モルモット前庭単離有毛細胞の運動性と細胞骨格について

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：夜陣紘治教授）

宮 脇 浩 紀

MOTILITY AND CYTOSKELETON OF ISOLATED VESTIBULAR HAIR CELLS
OF THE GUINEA PIG

HIRONORI MIYAWAKI, M.D.

Department of Otolaryngology, Hiroshima University, School of Medicine, Hiroshima

Vestibular hair cells were isolated from the vestibular endorgan of the guinea pig by enzymatic and mechanical dissociation. The isolated cells were divided into three types: flask-shaped type I cells, rod-shaped type II cells and round supporting cells. The cilia of type I cells in the crista were longer than those in the corresponding cell type in the macula. After exposure to a medium containing a high concentration of potassium, to a hypoosmotic (280mOsm) medium or to medium containing ATP, the type I cells showed tilting of the neck portion accompanied by tilting of the hair bundle. Isolated living type I vestibular cells are capable of self-movement. Actin and the other proteins associated with the cytoskeleton are thought to be related to vestibular hair cell motility. The location of F-actin in the isolated vestibular hair cell was studied by using FITC-labeled phalloidin. In hair cells fixed by paraformaldehyde, actin filaments found to be located in the hair bundle and cuticular plate. In frozen-fixed cells perfused by artificial perilymph, the filaments were heavily located in the hair bundle and cuticular plate as well as throughout the cytoplasm. In frozen-fixed cells perfused with artificial endolymph containing a high concentration of potassium, staining of the hair bundle and cuticular plate was weaker. These changes in the actin staining pattern may be closely related to the mechanism of self-movement. Given the tight and dense structure of the vestibular epithelium, the shape changes of the isolated vestibular hair cells may in vivo lead to modulate stiffness of the apical portion of type I cells, and compliance of the receptor structure as a whole including its cupular or macular relationship. These active mechanical events could be closely related to an active adaptation process.

Key words: 前庭, 単離有毛細胞, F-アクチン, cuticular plate

A 99-1653-24520

結 言

蝸牛外有毛細胞の単離¹⁾²⁾が可能となつて以来、これを利用した数多くの研究が行われ、蝸牛での音の受容機構が次第に解明されるようになってきた。中でも単離外有毛細胞には電気刺激によって細胞体の長さが伸長あるいは短縮する fast movement³⁾と高カリウム液刺激による脱分極により起こる slow movement⁴⁾の存在することが報告され、以後多くの研究者によって

その生理学的性質が明らかにされてきている。蝸牛外有毛細胞の運動の意義に関して、fast movement は有毛細胞の active movement が音の入力を増幅し、感受性を増強して tuning をよりシャープにするといわれている。一方、slow movement は基底板の動きや蓋膜下腔の容積を変化させ、内有毛細胞の感覚毛と蓋膜との関係を調節し、過大音響による細胞障害を防止する役目を果たすと考えられている。これらの細胞の運動

性に関与する機構としてアクチンをはじめとする収縮蛋白が注目され、その局在に関しても免疫組織学的研究が数多く行われている。

一方前庭有毛細胞に関しても、近年下等動物の単離前庭有毛細胞の研究により、ウシガエル卵形囊斑感覚毛に運動能があることなど様々なことが明らかになってきたが、哺乳類については細胞単離の方法、性質、運動能の有無を含めていまだ不明な点が数多く残されている。今回、著者は高等動物でも前庭有毛細胞が蝸牛系と同様の能動的運動性を有するか否かを明らかにするために、単離前庭有毛細胞の形態学的観察と外液環境の変化による細胞の運動性を観察した。さらにその運動に関与する細胞骨格について免疫組織学的検討を行った。

研究方法

1. 前庭有毛細胞単離

実験には体重 200—250g のブライエル耳介反射正常な有色モルモットを用いた。動物はネブタールによる全身麻酔下に断頭した。直ちに側頭骨を摘出し、人工外リンパ (NaCl 130.0mM, KCl 5.4mM, CaCl₂ 1.25mM, Glucose 10.0mM, HEPES 5mM pH 7.2 浸透圧 300mOsm⁹⁾) 中で実体顕微鏡下に卵形囊及び前・外・後半規管膨大部を採取した。前庭感覚細胞の単離は、卵形囊斑及び半規管膨大部稜を 0.25mg/ml collagenase を含む人工外リンパにて 30 分間酵素処理した後、人工外リンパ中で機械的に単離した。単離後の細胞は人工外リンパを満たしたスライドガラス上の円形の chamber (フレキシバーム) に移し観察を行った。なおすべての実験は 20°C にて行った。

2. 形態学的観察

単離有毛細胞の観察は位相差顕微鏡 (Nikon DIAPHOT-TMD) で行い、BRS810 VIDEO TIME LAPS SYSTEM (Victor video camera, Victor videomonitor, Victor S-VHS VTR) にて記録し、まず正常形態について観察した。一部の試料は光顕による観察後、2.5% グルタルアルデヒド (0.1M リン酸緩衝) にて浸漬固定し 2% タンニン酸、2% オスミウム酸にて導電染色後エタノール系列にて脱水、酢酸イソアミルにて置換後臨界点乾燥 (CO₂) を行い走査電顕用試料とした。なお、観察には Hitachi S800 型走査電子顕微鏡を使用した。

3. 前庭単離有毛細胞の運動性について

次に有毛細胞の運動性について検討するために、有

毛細胞の外液環境を人工外リンパから、1) 高 K⁺ を含む人工内リンパ (NaCl 10.0mM, KCl 120.0mM, Glucose 10.0mM, HEPES 5.0mM 浸透圧 300mOsm), 2) 人工外リンパに蒸留水を加え低浸透圧 (280mOsm) にした液, 3) 人工外リンパに 10 μ M ATP を加えた液を、peristaltic pump を用いて chamber 内の人工外リンパと置換した状態で観察した。なお、感覚毛束及び頸部の運動は外液交換前と交換後の細胞の長軸方向における変位を角度で観察した。

4. 細胞骨格の免疫組織学的観察

前庭有毛細胞での F-アクチンの局在を観察するために、以下に示す 2 種の固定方法で試料作製を行った。①人工外リンパ中の前庭単離有毛細胞を 1% paraformaldehyde にて 2 分間固定した後、0.1% Triton X-100 で 2 分間処理。この後 phalloidin (4 μ g/ml) で 30 分間反応させ、0.1M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.0 で 5 分ずつ 3 回洗浄した状態。②採取した細胞を dry ice で冷却した 90% エタノールで固定後、0.5% Triton X-100 で 2 分間処理し、phalloidin に反応させた状態。

さらに有毛細胞の運動に伴う F-アクチンの局在の変化を調べるために、単離有毛細胞の外液を人工外リンパから高濃度カリウムを含む人工内リンパに置換した後、dry ice で冷却した 90% エタノールで凍結固定し、Triton X-100 で処理して phalloidin を同様に反応させて観察した。なお、試料の観察は落射蛍光装置 EFD2、顕微鏡 OPTIPHOT2、及び LSM 410 倒立型 UV 共焦点レーザー scan 顕微鏡 (KARL-ZWISS) にて観察した。ホストコンピューターは 486D $\times$ 2 with

図1 前庭単離 I 型細胞

左は卵形囊斑、右は膨大部稜より単離された I 型細胞 (黒矢印)。白矢印は支持細胞。

宮脇論文付図

図 11 冷却したエタノールで固定した人工外リンパ中の I 型細胞（共焦点レーザー顕微鏡像）
感覚毛束及び cuticular plate に強い蛍光が認められる。細胞質全体にもびまん性に強い蛍光が認められる。

図 12 冷却したエタノールで固定した人工内リンパ中の I 型細胞（共焦点レーザー顕微鏡像）
感覚毛束及び cuticular plate の蛍光が低下し，細胞質の蛍光が強くなっている。

図2 前庭単離II型細胞
黒矢印はII型細胞，白矢印は支持細胞。

8MB VRAM, ソフトウェアはLSM software for Windows Ver 3.70 を使用した。

結 果

1. 前庭単離有毛細胞の形状

卵形囊斑及び膨大部稜より得られた細胞は感覚毛を有する感覚細胞と感覚毛のない球状の支持細胞の2つに大別され、更に感覚細胞はフラスコ形を呈するI型細胞(図1)と円柱状のII型細胞に分類できた(図2)。卵形囊斑及び膨大部稜より採取されたI型細胞の細胞体は丸く膨らんだ体部と、頸と呼ばれる細長い部分からなり、円形の大きな核が体部のほぼ中央に位置していた。更に頸の上端にはcuticular plateとそれに続く感覚毛束が存在した。頸の長さは様々であったが、長いものでは細胞体体部の2倍以上に及ぶものもあった。感覚毛束にはkinociliumと思われる最長のものと、それに続いて階段状の配列をしたstereociliaが認められた。今回の単離法では卵形囊斑からの86%(60/70)、膨大部稜からの77%(41/53)がI型細胞であった。II型細胞は卵形囊斑と膨大部稜の両者の間で細胞の形状に特徴的な差異は認めず、円柱状でI型細胞のような細長い頸は持たず、細胞体中央に大きな核を有し、上端にはcuticular plateと感覚毛束が認められた。II型細胞の感覚毛束は短い階段状のstereociliaと比較的長いkinociliumにより構成されており、このkinociliumは試料作製時に容易に変形、脱落した。

前庭器では蝸牛と異なり有毛細胞間に支持細胞が存在する。今回の観察では有毛細胞の周囲に支持細胞と思われる円形の細胞が認められたが、その形態は他の観察法でみられる細長い形と異なり円形で中央部に核

表1 卵形囊斑及び半規管膨大部稜感覚細胞の比較

卵形囊斑		半規管膨大部稜	
I 型	II 型	I 型	II 型
15.9±4.5	10.9±2.3	cilia	25.8±14.2
21.4±5.8	15.6±2.7	縦径	20.6±6.2
10.9±2.3	11.2±1.0	横径	10.7±1.8
(μm)			

を有していた(図1, 2)。

卵形囊斑及び膨大部稜から採取された感覚細胞をI型細胞、II型細胞に分類して感覚毛束の長さ、細胞体の大きさを比較した(表1)。感覚毛の長さについては感覚毛束の最長寸を測定、細胞体の大きさは細胞体の基底側からcuticular plate上端までを縦径、細胞体の最も幅の広い部位を横径として計測した。卵形囊斑のI型細胞では縦径21.4±5.8μm、横径10.9±2.3μm、膨大部稜では縦径20.6±6.2μm、横径10.7±1.8μmと縦径と横径に関して両者の間に有意な差は認めなかった。感覚毛の長さに関しては、膨大部稜で25.8±14.2μm、卵形囊斑15.9±4.5μmと膨大部稜のI型細胞の感覚毛束は卵形囊斑のものより有意に長かった(p<0.01)。II型細胞ではkinociliumは単離過程でしばしば変性、脱落するため主に最長のstereociliaの計測を行ったが、その長さは卵形囊斑で10.9±2.3μm、膨大部稜で11.1±2.9μm、細胞体の縦径が卵形囊斑で15.6±2.7μm、膨大部稜で14.0±2.0μm、横径が卵形囊斑で11.2±1.0μm、膨大部稜で12.0±2.8μmと共に有意な差は認めなかった。

走査電顕による観察でもI型細胞の細胞体はフラスコ形を呈し、上半部に細い頸部をもっていた。また細胞体の上部にはパイプオルガン状に配列する感覚毛束を認めた。なおI型細胞に特有な神経杯は脱落しており細胞体のみの状態であった(図3)。II型細胞は円柱状の細胞体を有していた(図4)。

2. 前庭単離有毛細胞の運動性

単離された有毛細胞の外液環境を人工外リンパから人工内リンパに変え、高濃度K⁺を負荷したところ、80%(28/35)のI型細胞の頸部及び感覚毛束は液交換1分後にはkinocilium側に約15度傾いた(図5)。

外液環境を300mOsmの人工外リンパから280mOsmの低浸透圧液に置換した場合、75%(15/20)の細胞で置換後2分後には頸部及び感覚毛束のkinocilium側への傾きがみられた(図6)。

図3 前庭単離 I 型細胞の走査電子顕微鏡像
細胞体はフラスコ型を呈し、細胞体上部にはパイプオルガン状に配列する感覚毛（矢印）を認める。

図4 前庭単離 II 型細胞の走査電子顕微鏡像
細胞体は円柱状を呈し、細長い頸部は認めない。

図5 高濃度カリウム負荷による I 型細胞の変化
I 型細胞の外液環境を人工外リンパ (A) から人工内リンパ (B) に変えることにより、有毛細胞の頸部及び感覚毛束は kinocilium 側に約15度傾いた。

図6 低浸透圧液負荷による I 型細胞の変化
外液環境を浸透圧 300mosm の人工外リンパ (A) から 280mosm の低浸透圧液 (B) に変えることにより、有毛細胞の頸部及び感覚毛束は kinocilium 側に約15度傾いた。

10 μ M の ATP を含む人工外リンパに置換した場合にも、約64.2% (9/14) の細胞において同様の頸部及び感覚毛束の kinocilium 側への傾きが観察された (図7)。

3. 細胞骨格 (F-アクチンの局在)

人工外リンパ中の単離有毛細胞を paraformaldehyde で固定した場合には、細胞の cuticular plate と感覚毛束に一致して F-アクチンの存在を示す強い蛍光が認められた (図8)。しかし、細胞質にはほとんど蛍光は認められなかった。エタノールで凍結固定した細胞では、cuticular plate と感覚毛束に加え、細胞質

図7 ATP 負荷による I 型細胞の変化
外液環境を人工外リンパ (A) から $10\mu\text{M}$ の ATP を含む外リンパ (B) に変えることにより, 有毛細胞の頸部及び感覚毛束は kinocilium 側に約 15° 傾いた。

図9 冷却したエタノールで固定した人工外リンパ中の I 型細胞
感覚毛束 (矢印) 及び cuticular plate (矢頭) に強い蛍光が認められる。細胞質全体にもびまん性に強い蛍光が認められる。

図8 paraformaldehyde で固定し phalloidin で染色した細胞
感覚毛束 (矢印) 及び cuticular plate (矢頭) に強い蛍光が認められるが細胞質にはほとんど蛍光は認められない。

図10 冷却したエタノールで固定した人工内リンパ中の I 型細胞
感覚毛束 (矢印) 及び cuticular plate (矢頭) の蛍光が低下し, 細胞質の蛍光の方が強くなっている。

にもびまん性に強い蛍光が認められた (図9)。

人工外リンパから人工内リンパに置換した状態で凍結固定した細胞では, 人工外リンパ中の細胞を固定した状態に比べ cuticular plate と感覚毛束及び頸部の蛍光が低下し, 逆に相対的に細胞質の蛍光が強くなる傾向がみられた (図10)。

次に共焦点レーザー顕微鏡で観察すると, 人工外リンパの細胞では, 細胞質及び感覚毛束に強い蛍光が認

められた (図11) が核には認められなかった。人工内リンパに置換した状態では, 感覚毛束及び cuticular plate の蛍光が低下した (図12)。

考 察

近年, 蝸牛単離外有毛細胞を用いた研究が数多く行われ, その生理学的特性が明らかになってきている。一方, 前庭の有毛細胞に関しては両生類, 鳥類での単離細胞を用いた生理学的研究は認められるものの, 哺乳類の前庭感覚細胞の性質はいまだ不明な点が多い。著者は菅田⁶⁾の内耳感覚細胞迅速単離法を基に, 卵形

囊斑及び半規管膨大部様より有毛細胞を単離し、その形態及び外的環境の変化による運動性を観察した。さらにその運動に関与する細胞骨格についても検討を行った。

1. 単離前庭有毛細胞の形態

卵形囊斑及び半規管から得られた有毛細胞の細胞体の大きさは、諸家の報告によると⁷⁾⁸⁾ I型細胞が10-50 μ m, II型細胞が7-25 μ mとされている。今回単離して得られた有毛細胞の観察でも従来の報告と同様の結果であった。感覚毛束の長さに関しては、I型細胞は卵形囊斑では10 μ m以下のものから最長でも20 μ m前後であった。しかし膨大部様のそれは10 μ m以下のものではなく最長は60 μ m以上で細胞体と比較すると約4倍程度の長さのものまであり、膨大部様から得られた細胞の感覚毛束の方が有意に長く、従来の形態学的観察と同様の結果であった⁹⁾¹⁰⁾。II型細胞では卵形囊斑、膨大部様共に感覚毛束の長さは10 μ m前後で大きな差は認められなかった。単離した前庭有毛細胞の感覚毛束も1本の長く太いkinociliumと、それに続いて階段状に配列するstereociliaから構成されていることが今回の走査電顕による観察でも確認された。また細胞体のみならず感覚毛束の形態もI型、II型の判別に対応できることが明らかとなった。

単離して得られた有毛細胞には、神経杯の付着したものは認めなかった。また今回の研究では膨大部様、卵形囊斑ともに単離された細胞はI型細胞の方がII型細胞より数多く観察された。過去の報告によると、I型細胞とII型細胞は感覚上皮上での分布に差はあるものの細胞数はトータルとしてみれば大きな差はみられないとされている。しかしながら、一般に有毛細胞の単離を行う時にはコルチ器では外有毛細胞が、前庭器ではI型細胞の方がそれぞれ内有毛細胞、II型細胞より単離されやすいとされている。この理由に関してはいまだ明らかではないものの、I型細胞は支持細胞と神経杯を介して結合しており、支持細胞に直接囲まれているII型細胞に比べて機械的刺激により周囲よりはずれ易いことやI型細胞の方がII型細胞よりもmicrotubuleの密度が高く、化学的及び機械的な単離に対して細胞の形態を保つ能力が強いことが挙げられる¹¹⁾¹²⁾。今回I型細胞がII型細胞より数多く観察された理由は単離法を用いたことが関係していると考えられた。

2. 有毛細胞の運動性

蝸牛外有毛細胞は高濃度K⁺の負荷により細胞体が

長軸方向に収縮することをZenner⁴⁾が報告して以来、蝸牛外有毛細胞には電気刺激に対するいわゆるfast movementとslow movementが存在することが知られるようになった。蝸牛単離外有毛細胞のslow movementは細胞外液を高濃度K⁺にすることや低浸透圧にすることにより惹起される。本研究で前庭単離有毛細胞においても外液環境を高濃度K⁺に置換した場合、あるいは低浸透圧液にした場合に有毛細胞の感覚毛束及び頸部がkinocilium側に傾く変化を起こすことが認められた。加えてATPの負荷によっても同様の変化が観察された。すなわち前庭有毛細胞も運動性を有することが明らかとなり、加えてこの運動は蝸牛の外有毛細胞のslow movementに相当する運動と考えられた。

蝸牛外有毛細胞の運動性に関して、その機構については形質膜を介したイオン輸送に連動した水の動きによって細胞内の浸透圧が上昇し、細胞の長軸方向の短縮と膨張が生じることと、細胞内に増加したCa²⁺がカルモジュリンと結合しミオシン軽鎖キナーゼを活性化させた結果、アクチンとミオシンの相互作用によって収縮が起こるという2つの機構が独立して関与していると考えられている¹³⁾。前庭有毛細胞においても高濃度K⁺負荷あるいは低浸透圧により頸部及び感覚毛束が傾く変化が認められることにより、外有毛細胞と同様の形質膜を介したイオン輸送に連動した水の移動による運動があることは間違いないと思われる。もう1つのアクチンとミオシンの関与した機構に関しては、前庭単離有毛細胞の運動性を引き起こす刺激で細胞内Ca²⁺が増加すること、今回F-アクチンが細胞体に証明されたように前庭I型細胞にもcuticular plateと感覚毛に収縮蛋白の存在することから^{14)~18)}、細胞内に増加したCa²⁺がアクチンとミオシンの相互作用を引き起こし細胞の運動が起こる可能性が示唆されている¹²⁾¹⁸⁾。これらのことより前庭有毛細胞においても蝸牛と同様に2つの機構が独立して細胞の運動性に関与していると考えられる。また今回の実験ではATP負荷により細胞の運動性が引き起こされることが明らかとなった。ATPは神経伝達物質としての働きが注目されており、受容体依存性チャンネルを介して外液のCa²⁺の流入を起こし、収縮蛋白の活性化を促進させて運動能を引き起こすとされている¹⁸⁾。実際ATPのみならず、アセチルコリンやGABA等の種々の遠心性伝達物質は膜の受容体に作用し、Ca²⁺の増加を引き起こすことが知られている¹⁹⁾。

3. F-アクチン

収縮蛋白であるアクチンは monometric な状態と polymerized な形で細胞内に存在するが、polymerized された形で contractile component として働く²⁰⁾。polymerized された型であるF-アクチンの局在を明らかにするため、F-アクチンを phalloidin で染色すると蝸牛外有毛細胞では、stereocilia と cuticular plate に強い蛍光がみられ、細胞側壁にもF-アクチンの局在が認められるとされている^{20,21)}。また、ホルマリン等で化学固定した場合には cuticular plate から核に向かって伸びるいわゆる infra cuticular network (ICN) として強い蛍光が認められる。Carlisle²²⁾ は、ICN は蝸牛の上方回転の有毛細胞に顕著に認められるが、第1回転のものには認められないとし、ICN が細胞体を支える役割をすると推測している。しかし、Slepecky²³⁾ は化学固定や音響負荷、薬剤により細胞が侵襲を受けた結果としても生じる可能性を示唆しており、その存在意義は明らかではない。一方、山根ら²⁴⁾ はホルマリン固定で前庭単離有毛細胞でも蝸牛外有毛細胞と同様に ICN が認められたとしている。しかし、今回我々が Slepecky の方法に従い paraformaldehyde で固定した状態では、cuticular plate 及び感覚毛束には強い蛍光が認められたが、はっきりとした ICN は確認できなかった。いずれにせよ cuticular plate 及び感覚毛束にF-アクチンの存在することは間違いないと考えられる。

Slepecky²⁵⁾ は外有毛細胞をエクソノールで急速凍結固定することにより細胞質にびまん性にF-アクチンの存在することを報告しているが、今回の研究でも単離前庭有毛細胞での観察において同様に、cuticular plate 及び感覚毛束に加え細胞質にもびまん性の蛍光がみられた。また共焦点レーザー顕微鏡による観察でも同様であり細胞質全体にF-アクチンの存在することが証明された。このような cuticular plate 及び感覚毛束以外の細胞質のアクチンの局在について、工田ら^{20,27)} はサポニン灌流法にて前庭感覚上皮細胞の細胞骨格を観察し、アクチンフィラメントが細胞膜の裏打ち構造として存在すること、また cuticular plate はアクチンフィラメントの特徴的な網状構造で構成されていること、細胞内アクチンフィラメントは細胞表面の機械的強度に関与し、微小管とともに細胞の形態の変化や運動に関係しているとしていることを報告している。実際今回の研究により外液環境を人工リンパに変えた細胞を凍結固定した場合に、cuticular plate

及び感覚毛束の蛍光が人工外リンパ中の細胞に比べ低下することが示された。このことはF-アクチンの局在に変化が起きていることを示し、この変化は前庭有毛細胞の感覚毛束及び頸部が傾くという運動性に関係していると思われる。すなわち高濃度 K^+ 投与により有毛細胞には脱分極が生じ、細胞内のカルシウム濃度が上昇し、これによりアクチンとミオシンの相互反応が cuticular plate の付近で生じ、アクチンの局在に変化が起きたと考えられる。

蝸牛の有毛細胞の fast movement と slow movement は入力信号を増幅させ感受性を増強し周波数を弁別する active process をなしている。今回の研究で明らかとなった前庭有毛細胞の感覚毛束や頸部が傾く運動も、半規管膨大部稜や卵形囊斑の感覚上皮の I 型細胞の頂部すなわち感覚毛束や cuticular plate の stiffness に変化を起し、刺激に対する細胞の感受性を変化させることにより平衡覚の調節機構に関与していると考えられる²⁸⁾。そして、コルチ器と同様に前庭においても平衡覚閾値レベルでの感受性の増強あるいは低下といった active な調節機構が存在すると考えられる。また、Zenner²⁹⁾ は高濃度 K^+ による遅い運動は病的反応であり、active process は障害され、聴覚閾値レベルでの信号の増幅や感受性の増強が低下し、これが聴力低下や語音弁別能の低下を起こすとしている。例えばメニエール病の発作時には、Reissner 膜の破裂によって内リンパ腔の高濃度 K^+ が外リンパ腔に流れ込み、これによって蝸牛や迷路の感覚機構が傷害される³⁰⁾ としている。今回前庭感覚細胞を用いた実験の結果より、高濃度 K^+ の外リンパ腔への流入は前庭系においても調節機構の破綻をもたらし、これがめまいの発現に関与している可能性も示唆された。

ま と め

1. 有色モルモットを用い、卵形囊斑及び半規管膨大部稜より感覚細胞及び支持細胞を単離し得た。単離状態でも感覚細胞は I 型と II 型に分けられ、I 型細胞に関しては感覚毛束の長さが膨大部稜から得られたものの方が卵形囊斑のものより有意に長かった。II 型細胞に関しては、両者の間に形態的に特徴的な差異は認めなかった。

2. I 型細胞に高濃度 K^+ を負荷することにより細胞体の頸と感覚毛束の kinocilium 側への傾きがみられた。また低浸透圧環境下及び ATP を含む外リンパ中でも同様の変化がみられた。これらの運動は蝸牛外

有毛細胞の slow movement に相当する運動であると考えられた。

3. 人工外リンパ中の単離前庭有毛細胞を paraformaldehyde で固定し phalloidin で染色すると、感覚毛束及び cuticular plate に F-アクチンの存在する可能性が示唆された。しかし ICN の存在は確認できなかった。一方エタノールで凍結固定した状態では、細胞質にもびまん性に蛍光が認められ、F-アクチンは細胞質全体に存在することが示唆された。

4. 外液を人工内リンパに置換し、高濃度 K^+ を負荷した状態で凍結固定すると、感覚毛束及び cuticular plate の蛍光が低下し相対的に細胞質の蛍光が上昇した。これは F-アクチンの局在に変化が起これこれが細胞体の運動性に関係していると考えられた。

参考文献

- 1) Katsuki Y, Covell WP: The organ of Corti by phase contrast microscopy. *Laryngoscope* 63: 1-17, 1953.
- 2) Goldstein AJ, Mizukoshi O: Separation of the organ of Corti into its component cells. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 76: 414-426, 1967.
- 3) Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, Ribaupierre Y: Evoked mechanical response of isolated cochlear outer hair cell. *Science* 227: 194-196, 1985.
- 4) Zenner HP, Zimmerman V, Schmitt V: Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear Res* 18: 127-133, 1985.
- 5) 宮脇浩紀, 有重秀三, 工田昌矢, 原田康夫: 前庭単離有毛細胞の運動性について. *Equilibrium Res Suppl* 8: 95-99, 1992.
- 6) 菅田吉範: 内耳感覚細胞の迅速単離法. *耳鼻臨床* 83: 1455-1461, 1990.
- 7) 大谷真喜子, 山下敏夫, 天野 一, 原田成信, 熊澤忠躬: モルモット前庭有毛細胞単離の試み. *耳鼻臨床* 84: 225-230, 1991.
- 8) Didier A, Decory L, Cazals Y: Evidence for potassium-induced motility in type I vestibular hair cells in the guinea pig. *Hear Res* 46: 171-176, 1989.
- 9) 原田康夫: 前庭器の形態、機能と病態. 西村書店, 新潟, 1984.
- 10) 原田康夫: 前庭器の走査電子顕微鏡による表面構造の研究. *耳鼻臨床* 64: 201-211, 1971.
- 11) Farve D, Sans A: Organization and density of microtubules in the vestibular sensory cells in the cat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 15-20, 1983.
- 12) Takumida M, Miyawaki H, Arishige S, Harada Y: Isolated vestibular sensory cells in the guinea pig. *ORL* 56: 190-194, 1994.
- 13) 高坂知節: 蝸牛の微細構造と音受容機構. *日本耳科学会* 1 Suppl 2: 1991.
- 14) Sobin A, Flock A: Immunohistochemical identification and localization of actin and fimbrin in vestibular hair cell in the normal guinea pig and in a strain of the Waltzing guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 96: 407-412, 1983.
- 15) Drenckhahn D, Schafer T, Prinz M: Actin myosin and associated proteins in the vertebrate auditory and vestibular organs: Immunocytochemical and biochemical studies. *Auditory Biochemistry*, ed. by Drescher DG. C. C. Thomas Springfield: pp 317-335, 1985.
- 16) Valat J, Devau G, Dulon D, Sans A: Vestibular hair cells isolated from guinea pig labyrinth. *Hear Res* 40: 255-260, 1989.
- 17) Sans A, Atger P, Cavadore C: Immunocytochemical localization of myosin tropomyosin and actin in vestibular hair cells of human fetuses and cats. *Hear Res* 40: 117-126, 1989.
- 18) Sans A, Brehier A, Moniot B: Immunoelectronmicroscopic localization of 'vitamin D-dependent' calcium-binding protein (CaBP-28k) in the vestibular hair cells of the cat. *Brain Res* 435: 293-304, 1987.
- 19) Yamashita T, Ohnishi S, Ohtani M, Kumazawa T: Effect of efferent neurotransmitters on intracellular Ca^{2+} concentration in vestibular hair cells of the guinea pigs. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 500: 26-30, 1993.
- 20) Slepecky NB, Ulfendahl M: Actin-binding microtubule associated proteins in the organ of Corti. *Hear Res* 57: 201-215, 1992.
- 21) Throne PR, Carlisle L, Zajic G, Schacht J, Altschuler RA: Differences in the distribution of F-actin in outer hair cells along the organ of Corti. *Hear Res* 30: 253-266, 1987.
- 22) Carlisle L, Zajic G, Altschuler RA, Schacht J, Throne PR: Species differences in the distribution of infracuticular F-actin in outer hair cells of the cochlear. *Hear Res* 33: 201-206, 1988.
- 23) Slepecky N: An infracuticular network is not required for outer cell shortening. *Hear Res* 38:

- 135-140, 1989.
- 24) 山根英雄, 中井義明, 小西一夫, 坂本平守, 井口広義, 他: 内耳感覚細胞の運動性と細胞骨格. *Equilibrium Res Suppl* 6: 47-51, 1990.
- 25) Slepecky N: Cytoplasmic actin and cochlear outer hair cell motility. *Cell Tissue Res* 257: 69-75, 1989.
- 26) Takumida M, Miyawaki H, Harada Y, Anniko M: Three-dimensional organization of cytoskeletons in the vestibular sensory cells. *ORL* 57: 100-104, 1995.
- 27) Takumida M, Miyawaki H, Harada Y: Cytoskeletal organization of the vestibular sensory epithelia. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 519: 66-70, 1995.
- 28) Dohlmann GF: On the mechanism of the Meniere attack. *Arch Oto-Rhino-Laryngol* 212: 301-307, 1976.
- 29) Zenner HP: Pathological Motility and Depolarization of outer hair cells. *Second International Symposium on Meniere's Disease*. Cambridge, MA, June 20-22, pp 247-252, 1989.
- 30) Zenner HP, Zimmermann U: Motile responses of vestibular hair cells following caloric, electrical or chemical stimuli. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111: 291-297, 1991.

稿を終えるにあたり、ご指導ならびにご校閲を賜りました原田康夫広島大学長に深甚なる謝意を表します。また本研究に際し、ご指導とご助言を戴きました夜陣紘治広島大学医学部耳鼻咽喉科学教授に深く感謝致します。

さらに、多くのご助言をいただいた工田昌矢講師をはじめとする広島大学医学部耳鼻咽喉科教室員と、田頭宣治広島赤十字・原爆病院耳鼻咽喉科部長に感謝の意を表します。

本研究の一部は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班の研究費補助により行われた。

本論文の要旨は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班平成3, 4年度総会, 第3回日本耳科学会(名古屋)において発表した。

(1996年5月23日受稿 1996年8月14日受理)

別刷請求先 〒734 広島市中区千田町1-1-6

広島赤十字・原爆病院耳鼻咽喉科 宮脇浩紀

<p>A 99-1648-30581</p> <p>日耳鼻</p> <p>アレルギー性鼻炎患者における Anosmic zones の検討</p> <p>肥後隆三郎・市村恵一・太田 康・石塚鉄男 (東京) 嶋崎雄一 (日本医療センター)</p> <p>1992年4月より1995年3月までの当科嗅覚外来受診者のうち、アレルギー性鼻炎を嗅覚障害の主因とした27例を検討した。T & T オルフアクトグラムにおいて8例に嗅素A, D, Eで検知・認知間の乖離が認められた。特定のニオイに対して嗅覚の減退がみられた点は、Douek の提唱したアレルギー性鼻炎における Anosmic zones に該当するものと思われる。呼吸性障害とは異なる要因による嗅覚障害の存在が示唆された。その原因として嗅上皮の病理学的変化に伴う嗅粘膜上粘液の異常、嗅神経細胞のニオイ分子に対する特異的応答の障害、また嗅神経細胞内のシグナル伝達系の異常などが考えられた。</p>	<p>A 99-1635-22092</p> <p>日耳鼻</p> <p>電気味覚検査の中耳術前検査としての有用性</p> <p>八木沼裕司 (NTT 東北) 小林俊光 (長崎大) 斎 山美子・高坂知節 (東北大)</p> <p>中耳術前診断における電気味覚検査の有用性を調べるため、97名106耳について疾患別および術中所見と鼓索神経領域の電気味覚閾値を対比較した。慢性中耳炎では味覚閾値は正常例とほぼ同じであったが、弛緩部型真珠腫、緊張部型真珠腫および癒着性中耳炎、既手術例の順で上昇し、特に既手術例では高度障害例が多かった。また電気味覚閾値は鼓室後上部の術中所見とよく相関していた。電気味覚検査により鼓索神経の状態を術前に予測することは術式選択の上でも重要であり、本検査は中耳術前検査として有用と考えられた。</p>
<p>A 99-1653-24520</p> <p>日耳鼻</p> <p>モルモット前庭半規管有毛細胞の運動性と 細胞骨格について</p> <p>宮脇浩紀 (広島大)</p> <p>モルモットの前庭から細胞単離を行い、フラスコ型のI型、円柱型のII型と円形の支持細胞が採取された。</p> <p>有毛細胞は高濃度 K^+、低浸透圧、ATPを含む外液環境で感覚毛束及び頸部が傾く運動を示した。F-アクチンは感覚毛束, cuticular plate 及び細胞質にびまん性に存在するが、高濃度 K^+ 負荷に伴う運動により局在に変化が認められた。</p> <p>前庭感覚上皮において、この細胞の運動性が受容体構造の stiffness や compliance に変化を起し、細胞の刺激に対する感受性を変化させ、平衡覚域値レベルでの感受性の増強あるいは低下といった active な調節機構に関与すると考えられる。</p>	<p>A 99-1641-23020</p> <p>日耳鼻</p> <p>Thapsigargin および Ryanodine の外リンパ灌流 による蝸牛内電気現象への作用</p> <p>武 浩太郎 (川崎医大)</p> <p>小胞体 Ca^{2+}-ATPase 選択的阻害剤で小胞体への Ca^{2+} の再吸収を阻害する作用を持つ thapsigargin および、小胞体の $ClCR$ チャネルに結合し、開口状態に固定する作用を持つ ryanodine を、各々、外リンパ灌流することにより蝸牛マイクロフォン電位 (CM)、蝸牛内直流電位 (EP) への影響を計測し検討した結果、両薬剤共に CM の減少を認めた。EP の変化は認めなかった。これらの結果より有毛細胞の細胞機能の保持には細胞外からの Ca^{2+} の流入だけでなく、細胞内 Ca^{2+} 貯蔵部位である小胞体からの Ca^{2+} 放出が重要な役割を果たしていると考えられた。</p>