MORPHOLOGY AND METABOLISM OF OTOCONIA OF GUINEA PIG

NOBUHARU TAGASHIRA, M. D.

Department of Otolaryngology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima
(Director: Y. Harada, M. D.)

Morphology and metabolism of the otoconia were studied by scanning electron microscope and x-ray microanalyzer.

The experimental animals (albino guinea pig) were divided into two groups. The first group served as control and the second group were treated with streptomycin sulfate (SM). In control animals, the shape of the otoconial crystal of the utricular macula was cylindrical with two pointed ends. In this group, unusual otoconia were also observed in the deep layer of the otoconial crystalline layer. Furthermore, some decrease in number of otoconia was noted in 40% of this group.

All of SM administrated animals showed marked reduction of otoconia. This indicates that SM disturbs the metabolism of the otoconia. Two months after cessation of SM injection, it was found that the otoconia on the otoconial membrane increased in number, suggesting regeneration of the otoconia.

There were small granules observed on the surface of the otoconial membrane and also on the other side of the otoconial membrane which faces the sensory epithelia. These granules contained certain amount of calcium. These findings suggest that the small granules are a precursor of the otoconia. Numerous granular substances were observed on the surface of the sensory epithelia. It was also found that these granular substances were transformed into the otolithic crystal. There were many protrusions from the surface of the supporting cells surrounding the sensory hair cells. These protrusions and granular substances contained some amount of calcium. Some specimens were also freeze-cracked and observed in the same way.

In the cracked specimens, small granules were found in some cells and these granules also contained some amount of calcium. Therefore, it is suggested that precursors of otoconia may be secreted from the supporting cells.

On the surface of the perimacular dark cells, numerous otoconia were observed. They appeared fragmented and shrunken. Their surface was irregular like a pumice stone. These deformed otoconia contained smaller amount of calcium than the normal.

The author found new mesh-like substances on the surface of the dark cells. These substances were various in shape and had many micropores. It was concluded that the calcium ions are actively absorbed by dark cells and the mesh-like substance is an organic matrix of the otoconia.

A85—1076—24010

モルモット耳石の形態と代謝

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：原田康夫教授）

田 頭 宣 治

Ⅰ 緒 言

内耳に存在する耳石器はいわゆる直線加速度を感受する感覚器であり、回転加速度を感受する半規管とともに身体平衡維持に関与していることはすでによく知られている。しかしながら、この耳石器についての発生、形態などについては、まだ種々の未解決な問題があり、ここ数年来この小器官に対して大きな興味もたれている。耳石について初めて記載したのは Breschet (1836)¹⁾ で、魚の平衡斑に“massive stone”が、また脊椎動物の平衡斑には小さな結晶構造をもつ物質の存在することを確認し、これを“otoconia”あるいは“statoconia”と呼んだ。

この後、耳石の形態、成分についての研究は数多くなされ、透過型電顕、X線回析、あるいは走査型電顕による観察で哺乳動物の耳石が炭酸カルシウムの結晶であることが明らかにされた^{2)~4)}。さらに耳石結晶の形成にあたっては、organic matrix と称される物質がその基本物質となることも判ってきた⁵⁾⁶⁾。一方アミノ配糖体系抗生物質であるストレプトマイシン、カナマイシン（以下 SM, KM と略す）などいわゆる耳毒性物質は聴覚器、および前庭器の感覚細胞に障害を与えることが知られている^{7)~11)}。特に SM は前庭器毛細胞により強い毒性を持っていることが知られている。また最近では平衡斑上の耳石にも障害を及ぼすことが報告されている^{12)~15)}。このように耳石の変性が確認されたにもかかわらず、耳石の生成と代謝については未知の部分が多く、最近の原田の報告¹⁶⁾¹⁷⁾の他には未だ定説がないようである。本研究は平衡斑上の耳石の正常形態と分布様式を詳細に観察するとともに、耳毒性物質を投与した際の耳石の形態変化、ならびに再生過程を観察した。併せて、前庭暗細胞領域、耳石膜裏面、平衡斑感覚上皮表面およびその割断面を走査型電顕、X線マイクロアナライザーで観察、分析し、耳石の生成過程に関して若干の新知見を得たのでここに報告する。

Ⅱ 研究 方 法

実験動物には体重約 300g の成熟モルモットを使用した。control 群として無処置のモルモット 10匹を用いた。一方硫酸ストレプトマイシン (SM) 投与群は 20匹を一群とし、4群（計 80匹）とした。これらの各群の動物は SM 投与期間を 2, 4, 6, 8 週とし、断頭時期を SM 投与終了後 1, 2, 4, 6, 8 週の亜群に分けた。すなわち、一亜群は 4 匹となり、8 側耳から試料を作製した。なお SM は 250mg/kg を、1 週毎に体重補正をしながら隔日に腹腔内へ注射した。試料作製に際して、動物はネンブタール麻酔下に断頭され、直ちに側頭骨々胞を摘出後、骨胞を開放して 2% グルタルアルデヒド (pH 7.4 磷酸緩衝液) 中で 3 時間固定した。この後卵形嚢を磷酸緩衝液内で摘出し、摘出した卵形嚢は 2% タニン酸液で 1 時間、続いて 2% オスミウム酸 (pH 7.4 磷酸緩衝液加) で 1 時間重固定した。その後、試料を上昇エタノール系で脱水、酢酸イソアルミにて置換後、臨界点乾燥 (CO₂) を行い、金スパッタコーティングを行なった。

一方、無処置群の卵形嚢のうち、その一部は卵形嚢斑感覚上皮層表面、およびその割断面の観察に用いた。感覚上皮層表面を露出させるには、磷酸緩衝液内で注射器による噴流を利用して耳石膜、耳石層を剥離した。また割断試料は、摘出した卵形嚢を DMSO 冷凍割断（田中氏法）にて割断作製し、この後の過程は前述の方法に従った。観察には JSM F 15, JSM T-200 走査型電子顕微鏡を使用し、カルシウム元素の分析には JEOL NEWMAX 1500 X-RAY MICROANALYZER を用いた。

Ⅲ 結 果

1) 卵形嚢斑耳石膜上の耳石の形態

卵形嚢における耳石の形態とその分布様式を明らかにするため、卵形嚢斑を図 1 のごとく 10 区画に分けて観察した。

図 1

i) 無処置群

卵形囊斑全体の形態は過去の報告通り、モルモットではいわゆる貝殻状で、その前方は水平面に対して上方へ傾斜し、外側は下っていた（図 2）。耳石の形態とその分布様式は個体によって多少の相異はあるものの、大体同じような傾向を示していた。まず耳石層の最も外側辺縁部（区画①②③の最も端に相当する部）では長径 $1 \sim 3 \mu\text{m}$ の小型の耳石が大部分を占めていた。これらの耳石は他の部でみられるような、両端に三面構造を持たず卵型をしていた（図 3）。辺縁部より内側で striola 部との間の表層には両端に三面構造を有する円柱状の耳石（cylindrical type）が大部分を占めていた。このタイプの耳石は円柱状の体部と、三面を境する稜線が軽い円弧を描く美しい結晶形をしており、その大きさは長径が $4 \sim 5 \mu\text{m}$ と最外側の卵型のものよりやや大型であった（図 4）。このほかにも $1 \mu\text{m}$ 以下の極めて小さい耳石も観察されたが、こういった耳石は全ての区画にみられ、しかも大型耳石に付着しており、集団を成して存在していることはなかった。一方、試料作製時に生じた表層耳石の剝離した部分から下層の耳石が観察された。一般に下層に存在する耳石は表層の耳石とその形態がやや異なっており、円錐状のものや、タル状のものもみられた（図 5, 6）。また、その大きさは表層の耳石に比べて大きく、その長径は $10 \mu\text{m}$ を越えるものが多かった。次に

striola 部に相当する区画（図 1 の④⑤⑥部）ではやや小型で $2 \sim 3 \mu\text{m}$ の長径を有する円柱型や卵型の耳石が混在していることが多かった。また個体によっては長径 $10 \mu\text{m}$ のダンベル状をしたもの、あるいは円柱型で大型のものが比較的多くみられるものもあった。一般にこれらの表層にみられた大型耳石は層状構造をなしており、体部の中央部でくぼんでいるものが多かった。このように striola 部では個体によって差異はあるものの、耳石の形態は一様性がないように思われた（図 7）。また、striola 部では、無処置動物でも耳石層が極端に薄いもの、あるいは殆んど耳石が無く下層の耳石膜が露出しているものもあった（図 8）。この現象は左右の耳石器に对称性にみられ、球形囊斑でも同様に耳石層の薄層化を伴ない、耳石層の全体的な密度は球形囊斑のほうが卵形囊斑よりも少ないという傾向がみられた。このように耳石密度の少ない平衡斑上の耳石は $10 \sim 20 \mu\text{m}$ にも及ぶ大型で、層状構造を有するダンベル型のものが極めて多かった（図 9）。以上のような無処置動物で耳石の減少をみたものは約 40% であった。

striola の内側（区画⑦⑧⑨）では長径 $3 \sim 4 \mu\text{m}$ の円柱状の耳石が主体であったが、これに混ざって型のやや崩れた細長い耳石がみられた。この型の耳石は円柱型の耳石体部が円柱状であるのに対し、不規則な層状構造をなした平偏なもので、耳石結晶の両端に三面構造はみられなかった。これは striola 部で比較的多くみられたダンベル状の耳石と円柱型耳石との中間型に属する結晶型と思われた（図 10）。弯入部付近では最外側辺縁部でみられたような卵型の小型耳石と、円柱型をした小型の耳石が混在していた。一方卵形囊斑を切断することによって今まで観察することが困難であった最下層の耳石を詳細に観察する事が可能となった。この部の耳石結晶は各々の結晶が石垣状に組み合っており、あたかも亀裂が入って割れてゆく過程にあるもののように思われた。しかも、これら最下層の耳石形態は表層に存在する耳石のように一様性がなく、その表面構造も粗であった。また三面構造を境する稜線は、その尾根に相当する部が鈍であり、最深部に存在する耳石は多くの点で表層の耳石とは異なっていた。

以上のように正常モルモットの卵形囊斑での耳石の形態は、表層のものでは、両端に三面構造を有する円柱型の結晶が主体を成しており、その他卵型、ダンベル型、円柱型とダンベル型の中間型といったものが少数みられた。また、耳石層の深部では表層の耳石よりも大型で、

田 頭 論 文 付 図 (1)

田 頭 論 文 付 図 (2)

田 頭 論 文 付 図 (3)

田 頭 論 文 付 図 (4)

田 頭 論 文 付 図 (5)

田 頭 論 文 付 図 (6)

田 頭 論 文 付 図 (7)

その型は円錐型、タル型、その他、種々の形態があり一様性はなかった。さらに耳石結晶が互いに共有面で接し、石垣状に組み合ったものまであり、多くの点で表層耳石とは異なっていた。表層耳石の分布様式については個体差があるものの、おおむね一致した傾向がみられた。

ii) SM 投与群

前述のごとく SM は、1 週間毎に体重補正をしながら隔日に 250mg/kg を腹腔内に注射した。投与期間は 2, 4, 6, 8 週間とし、1, 2, 4, 6, 8 週後に断頭し、無処置群と同様の操作で観察した。

SM 投与群はいずれの投与期間群でも無処置群とは異なった耳石形態と密度を示し、明らかに SM による耳石並びに耳石層の変化と考えられるものを確認した。まず耳石層の耳石の密度に関しては、全ての動物で極端に減少し、その程度は投与量に比例していた。一方、耳石の形態については種々の変化を示した。以下 SM による耳石の障害については、原田および著者らの報告¹³⁾がすでにあるので簡単に記す

a) SM 投与 2 週群: 投与終了後 2 週間目には striola 部を中心に耳石の密度が減少し、耳石膜の小孔が観察し得る程になっていた。耳石結晶は、無処置群においてその大部分を占めていた円柱型耳石が主体を成していたが、層状構造をもち、耳石体部の赤道部に亀裂の入った 10 μ m 以上の長径を有する大型耳石が増加していた。

b) SM 投与 4 週群: 耳石膜上の耳石の減少はさらに高度となり、20~30 μ m もある大型ダンベル状耳石が多数現われ、3~5 μ m の整った結晶型の耳石は極端に減少していた。

c) SM 投与 6 週および 8 週群: 6 週、8 週投与群ではほぼ同様の変化を示したので併せて述べることにする。投与終了後 1~2 週間経過したものでは、striola 部を中心に広範囲に耳石の減少がおこり、耳石膜のほぼ全域が露出しているものもあった。耳石膜上に残存している耳石は、その多くが SM 4 週間投与群でみられたような大型耳石で、種々の部において耳石に亀裂が生じ、さらには崩壊したものもあった。

次に、投与終了後の経時的な耳石並びに耳石層の変化であるが、これは各投与群とも似かよった推移を示したので一括して述べる。投与終了後 4 週目には striola 部の耳石層はまだかなり薄かったが、2 週後のものと比較すると小型耳石が増加していた。しかし、大型耳石は相変わらず多数みられ、耳石体部の変化も 2 週後のものと大差なかった。

6 週経過すると変形した大型耳石は極端に減少し、代って小型耳石の増加が目立ってきた。しかしながら、この小型耳石も無処置群でみられたような円柱型のものは少なく、両端の三面構造がみられず、大きさは 1~2 μ m と小型の不整結晶型であった。

8 週間経過すると総投与量による差異は多少あるものの、無処置群でみられたような 3~5 μ m の長径を有する整った結晶形の耳石が大部分を占め、striola 部に大型耳石が少量みられるにすぎなかった。

以上の結果から、腹腔内投与された SM は耳石に強い影響を及ぼし、その形態に著しい変化を起こさせること、またその数を減少させることが判った。一方、SM により障害を受けた耳石は、8 週間後には正常に近い形態と密度に復すことから耳石は再生し得るものであり、その期間は約 8 週と考えられた。

2) 耳石膜

a) 耳石膜上面: 無処置群動物のうち耳石の減少しているものの耳石膜表面の観察を行なった。これらの動物では striola 部には耳石が欠損し、耳石膜の小孔が露出していた。この耳石膜表面には直径 5~10 μ m の球状物質が存在し、このうちあるものは耳石膜上に遊離し、またあるものは耳石膜の小孔に埋もれた状態にあった。この部で正常形態をした耳石、球状物質、耳石膜を、各々 X 線マイクロアナライザーによって Ca 含有量を測定し比較を行なった。今回使用した分析器は元素の定量を行なうことが不可能なため、測定条件を一定とし、相対的な Ca 量の比較を行なった。これによると、球状物質には正常形態をした耳石の約半量の Ca が検出され、一方、耳石膜には殆んど検出されないという結果を得た(図 11~13)。また、この球状物質の表面構造は粗で、スポンジ状、軽石状を呈していた。さらに極めて小型の球状物質が、結晶型となっている耳石表面に付着しているものも観察された。

b) 耳石膜下面(感覚上皮層面): 耳石膜下面を観察するためには両面テープの小片を用いて耳石膜を感覚上皮より剥離した。この面には耳石膜上面と同様に、2~5 μ m の径を有する小孔が無数にあり、蜂巣状を呈していた(図 14)。また、この面には直径 1.5~5 μ m の球状物質が多数付着しており、その形態は耳石膜上面で観察されたものと極めて類似しており、表面は軽石状ないしはスポンジ状であった。これらの球状物は耳石膜の小孔内にも存在し、この小孔内のもののうち少数のものは直方体、あるいは耳石結晶に近いものまで種々の形態が

観察された(図 15, 16)。なかでも耳石結晶に近い形態をしたものは、その表面構造が耳石層の最下層にみられた耳石の構造と類似していることが判った。また、これらの球状物質にも Ca が含有されていた。

3) 感覚上皮表面

磷酸緩衝液の噴射により耳石膜の大部分は全層にわたって脱落したが、部分的には種々の厚さで残存していた。このため感覚上皮上で種々の耳石形態が観察できた。感覚上皮表面の露出している部では、過去の報告にみられるように cilia を有する毛細胞と、この毛細胞を取り囲んで配列する支持細胞とが観察された。一方、これらの細胞の表面には顆粒状または球状物質が多数認められ、これらの物質にも Ca が含有されていた(図 17)。この顆粒状物質の大きさは直径 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ で、その多くは球状であったが顆粒が癒合して大きなものもあった。また、その表面は細網状あるいはスポンジ様であった。毛細胞を取り囲んでいる支持細胞には、その表面が隆起しているもの、あるいは突出しているものが多数観察された。この突出した部の表面構造は、細胞表面より遊離した球状物質の表面と類似しており、この突出部が細胞より遊離し球状になるものと考えられた(図 18)。今回の観察で特に興味あることは、感覚上皮表面にある球状物質から耳石の形成が行なわれていることを示す所見を認めたことである。すなわち、比較的大きな球状物質の表面から明らかに耳石結晶とわかる構造物が突出していた(図 19)。この結晶は大部分の正常耳石でみられる三面構造を有し、また、その発生母体と思われる球状物質と連続性をもっていた。また一方では球状物質全体が耳石の結晶形へと変化しつつあると考えられるものもあった。これはその表面構造が未だ細網状を呈してはいるものの、全体的な形態は両端が三面構造に近い長橢円体をしており、成熟耳石(あえてこういう名称を使うこととした)に育つ前段階の未熟耳石と考えられた(図 20)。

以上の結果から感覚上皮表面に存在する球状物質が耳石の前駆物質であることが明らかになった。その由来については前述のごとく、支持細胞表面に突出物のあること、また支持細胞表面に一致して Ca の集積があるという原田の報告から、感覚上皮層の割断面の観察が必要と考えた。

4) 感覚上皮層割断面

研究方法の項で述べたごとく、摘出した卵形嚢を DMSO 冷凍割断法(田中氏法)に従って試料を作製した。

過去の報告にみられるように、感覚上皮層の割断面にはフラスコ型のⅠ型細胞と、長橢円型のⅡ型感覚細胞を確認することができた。一方今回の観察では、これらの感覚細胞とは別に細胞内に多くの小顆粒を入れている新たな所見が得られた(図 21)。この小顆粒は直径 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ の球状で、表面構造は細網状を呈し、感覚上皮表面でみられた球状物質と同物質であると考えられた(図 22)。小顆粒物質について Ca 含有量の分析を行なったところ、結晶型耳石の約半量に相当する Ca が検出された。他方、顆粒を細胞内に含んでいない隣接した感覚細胞についても同様の分析を行なってみたが、これには殆んど Ca が含有されていないことが判った(図 23)。さらにこの顆粒状物質が細胞外、すなわち感覚上皮上に分泌されつつある状態を観察することができ、アポクリン分泌の様式と考えられた(図 24)。

以上の結果より、平衡斑感覚上皮層の支持細胞は Ca を含有する耳石の前駆物質を分泌し、顆粒状となった耳石前駆物質が結晶型耳石へと変化するものと考えられた。

原田¹⁶⁾¹⁷⁾はネコの耳石膜を用いて、耳石生成部位が平衡斑感覚上皮にあることを示唆する報告をしているが、今回の成績はこれを裏づける結果であった。

5) 卵形嚢暗細胞部

卵形嚢平衡斑周囲にはオスミウム酸で濃染する暗細胞が多数存在し、暗細胞領域と呼ばれている。また、この細胞には電解質の輸送に関与する酵素の存在、あるいはイオン交換能のあることを示唆する報告がある。この領域を詳細に観察すると、正常モルモットにおいても耳石が暗細胞表面に付着していることがわかった。これらの耳石は耳石膜上でみられる耳石と形態的に同じものから、非常に異なったものから構成されていた。大部分の耳石は、正常形態の耳石に比べて耳石体部と三面構造との境をなす稜線が不鮮明であり、三面構造もその形が崩れていた。また、これらの耳石はその表面の形態が特徴的で、軽石を思わせるような小孔が多数あいていた。耳石全体の形態として前述のごとく、正常形態に近いものから、やや形の崩れたもの、さらには耳石の外殻部が溶けて潰れたようなものまで種々の形態をしていた(図 25, 26)。これらの耳石の Ca 含有の程度を分析したところ、崩壊の強いもの程その含有量は少なく、潰れたようなものでは殆んど Ca を検出し得なかった。また暗細胞表面には、これらの崩壊耳石に混ざって小孔をもった網状構造の新たな物質が付着していることがわかった。

この物質は崩壊の激しい耳石とその一部が連続しているものや、遊離して単独に存在しているものがあつた（図27）。この物質にはCaが検出されず、耳石結晶からCaが完全に吸収された後の organic matrix が残ったものと考えた。これらの変形耳石、崩壊耳石あるいは網状構造の物質は、平衡斑耳石膜上でみられることはなく、耳石膜上の耳石は暗細胞上に落下するとその表面に吸着され、脱カルシウムされると考えた。また残った organic matrix もいずれは吸収され、暗細胞上より消失するものと思われた。一方、SMを投与された動物では、暗細胞上に付着している耳石すなわち平衡斑上から落ちた耳石が正常動物のそれより多い事が判った。この事については原田ら¹⁴⁾もすでに報告しており、そのメカニズムに関しては明らかではないが、SMは耳石の耳石膜への結合を弱める作用のあることが示唆された。

Ⅳ 考 察

最近の透過型電顕（TEM）、走査型電顕（SEM）による研究によって耳石は形態、微細構造、さらにはその内部構造までが明らかにされてきた。脊椎動物の平衡斑は感覚上皮層と耳石膜より成り、耳石膜はさらに耳石層とゼラチン層より成るという説⁵⁾¹⁸⁾¹⁹⁾、あるいは電子密度の相異から Marginal Zone と Medial Zone²⁰⁾、また cupular zone 1, 2 といった層より成っているとの報告があり²¹⁾、耳石は耳石膜を構成する一部としてあつかわれている。しかしながら、今回の研究からは耳石膜と耳石層とを2層に分けるべきで、耳石膜は多孔性の膜様物質より成ると考えた方がよい様に思われた。事実、固定された耳石膜は明らかに多孔性構造をもち、この小孔の中に耳石の前駆物質あるいは未熟耳石を入れており、これらの通過を許している。

耳石の形態に関して報告は数多くなされており、ヒトをはじめとして哺乳動物では基本的にはほぼ同様の形をしている。SEMによる観察では耳石結晶はその多くが両端に三面構造を有する円柱体で、その他にダンベル型、十字型、卵形、小結晶が癒合したようなものなど種々の形のものが観察できる。しかし、一般に成熟した動物では最初に述べた円柱体で両端に三面構造をもつ型が主体のようである^{5)6)22)~26)}。また耳石の大きさは多くの報告で0.1~20 μ mといわれており⁵⁾⁶⁾¹⁴⁾¹⁸⁾、今回の観察でもこれと一致していたが、成熟モルモットでは3~4 μ mの長径をもつ円柱型耳石が多かった。平衡斑全体の耳石の形態とその分布様式についてはRoss⁵⁾やLim⁹⁾が

すでに詳細な報告をしている。これらの報告によると、一般に striola 部と弯入部付近では他の部に比べて耳石が小型であり、耳石層の深部では大型耳石が目立つとしている。しかし今回の著者による観察では、表層の耳石に関して striola 部では他の部に比べて小型であるものの、個体によっては大型のものもみられ、Limの報告とは必ずしも一致しない結果が得られた。一方、耳石層深部の耳石については確かに大型のものが多く認められたが、これらの耳石の形態は表層のものと比べると不揃いで変形したものが多く、その表面も粗であった。これら耳石層最深部に存在する耳石については、後に耳石の生成に関する部で再び詳細に述べる。

耳石結晶について Carlström²⁾ はX線回析を用いて、これが炭酸カルシウムの結晶であることを示し、その後の追試にても同様の結果が報告されている³⁾²⁵⁾ また、Ross⁶⁾ は炭酸カルシウム以外に微量のマンガン、硫黄、燐などを検出している。

耳石の生成については過去には幾つかの説があるものの明確な根拠はないようである。Vilstrup²⁷⁾ はサメの耳石について endogenous な耳石と exogenous なものがあり、前者は迷路あるいは内リンパ嚢で耳石が形成され、後者では砂粒を体内に取り込むというものである。

また Balsamo ら²⁸⁾ も鶏胚を用いて内リンパ嚢が耳石生成の部であることを示唆する報告をしている。一方、最近では TEM による観察で耳石の内部構造が明らかにされつつある。これによると、耳石の中心部と辺縁部では電子密度が異なっており⁴⁾²⁰⁾²¹⁾、これを central core あるいは耳石の nucleus と呼び、ムコ多糖体⁵⁾、糖蛋白²⁹⁾ から成っているとされている。そして、耳石はこの中心核にCaが沈着することによって形成されると考えられていた。以上の事実が明らかにされ、Lim⁹⁾、Ross⁶⁾等はこの中心物質こそが耳石形成の際の基本物質と考え、これを organic matrix と呼んでいる。一方、Salamat²⁹⁾ は胎児ラットの耳石を TEM で観察し、この中心核となっているものはそもそも初期の耳石の原型であり、すでに炭酸カルシウムとしての結晶形を成し、この周囲にさらにカルシウムの沈着が生じて成熟型耳石に成長すると報告している。以上のように耳石の中心核をなす物質が耳石の形成に関与していることが明らかになってはいるものの、この物質の起源については未知のままである。最近、原田は平衡斑感覚上皮上に球状物質の存在することを確認し、この物質が耳石の原型となるものではないかとの報告をしている¹⁶⁾¹⁷⁾ 今回の観察に

においても、卵形囊斑耳石膜の表面、耳石膜の小孔内、また感覚上皮表面に同じ形態の物質を認めることができた。さらにこの球状物質の一部から耳石結晶が形成されつつある状態、また球状物質の一部のみでなく全体が耳石結晶へと変化しつつある所見を得た訳であり、今までいわれているような、核を中心としてこれに炭酸カルシウムが沈着することによって耳石結晶が形成されるという説とは異なった結果を得た。これらの球状物質は結晶型耳石の約半量のCaを含有し、結晶型耳石へ変化しつつあるものではさらに多量のCaを含有しているという事実から、球状物質が原田⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾の報告のごとく、耳石の原型であることは間違いないと考えた。今回著者はこの球状物質を耳石前駆物質と呼ぶこととするが、この物質の起源についても、原田は平衡斑感覚上皮表面のCa元素分析の結果より、支持細胞からの分泌の可能性を示唆している⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾。従って、今回の観察で明らかになったところの感覚上皮層支持細胞内の顆粒の存在は非常に興味深いものである。さらに、これらの小顆粒は成熟型耳石の約半量のCaを含有しており、顆粒状物質が細胞外へ放出されつつある状態もとらえることができた。このような事実から、平衡斑感覚上皮表面、あるいは耳石膜小孔およびその表面でみられた球状の物質は耳石前駆物質であり、この前駆物質は支持細胞で造られると結論した。この耳石前駆物質の耳石結晶への変化についてはまだ未知な部もあるが、過去の報告にあるように、中心核の周囲にカルシウムイオンが沈着し、結晶型へと育つとするのはやや不合理な感がする。すなわち、耳石が平衡斑上のみ整然と存在している事実の説明に難があると思われるし、耳石結晶の形態、大きさにしても一様性の傾向があることを説明しにくい。反対に今回の観察で明らかにされた事実、これらの点についての説明が納得のいくものと考えられる。すなわち、耳石前駆物質は平衡斑感覚上皮層より分泌されるのであるから、耳石は平衡斑上のみ整然と存在するのであり、大きさの一様性については、分泌される耳石前駆物質の大きさがほぼ決まっているからである。大型の耳石については、これらの耳石前駆物質が癒合した状態で結晶化したものと考えられ、1ヶの前駆物質が結晶化したり、1ヶの前駆物質から複数の耳石結晶が生じた際には比較的小型の耳石となることが考えられる。

耳中毒性物質による平衡斑の障害については退去にかなりの報告がなされている。Berg⁽⁷⁾はストレプトマイシン(SM)投与により感覚上皮の障害と、耳石膜(こ

の場合はゼラチン層と耳石層を含んだものをさしている)の欠損が生じると述べ、Spoendlin⁽⁸⁾はその障害がI型感細胞に強いとしている。一方、Lindeman⁽⁹⁾はSM、KM(カナマイシン)の毒性について、前庭およびコルチ器の障害の受傷性の差異を報告しているが、耳石膜には変化がないと述べている。Johnsson⁽³⁰⁾⁽³¹⁾、綿貫⁽¹²⁾、原田ら^{(13)~(15)}はネオマイシンやSMなどにより、耳石の減小と異常耳石の出現することを報告しているが、耳石各個の変化について触れているものは少ない。綿貫⁽¹²⁾はSMによる耳石の減少原因について、(1)耳石のCa代謝の障害、(2)平衡斑感覚上皮の感覚毛が消失することによって耳石膜の支持が失われ、ひいては耳石の障害を起す、という二つの仮説を立てている。著者らの研究結果からは、SMは確かに耳石の減少を引き起すが、投与終了後8週目にはほぼ元に復するという事実からして⁽¹⁵⁾⁽³²⁾、SMは耳石のCa代謝に何らかの異常を引き起すものと考えたい。すなわち、Caを含有する耳石前駆物質を産生する平衡斑支持細胞がSMによって一時的に障害され、この結果耳石密度の減少を来すものと考えられることができる。

一方、正常動物でも耳石の減少、欠損は有り得る。ヒトの場合、加齢による耳石の減少と耳石結晶の崩壊が報告されている⁽⁶⁾⁽³³⁾⁽³⁴⁾。また、Wright⁽³⁵⁾は6週のヒト胎児で耳石の全欠損例を報告している。さらに炭酸脱水素酵素抑制剤の投与⁽³⁶⁾、またマンガンや亜鉛の欠乏によって耳石欠損が起こることが動物実験で確かめられており、これら2つの元素が耳石形成に際して重要なものであるとも言われている^{(37)~(39)}。

Johnsson⁽⁴⁰⁾は無処置のモルモットにも約20%に耳石の減少、あるいは欠損したものがあり、耳中毒性物質による耳石減少について見直しの必要性を報告している。著者らも約40%の率で耳石の減少のあることを報告しているが⁽⁴¹⁾ SM投与群では全例に耳石の減少や欠損と形態の異常を示しており、SMが耳石の障害を引き起すことは間違いない事実と考える。

耳石の成分であるCaが代謝していることは過去の報告で明らかにされている。⁴⁵Caを用いた研究^{(42)~(44)}、あるいはラベルしたテトラサイクリン⁽²⁸⁾で耳石のCaはその表面で常に吸収と再沈着があるものとされ、Lim⁽⁹⁾はこの際、耳石の結晶形態に変化は生じないと述べている。しかしながら耳石膜上に存在する全ての耳石表面でCaの吸収と再沈着とがバランスよく行われ、耳石結晶構造を損なわないとするのは非常に特異的な機構の感が

するし、耳石の新生という事実がどうなるのかが問題となろう。一方、Preston⁴¹⁾、Mechigian⁴⁵⁾ は耳中毒性物質の投与により耳石器での Ca の取り込みが減少すると述べているが、これは SM による耳石の減少あるいは欠損を支持する結果と考えられる。さらに、Ca の取り込みの減少という事実は、本研究で明らかにされたところの平衡斑支持細胞による耳石前駆物質の生産能力の低下につながるものと考えられる。

いずれにしても耳石の Ca は代謝しており、この結果耳石が新生と崩壊をくり返しているのは事実である。このうち新生については前述のごとく平衡斑感覚上皮の支持細胞によって耳石前駆物質が生産されている訳であるが、耳石の吸収に関して明確な意見はなかった。Lim⁶⁾⁴⁶⁾ は、耳石を脱灰することによりゼラチン状の物質が残ることを SEM で確認し、この物質が耳石の organic matrix に相当するものであるとしている。また彼は TEM による観察でも前庭暗細胞上に干しブドウ様の物質を認め、この部の暗細胞に Ca 吸収能の可能性を示唆した。一方、前庭暗細胞にはイオン交換能の存在も報告されている。Nakai⁴⁷⁾ は Na-K の輸送に関する酵素である ATase の存在を示し、Smith⁴⁸⁾、Kimura⁴⁹⁾ は前庭暗細胞と血管条、腎尿細管の細胞の形態的類似より、前庭暗細胞にイオン交換能の存在を推察している。これらの報告から前庭暗細胞に Ca イオンの吸収能の存在が十分にうかがえるのであるが、耳石の Ca が吸収されることを明らかに示し報告は無い。今回の一連の観察によって、今まで TEM ではとらえられなかった耳石の吸収過程を種々の相で確認し得た。すなわち、前庭暗細胞の表面には正常形態の耳石とともに、その表面が怪石状となった耳石、さらに外殻を保つべきカルシウムが吸収されて潰れたような耳石、そして最後の段階として網状構造の物質が暗細胞表面に残っているのを確認した。この網状構造物質について Ca 元素分析を行なってみたところ Ca は含有されておらず、この物質こそが、耳石の Ca 成分が全て吸収された後に遺された organic matrix と考えられた。この organic matrix もいずれは吸収されて、暗細胞表面から消えてゆくようであり、前庭暗細胞には耳石の脱カルシウム作用と、pinocytotic な機能が存在することを今回の研究で確認し得た。

V 結 語

無処置およびストレプトマイシン投与のモルモットを用いて卵形囊斑の耳石形態、耳石膜、平衡斑感覚上皮、

および暗細胞領域を走査型電子顕微鏡で観察し、併せて X 線マイクロアナライザーによるカルシウム元素分析を行い次のような結論を得た。

1. 無処置動物において、耳石層表層の耳石形態は過去の報告とほぼ一致していたが、耳石層深層に存在する耳石は大型であるのみならず、その形態は表層の耳石と比べて極めて異なっていた。これら深層にある耳石は結晶型の未熟な耳石と考えられた。

2. 無処置動物の約 40% に耳石の減少しているものがあった。この減少は左右の卵形囊および球形囊でみられたが、減少の程度は球形囊のほうが強い傾向にあった。

3. ストレプトマイシン (SM) の投与を行うと、全例の動物において耳石層の密度が減少していた。残存している耳石は大型で層状構造を有する結晶形態のものが増加していた。

4. SM による耳石の減少と形態の異常は投与終了後約 8 週間で回復することが判った。

5. SM 投与により耳石と耳石膜の接着性が悪くなり、この結果、多くの耳石が耳石層より平衡斑周囲に脱落していることが明らかとなった。

6. 耳石膜表面、耳石膜の小孔内、また耳石膜感覚上皮面に球状物質の存在することが確認できた。これらの物質には結晶形耳石の約半量に相当するカルシウムが含有されていた。また、その一部が耳石結晶へ変化しつつあるものを発見した。

7. 平衡斑感覚上皮表面でも球状物質が存在しており、この物質の一部から耳石結晶が形成されつつある状態、また球状物質全体が耳石結晶へと変化しつつあるものを発見した。このような事実から、球状物質は耳石の前駆物質と考えた。

8. 平衡斑感覚上皮層を構成する支持細胞表面に Ca を含有する球状物質の分泌を思わせる所見を得た。

9. 平衡斑感覚上皮を構成する細胞内に小顆粒が多数含まれているもののあることを発見した。小顆粒にはカルシウムが含有されており、この物質が分泌されて耳石前駆物質となり、さらに耳石結晶となるものとの確証を得た。

10. 平衡斑周囲の暗細胞領域には耳石が付着しているが、この部にある耳石は種々の崩壊過程にあった。このことから耳石は暗細胞表面で脱カルシウムされ、最後に organic matrix のみとなるが、これも最終的には吸収されるものと結論した。

参 考 文 献

- 1) 26) より引用
- 2) Carlström D, Engström H and Hjorth S: Electron microscopic and X-ray diffraction of statoconia. *Laryngoscope* 63: 1052-1057, 1953.
- 8) Carlström D and Engström H: The ultrastructure of statoconia. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 45: 14-18, 1955.
- 4) Sanchez-fernández JM, Marco J, Rivera-Pomar JM and Delgado RM: Electron diffraction studies on otolith organization in the macula utriculi of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 73: 267-269, 1972.
- 5) Lim DJ: Formation and fate of the otoconia. *Ann Otol* 82: 23-35, 1973.
- 6) Ross MD, Johnsson LG, Peacor D and Allard LF: Observations on normal and degenerating human otoconia. *Ann Otol* 85: 310-326, 1976.
- 7) Berg K: The toxic effect of Streptomycin on the vestibular and cochlear apparatus. *Acta Otolaryngol* (Stockh) Supple: 97, 1951.
- 8) Spoendlin HH: Zur ototoxizität des Streptomizins. *Pract Otolaryngol* (Basel) 28: 35, 1966.
- 9) Lindeman HH: Regional differences in sensitivity of the vestibular sensory epithelia to ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 67: 177-189, 1969.
- 10) 原田康夫: 耳中毒性薬物の前庭器に及ぼす影響 耳鼻 23: 604-608, 1977.
- 11) Harada Y: Morphological changes in the vestibular sensory organs after streptomycin intoxication. *Scanning Electron Microscope*, II. 1077-1082, 1978.
- 12) 綿貫幸三, 河本和友, 片桐圭一: 前庭耳石器官のストレプトマイシン中毒における耳石および耳石膜の変化 日耳鼻 75: 539-545, 1972.
- 13) 原田康夫, 杉本嘉朗, 田頭宣治: ストレプトマイシン中毒による耳石の形態的变化 耳鼻臨床 70: 12, 1943-1949, 1977.
- 14) Harada Y and Sugimoto Y: Metabolic disorder of otoconia after streptomycin intoxication. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 84: 65-71, 1977.
- 15) 原田康夫, 杉本嘉朗, 田頭宣治: 耳中毒性薬物による耳石代謝障害の研究 内耳生化学 7: 60-62, 1976.
- 16) 原田康夫: 耳石の生成部位について. *Equilibrium Research* 37: 217-220, 1976.
- 17) Harada Y: Formation area of the statoconia. *Scanning Electron Microscopy* III, 963-966, 1979.
- 18) Dohlman GF: The attachment of the cupulae, otolith and tectorial membranes to the sensory cell areas. *Acta Otolaryngol* 71: 89-105, 1971.
- 19) Lim DJ: Ultrastructure of the otolithic membrane and the cupula: Scanning electron microscopic observation. *Adv Oto-Rhino-Laryng* (Kargen) (In press)
- 20) Marco J, Sánchez-Fernández JM and Rivera-Pomar JM: Ultrastructure of the otoliths and otolithic membrane of the macula utriculi of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 71: 1-8, 1971.
- 21) Igarashi M and Kanda T: Fine structure of the otolithic membrane in the squirrel monkey. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 68: 43-52, 1969.
- 22) Lindeman HH: Studies on the morphology of the sensory regions of the vestibular apparatus. *Adv Anat Embry Cell Biol* 42: 1-113, 1969.
- 23) Lim DJ and Lane WC: Vestibular sensory epithelia. *Arch Otolaryngol* 90: 283-292, 1969.
- 24) Lim DJ: Three dimensional observation of the inner ear with the scanning electron microscope. *Acta Otolaryngol* (Stockh) Supple 255: 38, 1969.
- 25) Kellerhalls B, Marti E and Villiger W: Surface view of the guinea pig otolithic membrane. *Pract Oto-Rhino-Laryng* 32: 65-73, 1970.
- 26) Ross MD and Peacor D: The nature and crystal growth of otoconia in the rat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 84: 22-37, 1975.
- 27) Vilstrup T: On the formation of the otoliths. *Ann Otol* 60: 974-981, 1951.
- 28) Balsamo G, DeVincentiis M and Marmo F: The effect of tetracycline on the processes of calcification of the otoliths in the developing chick embryo. *J Embryol Exp Morph* 22: 327-332, 1969.
- 29) Salamat MS, Ross MD and Peacor DR: Otoconial formation in the fetal rat. *Ann Otol* 89: 229-238 • 1980.

- 30) Johnsson LG and Hawkins JE Jr: Strial atrophy in clinical and experimental deafness. *Laryngoscope* 82: 1105-1125, 1972.
- 31) Johnsson LG et al: Streptomycin-induced defect of the otoconial membrane. *Acta Otolaryng* 89: 401-406, 1971.
- 32) 田頭宣治, 原田康夫: ストレプトマイシン中毒による耳石の形態的变化 再生過程における形態 内耳生化学 10: 50-52, 1979.
- 33) Johnsson LG: Degenerative changes and anomalies of the vestibular system in man. *Laryngoscope* 81: 1682-1694, 1971.
- 34) Johnsson LG and Hawkins JE Jr: Sensory and neural degeneration with aging, as seen in microdissection of human inner ear. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 81: 179-193, 1972.
- 35) Wright CG, Hubbert DG and Graham JW: Absence of otoconia in human infant. *Ann Otol* 88: 779-783, 1979.
- 36) DeVincentiis M and Marmo F: Inhibition of the morphogenesis of the otoliths in the chick embryo in the presence of carbonic anhydrase inhibitors. *Experimentia* 24: 818-820, 1968.
- 37) Erway LC, Hurley LS and Fraser AS: Congenital ataxia and otolith defects due to manganese deficiency in mice. *J Nutr* 100, 643-654, 1970.
- 38) Erway LG, Fraser AS and Hurley LS: Prevention of congenital otolith defect in pallid mutant mice by manganese supplementation. *Genetics* 67: 97-108, 1971.
- 39) Lim DJ and Erway LC: Influence of manganese on genetically defective otolith. *Ann Otol* 83: 565-581, 1974.
- 40) Johnsson LG, Wright CG, Preston RE and Henry PJ: Defects of the otoconial membranes in normal guinea pigs. *Acta Otolaryngol.* 89: 93-104, 1980.
- 41) Harada Y and Tagashira N: Metabolism of otoconia. *Biomedical Research* 2, Supple. 415-420, 1981.
- 42) Belanger LF: Observations on the development, structure and composition of the Cochlea of the rat. *Ann Otol.* 65: 1060-1073, 1956.
- 43) 佐々木 寛: 耳石器官の基礎と臨床 日耳鼻 73: 1975-1983, 1970.
- 44) Preston RE, Johnsson LG, Hill JH and Schacht J: Incorporation of radioactive calcium into otolithic membranes and middle ear ossicles of the gerbil. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 80: 269-275, 1975.
- 45) Mechigian I, Preston RE, Johnsson LG and Schacht J: Incorporation of radioactive calcium into otolithic membranes of the guinea pig after aminoglycoside treatment. *Acta Otolaryng* (Stockh) 88: 56-60, 1979.
- 46) Lim DJ: Vestibular sensory organs. *Arch Otolaryng* 94: 69-76, 1971.
- 47) Nakai Y and Hilding D: Vestibular endolymph-producing epithelium. *Acta Otolaryng* 66: 120-128, 1968.
- 48) Smith CA: Microscopic structure of the utricle. *Ann Otol.* 65: 450-469, 1956.
- 49) Kimura RS: Distribution, structure and function of dark cells in the vestibular labyrinth. *Ann Otol.* 78: 542-561, 1969.
-
- 稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を戴いた恩師原田康夫教授に深く感謝致します
- なお本研究の一部は昭和56年度文部省科学研究補助金(課題番号 00444062)を受けて行われた。
- 本論文の要旨は第26回日本内耳生化学研究会, 第81回日本耳鼻咽喉科学会総会, International Symposium on SEM in Cell Biology and Medicine において発表した。
-
- (原稿受付 昭和 57. 5. 4日)
- 別刷請求先 〒734 広島市南区霞 1-2-3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 田頭 宣治

付 図 説 明

- 図 2: 無処置モルモット卵形囊耳石斑. striola 部は耳石層がやや薄く波状を呈している (→).
- 図 3: 外側辺縁部の耳石は長径が $1 \sim 3 \mu\text{m}$ の小型の卵型のもので占められている.
- 図 4: striola 部と外側辺縁部との中間部. 定型的な結晶で, 両端に 3 面構造を有する耳石が目立つ. また $1 \mu\text{m}$ 以下の極小耳石もみられる.
- 図 5: 耳石層深部にみられる耳石は 3 面構造を有するものの, 表層耳石のものとは異なっている. また, 耳石体部も円柱状でないものが多い. 耳石結晶が円錐状のものもある (→). 耳石体部に球状物質が付着しているものもある (⇒).
- 図 6: 耳石層深部に存在する耳石の表面は細網状を呈しており粗である. このような構造は表層でみられる耳石結晶の前段階であり未熟耳石である.
- 図 7: striola 部での表層耳石. 定型的な耳石結晶がその多くを占めているが, 層状構造をもつダンベル型の大型耳石が目立つ.
- 図 8: 無処置モルモット striola 部を中心に耳石の減少がみられる. このため耳石膜表面の網状構造が露出している.
- 図 9: 図 8 の striola 部の拡大. 耳石膜の小孔と層状構造を有する大型のダンベル型の耳石が多くみられる.
- 図 10: 無処置モルモットの striola 内側部. 定型的な耳石が大部分を占めるが, 不規則な形をした大型耳石が混ざっている (→).
- 図 11: 耳石膜上にある結晶型耳石の Ca 元素分析 (分析部位は縦横の白線の交点). 右のグラフは高いピークが Ca を示す.
- 図 12: 耳石膜のみを分析すると少量の Ca (結晶型耳石の約 $1/8$) が検出された. これは耳石膜の下層にある耳石前駆物質の Ca を検出している可能性がある.
- 図 13: 耳石膜上にみられる球状物質の Ca 元素分析. この物質に含有されている Ca は結晶型耳石の約半量である.
- 図 14: 耳石膜感覚上皮面. 直径 $2 \sim 5 \mu\text{m}$ の小孔が蜂巢状構造を作っており, これらの小孔内に球状物質がみられる.
- 図 15: 小孔内には耳石結晶に近い形態をしたものもあり, その表面は球状のものよりも緻密である (→).

- 図 16: 小孔内にある球状物質の拡大. 表面はスポンジ状を呈している.
- 図 17: 平衡斑感覚上皮表面にみられた球状物質. Ca 元素分析を行うと少量ではあるが検出されている.
- 図 18: cilia を有する感覚細胞の周囲に突出物が多数みられる. あるものは球状 (→), または結晶化しつつあるものもみられる (⇒).
- 図 19: 卵形囊斑感覚上皮上にみられた多くの顆粒状物質. その一部より耳石結晶が生まれている (→). 結晶形は耳石層表面のものとは異なっている.
- 図 20: 耳石前駆物質が耳石結晶へと変化しつつあるもの (→), また小形の耳石が耳石前駆物質より生じている (⇒). 耳石の表面は細網状で粗である.
- 図 21: 卵形胎斑感覚上皮層の切断面. 細胞内に小顆粒を含むものがある (→).
- 図 22: 小顆粒を含む細胞の拡大. 顆粒の直径は, $1 \sim 2 \mu\text{m}$ で細胞内に充満している.
- 図 23: (A) 図 22 で示した顆粒の Ca 元素分析. これは結晶形耳石において検出される量の約半量に相当する.
- (B) 細胞内に顆粒のない I 型感覚細胞を (A) と同じ条件下に Ca 分析したもの. Ca は全く検出されない.
- 図 24: 卵形囊斑感覚上皮切断面. 細胞内顆粒と (→), その一部が細胞外へ分泌されている (⇒).
- 図 25, 26: 前庭暗細胞表面に付着している耳石. この部の耳石は正常形態に近いものから, 表面が軽石状となったもの (→), さらに外殻が消失して潰れたようなもの (⇒) まである. これらは耳石の Ca 吸収の種々の段階を示していると考えられる.
- 図 27: 前庭暗細胞表面にみられる網状構造をした物質 (→). この物質は崩壊の激しい耳石の傍にもみられることから耳石の Ca 成分が消失した後に残った organic matrix と考えられる.