係

蓋膜と有毛細胞の形態学的関係は聴覚機構を解明するうえに、きわめて重要かつ興味深い課題である。従来、外有毛細胞聴毛と蓋膜の関係については、1) 全く離れている、2) 単に接触している、3) 接着している、4) 結合している、などの諸説があった。Kimura¹⁶⁾ (1966) は透過電顕による観察で、各外有毛細胞聴毛の最外側列が蓋膜にかなり強く接着しており、その深さはリスザルでは0.1~0.4 μ であったと述べている。小坂ら²⁸⁾、Lim³¹⁾、滝口³⁹⁾ は走査電顕を用いて蓋膜裏面に最外側列聴毛の跡と思われる規則正しいW型の小孔配列を認めている。今回の観察でも、外有毛細胞聴毛はその最外側列の先端が granular layer にはまり込んで接着しており、聴毛先端に granular layer の顆粒状物質が聴毛のかなり下部の方にまで付着している像が認められた。このことは両者の接着はある程度強力で、しかも粘着度を持つものと思われる。

一方、内有毛細胞聴毛と蓋膜の関係について、Iurato¹⁵⁾ (1967) は両者は接着していると述べたが、Kimura¹⁶⁾ (1966) は内有毛細胞聴毛と蓋膜は接着しないと述べ、仮りに接着していたとしても、外有毛細胞聴毛の場合ほど強力でないと述べている。これについては、内有毛細胞は spiral limbus の比較的硬い tympanic lip の直上に位置するが、外有毛細胞は機械的刺激を強く受ける基底板上に位置するから外有毛細胞聴毛は蓋膜に一層強く接着する必要があるのではないかと推察している。Lim³¹⁾、滝口³⁹⁾ も同様に内有毛細胞聴毛と蓋膜の接着は観察できなかった。

今回の観察では、内有毛細胞最外側列聴毛の外側面に蓋膜の granular layer から下方に突出した顆粒状物質が接着している所見が得られた。このことは蓋膜裏面に内有毛細胞聴毛の跡と思われる窪みが認められない今までの所見と一致するものと思われ、また、外有毛細胞聴毛のように蓋膜に入り込んで強く接着していないため artifact により容易に接着が離れ、透過電顕においても

今までその接着が認められなかったものとする。このような蓋膜と内・外有毛細胞聴毛の接着様式の差異が聴覚受容機構に重要な意味を持つものと推察する。

(6) hook 領域の有毛細胞の形態的变化

その位置的關係から従来の surface preparation technique では観察され難かったが、樹脂冷凍割断法により、この領域の有毛細胞の形態を観察することができた。すなわち、外有毛細胞は基礎回転では3列存在していたものが hook 領域においては cecum vestibuli に近づくにつれて外側列よりしだいに消失してゆき、外有毛細胞聴毛はまったく存在しなくなり、一列の内有毛細胞聴毛のみとなる。さらに下方に向うにつれて、この内有毛細胞聴毛さえも消失してゆく形態が明瞭に観察できた。この hook 領域における聴毛の消失してゆく状態は、蝸牛頂部における聴毛の変化を報告した滝口³⁹⁾ の形態と同様であった。また、個々の外有毛細胞聴毛について観察してみると聴毛の作るW型の角度は下方に向うにつれてしだいに鈍角となり hook 領域ではほとんど内有毛細胞聴毛と同様に一直線となり、内・外有毛細胞間に形態的な差異が認められなくなって行った。

結 語

樹脂冷凍割断法を応用して作製した試料によりモルモット蝸牛を走査電顕的に観察して、以下の所見を得た。

- 1) 外リンパ腔内壁面の構造は、鼓室階・前庭階とも大差なく、中胚葉性の細胞に似た細胞に被われていたが、ところどころに細胞が欠如し下部組織の露出した部位が存在した。
- 2) 蝸牛管内腔外側壁では、血管条・ラセン隆起・外ラセン溝で細胞形態が変化していた。
- 3) 骨ラセン板下側面に鼓室階と骨ラセン板内の神経線維周囲腔を結ぶ直径約3 μ の小管腔があり、これを介してコルチリンパと鼓室階外リンパは交通しているものと推察した。
- 4) コルチトンネル部の基底板はコルチトンネル側に小孔の散在を認め、鼓室階側には細胞の疎な部位が存在した。これよりコルチトンネル下面でのコルチリンパと鼓室階外リンパの交通を示唆した。
- 5) 蓋膜の granular layer は内有毛細胞より3個内側の内ラセン溝細胞、内有毛細胞聴毛、外有毛細胞聴毛、ヘンゼン細胞表面と接着していた。外有毛細胞では各細胞の最外側列聴毛の先端が蓋膜の granular layer にはまり込んだ形で接着しているが、内有毛細胞では granular layer から下方に突出した顆粒状物質が最外側列聴

毛の先端外側面に接着しており、内・外有毛細胞聴毛と蓋膜の接着様式は異なっていた。

6) hook領域では各有毛細胞聴毛が cecum vestibuli に近づくにつれて最外側列の有毛細胞より、しだいに消失していた。

付図説明

図1 外リンパ腔外側壁。fibrocyte, mesenchymal epithelial cell に似た細胞で被われている。×300

図2 図1の□部分の拡大。上皮細胞が欠如し網目状のラセン靱帯が露出している。

SL: ラセン靱帯 ×30000

図3 蝸牛管内腔外側壁。×300

図4 図3の□部分の拡大。×1000

- A. 血管条の細胞は大型のほぼ六角形を示している。
- B. ラセン隆起上縁の細胞は長軸が基底板と平行な長い六角形を示している。
- C. ラセン隆起中央の細胞は、血管条より小型のほぼ六角形を示している。

図5 蝸牛第2回転断面。

ST: 鼓室階 SM: 蝸牛管 SV: 前庭階

SG: ラセン神経節 ×100

図6 図5の□部分の拡大。骨ラセン板の下側面に鼓室階と神経線維周囲腔を結ぶ小管腔(P, P')が認められる。ST: 鼓室階 N: 骨ラセン板内の神経線維 ×300

図7 図6のP部の拡大。骨ラセン板鼓室階面の小孔(矢印)の数個が合流して一つの小管腔と(P)なり神経線維周囲腔と交通している。×3000

図8 基底板コルチトンネル側。小孔(矢印)が散在している。N: 神経線維 ×10000

図9 基底板鼓室階側。紡錘形をなした細胞(C)が蝸牛軸と平行に数珠つなぎのように配列し、ところどころに下部の線維構造が露出している(矢印)。×3000

図10 蓋膜の二層構造を示す FL: fibrous layer

GL: granular layer ISC: 内ラセン溝細胞

OHC: 外有毛細胞 IHC: 内有毛細胞 ×1000

図11 図10の拡大。内有毛細胞のすぐ内側でFLとGLが比較的固く接着している(矢印)。×3000

図12 granular layer と聴毛の接着状態および蓋膜外縁部の形態 ×3000

図13 granular layer の顆粒状物質がヘンゼン細胞上まで延び、その細胞表面を被っている(矢印)。×1000

図14 Cryoscan で見た蓋膜の形態。

TM: 蓋膜 ×1000

図15 Cryoscan で観察中に乾燥により蓋膜が翻転しはじめた時の像。×1000

図16 granular layer と外有毛細胞の接着状態。

GL: granular layer OHC: 外有毛細胞

1: 第1列 2: 第2列 3: 第3列 ×5000

図17 図16の拡大。聴毛の最外側列の先端が granular layer にはまり込んだ形で接着している。また、granular layer の顆粒状物質が聴毛のかなり下部まで付着している(矢印)。×20000

図18 図12の拡大。granular layer から下方に突出した顆粒状物質が内有毛細胞聴毛最外側列の先端外側面に接着している(矢印)。GL: granular layer

IHC: 内有毛細胞 ×10000

図19 Hook 領域の有毛細胞(I)。Cecum vestibuli に近づくにつれて最外側外有毛細胞列より配列の不整・消失をきたして2列となる。

IHC: 内有毛細胞 OHC: 外有毛細胞

1: 第1列 2: 第2列 3: 第3列 ×3000

図20 Hook 領域の有毛細胞(II)。第2列の細胞も消失し第1列のみとなる。×3000

図21 Hook 領域の有毛細胞(III)。第1列の細胞も消失し、やがて内有毛細胞も消失する。×3000

図22 樹脂冷凍切断法により切断されたコルチ器。

IHC: 内有毛細胞 OHC: 外有毛細胞

HC: ヘンゼン細胞 CT: コルチトンネル

PC: pillar cell ×1000

文 献

- 1) Corti, A.: Recherches sur l'organe de l'ouïe des mammifères. Z. wiss. Zool., 3; 109-169, 1851.
- 2) Hensen, V.: Zur Morphologie der Schnecke des Menschen und der Säugetiere. Z. wiss. Zool., 13; 481-512, 1863.
- 3) Retzius, G.: Das Gehörorgan der Wirbeltiere. Samson & Wallin, Stockholm. 1881.
- 4) Held, H.: Die Cochlea der Säuger und der Vögel, ihre Entwicklung und ihre Bau. Handbuch der Normalen und Pathologischen Physiologie. (ed. by Bethe, A.) vol. II. 467-526, J. Springer, Berlin. 1926.
- 5) Kolmer, W.: Gehörorgan. Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen. (ed. by Möl-

- lendorff, W.) 250-478, Springer, Berlin, 1927.
- 6) *Pease, D.C. & Baker, R.F.*: Sectioning techniques for electron microscopy using a conventional microtome. *Proc. Soc. exp. Biol.*, N.Y., 67 ; 470-474, 1948.
- 7) *Engström, H. et al.*: Structure of the organ of Corti. I. Outer hair cells. *Acta Otolaryngol.* 43 ; 1-10, 1953.
- 8) *Engström, H. et al.*: Structure of the organ of Corti. II. Supporting structures and their relations to sensory cells and nerve endings. *Acta Otolaryngol.* 43 ; 323-334, 1953.
- 9) *Engström, H. et al.*: Structure and innervation of the sensory hairs of the inner ear. *J. Acoust. Soc. Amer.*; 9 ; 1356-1363, 1962.
- 10) *Engström, H. et al.*: Structural pattern of the organ of Corti. Williams & Wilkins, Co., Baltimore. 1966.
- 11) *Spoendlin, H.*: The organization of the cochlear receptor. *Advances in Oto-Rhino-Laryng.*, vol. 13, (ed. Karger, S.) Basel. 1966.
- 12) *Hilding, D.A. et al.*: Deaf white mink. Electron microscopic study of the inner ear. *Ann. Otol.* 76 ; 647-663, 1967.
- 13) *Iurato, S.*: Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. I. The tectorial membrane. *Z. Zellforsch.* 52 ; 105-128, 1960.
- 14) *Iurato, S.*: Submicroscopic structure of the membranous labyrinth. II. The epithelium of Corti's organ. *Z. Zellforsch.* 53 ; 259-298, 1961.
- 15) *Iurato, S.*: Submicroscopic structure of the inner ear. Pergamon Press Ltd. Oxford. 1967.
- 16) *Kimura, R.S.*: Hairs of the cochlear sensory cells and their attachment to the tectorial membrane. *Acta Otolaryngol.* 61 ; 55-72, 1966.
- 17) *Nakai, Y.*: An electron microscopic study of the human fetus cochlea. *Pract. Oto-Rhino-Laryng.* 32 ; 257-267, 1970.
- 18) 中井義明：蝸牛の微細構造, *Audiology.* 14 ; 543-565, 1971.
- 19) 中山和彦：電子顕微鏡による膜迷路の研究. *日耳鼻*, 63 ; 727-738, 1960.
- 20) 中山和彦：聴毛に関する電子顕微鏡的観察, *Audiology.* 12 ; 425-426, 1969.
- 21) 河本和友ら：蝸牛毛細胞の電子顕微鏡的, 部位的特異性. *耳鼻と臨床*, 16 ; 55-58, 1970.
- 22) 山田英智：蝸牛管の微細構造について. *耳鼻と臨床*, 11 ; 209-224, 1965.
- 23) *Barber, V.C. et al.*: Scanning electron microscopic studies of cilia. *Z. Zellforsch.* 84 ; 269-284, 1968.
- 24) *Lim, D.J. et al.*: Cochlear sensory epithelium. A scanning electron microscopic observation. *Ann. Otol.* 78 ; 827-841, 1969.
- 25) *Lim, D.J. et al.*: Vestibular sensory epithelia. *Arch. Otolaryngol.* 90 ; 283-292, 1969.
- 26) *Lim, D.J. et al.*: Three dimensional observation of the inner ear with the scanning electron microscope. *Acta Otolaryngol. suppl.* 255. 1970.
- 27) 小坂直也：走査電子顕微鏡による蝸牛膜迷路の形態学的研究. *日耳鼻*, 73 ; 1465-1473, 1970.
- 28) *Kosaka, N. et al.*: Observation on the organ of Corti with scanning electron microscope. *Acta Otolaryngol.* 72 ; 377-384, 1971.
- 29) 小坂直也ら：走査電子顕微鏡の世界. 1, 2, 6, 7, 8, 9, *医学のあゆみ*. 73 ; 5, 6, 11, 12, 13, 74 ; 1, 1970.
- 30) 小坂直也ら：走査電子顕微鏡による内耳の観察. *耳鼻と臨床*, 17 ; 134-137, 1971.
- 31) *Lim, D.J.*: Fine morphology of the tectorial membrane. Its relationship to the organ of Corti. *Arch. Otolaryngol.* 96 ; 199-215, 1972.
- 32) *Lim, D.J.*: Surface ultrastructure of the cochlear perilymphatic space. *J. Laryng.* 84 ; 413-428, 1970.
- 33) *Lindeman, H.H. et al.*: The sensory hairs and the tectorial membrane in the development of the cat's organ of Corti. *Acta Otolaryngol.* 72 ; 229-242, 1971.
- 34) *Engström, H.*: Inner ear studies. *Acta Otolaryngol. suppl.* 301. 1972.
- 35) *Engström, H. et al.*: Normal structure of the organ of Corti and the effect of noise induced cochlear damage. In *sensorineural hearing loss. A Ciba Foundation Symposium.* (ed. Walstenholme, G.E.W. and Knight, J.) 127-156, J. & A. Churchill, London,
- 36) *Lim, D.J.*: Acoustic damage of the cochlea. A scanning and transmission electron microscopic

- observation. Arch. Otolaryngol. 94 ; 294-305, 1971.
- 37) *Marovitz, W.F. et al.*: Specialized extracellular structures of the inner ear. Scanning electron microscope. /IITRI/ 313-320, 1971.
- 38) *Tanaka, K.*: Frozed resin cracking method for scanning electron microscopy of biological materials. Die Naturewissenschaften. 59 ; 77, 1972.
- 39) 滝口 峻: 走査電子顕微鏡による Corti 器の形態学的研究. 日耳鼻, 76 ; 578-585, 1973.
- 40) *Marovitz, W.F. et al.*: Evaluation of preparative techniques for the scanning electron microscope. Laryngoscope. 80 ; 1680-1790, 1970.
- 41) *Spoendlin, H.H. et al.*: Histochemical localization of dehydrogenases in the cochlea of living animals. Laryngoscope. 73 ; 1061-1083, 1963.
- 42) *Ilberg, C.V.*: Elektronen Mikroskopische Untersuchung über Diffusion und Resorption von Thoriumdioxyd an der Meerschweinischnecke. Reissnersche Membran. Archiv kli. exper. Ohren-Nasen- und Kehlkopfheilk. 190 ; 426-436, 1968.
- 43) *Ilberg, C.V.*: Elektronen Mikroskopische Untersuchung über Diffusion und Resorption von Thoriumdioxyd an der Meerschweinischnecke. Ligamentum spirale und Stria vascularis. Archiv kli. exper. Ohren-Nasen- und Kehlkopfheilk. 190 ; 415-425, 1968.
- 44) *Tonndorf, J. et al.*: Permeability of intracochlear membranes to various vital stains. Ann. Otol. 71 ; 801-841, 1962.
- 45) *Masuda, Y. et al.*: Perilymphatic communication routes in guinea pig cochlea. Arch. Otolaryngol. 94 ; 240-245, 1971.
- 46) *Engström, H.*: The Cortilymph, the third lymph of the inner ear, Acta Morph. Neerl. Scand. 3 ; 195-204, 1960.
- 47) *Smith, C.A. et al.*: The electrolytes of the labyrinthine fluids. Laryngoscope, 64 ; 141-153, 1954.
- 48) *Hodgkin, A.L.*: The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. Biol. Rev. 26 ; 339-409, 1951.
- 49) *Rauch, S.*: Biochemie des Hörorgans. Georg Thieme. Stuttgart. 1964.
- 50) *Schuknecht, H.F. et al.*: Experimental observations on the fluid physiology of the inner ear. Ann. Otol. 72 ; 687-712, 1963.
- 51) *Sando, I. et al.*: Perilymphatic communication routes in guinea pig cochlea. Ann. Otol. 80 ; 826-834, 1971.
- 52) *Duvall, A.J. et al.*: Cochlear transport of horseradish peroxidase. Ann. Otol. 81 ; 705-713, 1972.
- 53) *Altmann, F. et al.*: New investigations on the physiology of the labyrinthine fluids. Laryngoscope 60 ; 727-739, 1950.
- 54) *Ilberg, C.V. et al.*: Permeability of the inner ear membranes. Acta Otolaryngol. 67 ; 165-170, 1969.
- 55) 野村恭也: コルチリンバ — 外リンパ腔との関係について —, 耳鼻臨, 61 ; 4. 55-58, 1968.
- 56) *Hilding, A.C.*: Studies on the otic labyrinth. II. A theory on the stimulation of the organ of Corti by sound vibrations. Ann. Otol. 61 ; 371-383, 1952.

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師小倉義郎教授に深甚の謝意を表します。

また、御丁寧な御助言、御協力を頂いた、田中徹博士、尾関安英博士、滝口峻博士、鳥取大学医学部第二解剖学教室田中敬一教授、倉レ中央研究所窪津彰氏に深く感謝しますと共に、松原浄先生をはじめ教室員諸兄に心より御礼申し上げます。

なお、本文の要旨は、第20回内耳生化学研究会、第1回日本耳科学会総会にて発表した。

(原稿受付 昭和52.12.12日)

別刷請求先 岡山市鹿田町2-5-1 岡山大学医学部

耳鼻咽喉科学教室 青木 輝行

青木論文付図(1)

図 1

図 2

図 3

図 4

図 5

図 6

青木論文付図(2)

図 7

図 8

図 9

図 10

図 11

図 12

青木論文付図(3)

図 13

図 14

図 15

図 16

図 17

図 18

青木論文付図(4)

図 19

図 20

図 21

図 22