 研 究

組織培養による仔犬蝸牛上皮の研究 (第二報)

—組織培養下におけるカリウム濃度変化が蝸牛上皮に及ぼす影響—

 おか の やす まさ
 岡 野 安 雅

既報の如く仔犬内耳の組織培養においてコルチ氏器を含む蝸牛管上皮は外リンパもしくは組織液に類似したイオン組成を有する組織培養液によって可良な生存を示す。この事実はコルチ氏器など蝸牛管壁を構成し、かつ内リンパに面している細胞群の栄養は内リンパ以外の液環境から供給されていることを示唆している。コルチ氏器のトンネルおよび有毛細胞間隙 (Nuel 腔) はコルチリンパによって満されており (Engström 1959), Rauch (1964) は生化学的検索によってコルチリンパは内外リンパとは異質の第3のリンパであるとしている。

Smith and Dempsey (1957) はトンネル内を走る聴神経末梢部の無髄線維は生理学的にみて内リンパの如き高カリウム、低ナトリウム組成の液内では興奮を伝達できないのでコルチリンパは内リンパではないと考えている。Tonndorf (1962) らはこの液が生体内色素注入で外リンパに近い液であることを検討した。

Iurato (1957) Duvall (1967) Echandia (1965) らの電子顕微鏡観察によると蝸牛管を構成する上皮細胞は互いに Zonulae occuludentes, Zonulae adherentes によって密に接合している。このため内リンパが蝸牛上皮細胞間を通過して直接細胞間隙に入り込むことはなくまた逆に外リンパ腔から物質が内リンパ腔に移行することもない。従って直接内リンパ腔に面している最表層の蝸牛管上皮細胞はその遊離表面以外はコルチリンパ、または組織液、または外リンパに接しているものと考えられる。

今回の実験は高カリウム、低ナトリウム培養液は蝸牛管上皮にいかなる影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

実 験 方 法

蝸牛管上皮の培養は既報の方法によった。培養に用いた人腹水、Gey 氏液等量混合液 (AG 液と略す) の Na, K 組成は第1表に示す如く外リンパのそれに近い。

第1表に示す如き AH-I ないし AH-III 液を調整した。AH-I 液では Na 濃度は 105 mEq/l, K 濃度は 15.6mEq/l である。AH-II

液, AH-III 液と順次 Na 濃度は下降, K 濃度は上昇させてある。滲透圧はシュクローズを用いて調整した。内リンパ液と同じ Na, K バランスの塩類を作製することは可能であるが、培養には腹水を等量混合するので内リンパ液と同じ Na, K 濃度の培養液は作れなかった。

AG 液にて培養し形態的に安定した組織培養

Effect of a High Concentration of Potassium on the Cochlear Epithelia in the Tissue Culture.
Yasumasa Okano.

京都大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 森本正紀教授) (指導: 岩井 一講師)

表 1

	外リンパ	内リンパ	A G 液	AH—I	AH—II	AH—III
Na mEq/l	138-150	15- 26	124	105	98	72
K mEq/l	4.7-5.0	130-148	3.6	15.6	20.4	46.4

A : Ascites
G : Gey's solution
H : High potassium solution

24時間の蝸牛上皮を検体として用いた。すなわち Rose-Chamber 内の AG 液を除去して AH-I~AH-III などと交換し培養を続ける。

液交換後の蝸牛上皮各部の形態学的変化を経時的に観察した。

実験成績

a) AH-I 液 (Na 105mEq/l K 15.6mEq/l) における毛細胞の変化

AG 液で24時間培養した毛細胞はその形状に変化を示していない (第1図-a) AG 液と AH-I 液 (Na 105mEq/l K 15.6mEq/l) と交換したのち経時的に毛細胞の変化を追跡した。

液交換5時間目から第3列の外毛細胞に変化があらわれる。変化は先ず細胞膜下細胞質辺縁部の淡明化、空胞化から始まる。次いで細胞内顆粒は核周囲に集合し細胞質と細胞膜は分離した如く見える。細胞膜下の間隙は次第に拡大して細胞は球状に膨化する (第1図-b)。この変化は順次、第2、第1列に波及する。液交換後17時間では第2、第1列でも毛細胞の膨化が強い (第1図-c)。しかし内毛細胞には軽度の浮腫を認める以外変化を認めない。

第1図-dは液交換後20時間の外毛細胞である。第2列までの外毛細胞の膨化に引き続いて細胞膜が破裂し、変性した外毛細胞が見られる。(Ghost-cell と仮称する)。第1列ではなお細胞の膨化がある。一度細胞膜が破裂した細胞は略24時間は一見正常に近い細胞の外観を保つが、その後は急速に萎縮して周囲の組織から分離され消失する。この間細胞内では小空胞の発生、ブラウン運動などが認められる。従って Ghost-cell は大きさ、外観などで正常の形を示していても実はすでに不可逆的に変性、崩壊し

た細胞と考えられる。液交換後22時間目には第3~第1列すべての外毛細胞は破裂し終り外見上は元の形に戻っているが先述の Ghost-cell である。(第1図-e) AH-I 液交換後、外毛細胞が全て破裂し終るまでの時間は22時間である。第1図-fに示す如く AH-I 液内で72時間経過したのちもダイテルス細胞は変性を示さない。崩壊した外毛細胞を押し上げる様にしてダイテルス細胞が細長く放射方向に延びている。

b) AH-II 液 (Na 98mEq/l, K 20.4mEq/l) における毛細胞の変化

AG 液にて培養24時間後に AH-II 液と交換する。第2図-aは交換直後の外毛細胞群である。外毛細胞配列に乱れはなく浮腫も認められない。

AH-II 液交換後2時間を経ると外毛細胞の第3列から第1列にわたってほとんど同じ程度の軽い細胞浮腫を生じる。AH-I 液で見られた外毛細胞列間の差は著明ではない。(第2図-b)

液交換5時間後には第1~3列いづれにも高度に膨化した外毛細胞と中等度に膨化した細胞が混在している。細胞の破裂は未だ認められない。

12時間経過後には高度な浮腫状膨化を示し一部細胞膜は破裂した Ghost-cell も見られる。

AH-I 液

第1図 a : 24時間 AG 液にて培養後 AH-I 液に交換直後, 内, 外毛細胞の列の乱れは無い。

第1図 b : 液交換後5時間, 外毛細胞全体に浮腫が見られ細胞間隙が拡ってくる。

第1図 c : 液交換後17時間 外毛細胞全体に強度浮腫が認められ, 列の乱れが起る。

第1図 d : 液交換後20時間 外毛細胞には既に破裂した細胞も認められ, 一部強度浮腫が有る。

第1図 e : 液交換後22時間 全ての外毛細胞が破裂し一見元へ戻った様に見える。(Ghost-cell)

第1図 f : 液交換後72時間 外毛細胞は全て萎縮しているがダイテルス細胞は長く延びている。

AH-II 液

第2図 a: AG 液24時間培養後 AH-II 液へ交換直後, 毛細胞の列の乱れは無い.

第2図 b: 液交換後2時間 既に外毛細胞3列共に均等に乳腫が認められる.

第2図 c: 液交換後5時間 更に浮腫が増強した.

第2図 d: 液交換後12時間 外毛細胞3列共に強度浮腫を認める.

第3図 液交換後10時間

a: ラセン稜, b: ライスネル膜

AH-III 液

第4図 a : AG 液内24時間培養後 AH-III 液へ交換直, 後内, 外毛細胞の聴毛, 外毛細胞の列の乱れは無い.

第4図 b : 液交換後1時間 外毛細胞第3列に強度浮腫, 第1, 2列は変化は認められない.

第4図 c : 液交換後3時間 第1, 2列に軽度浮腫が現われる.

第4図 d : 液交換後5時間 第3列外毛細胞には破裂を認める第1, 2列の浮腫も増強.

第4図 e : 液交換後8時間 第1列のみ浮腫は残り第2, 3列は全て破裂.

第4図 f : 液交換後12時間 外毛細胞3列共破裂

細胞内顆粒のブラウン運動は停止する. この時点でも内毛細胞の変化は少ない.

第3図—a, bは AH-II 液交換後10時間のラセン稜歯間細胞とライスネル膜を示す. この時期には前述の如く毛細胞には高度の膨化, 細

胞膜の破裂などが起っているがラセン稜歯間細胞, ライスネル膜, 上皮細胞には何等の変化も認められない.

c) AH-III 液 (Na 72mEq/l K 46.4mEq/l) における変化

AG 培養液内に培養24時間後, AH-III 液と交換する. 第4図—aは AH-III 液交換直後の所見である. 内毛細胞聴毛, 外毛細胞第1列, 第2列聴毛および第3列クチクラ板が認められる. 交換後1時間を経ると外毛細胞第3列基底部に高度の細胞浮腫が現われる. 外毛細胞列の乱れも認められるがクチクラ板は変化していない. 第1列, 第2列の外毛細胞には変化は認められない. (第4図b)

液交換後3時間を経ると第4図—cに示す如く第3列外毛細胞には破裂したものも認められるが第2列外毛細胞には中等度, 第1列に軽度の浮腫がみられる. 5時間後には第3列外毛細胞は大部分破裂している. 第2列は高度の膨化ないし細胞の破裂, 第1列には中等度ないし高度の浮腫を認める. (第4図d)

8時間後には第2, 第3列の外毛細胞は全て破壊され, 細胞内には小顆粒のブラウン運動が見られまた小空胞が形成されて来る. (第4図e)

12時間後には外毛細胞は全て破裂し一部にク

考

内リンパは血清, 組織液, 外リンパなどとは著しく異なるイオン濃度を持った特殊な液環境である. 従来はコルチ氏器の栄養補給は全て内リンパを介して行なわれるものと素朴に理解されていた.

Engström (1960) により提唱されたコルチリンパの組成が内リンパよりむしろ外リンパに近いことが明らかにされて以来 (Rauch 1964) 内リンパはコルチ氏器への物質補給とは別個の特有の機能を有するものと考えられている. 現在一般には内リンパが高K, 低Na組成であることから E. P. の発生に重大な関係を有し音の受容に必須な機構を維持しているとされている (Konishi 1959). しかし Misrahy (1958) らの如く毛細胞への酸素供給は内リンパを介して行なわれるとするものもある.

今回の実験では培養液のK濃度を上げて培養

第5図: 液交換12時間 ラセン稜
内側帯細胞に変化を認めないが外側帯歯間細胞は強度浮腫を呈する.

チクラ板のみが残存している. 内毛細胞は感覚毛を一部失っているが細胞自体の形態はほとんど変化していない. (第4図f)

第5図は AG 液培養24時間後 AH-III 液と交換後12時間経るとラセン稜外側帯上皮細胞 (歯間細胞) は細胞内浮腫を示し細胞間隙が開いた様に見える. しかし内側帯の上皮細胞には変化を認めない.

按

された蝸牛上皮細胞がいかなる反応を示すかを検索した. その結果, 内, 外毛細胞には高度の細胞内浮腫と細胞崩壊が, ラセン稜歯間細胞には中等度の細胞内浮腫が惹起されるがダイテルス細胞, ヘンゼン, クラウヂウス細胞, 内ラセン溝細胞には何等の変化も現われないことを知った.

既報の如く組織培養においてはヘンゼン, クラウヂウス細胞, 内ラセン溝細胞, ダイテルス細胞は比較的安定した細胞であって長期間の培養に耐え得る. これに反して外毛細胞は培養数日で感覚毛が脱落し, ついで細胞の変性, 崩壊を来す. 内毛細胞, 歯間細胞は外毛細胞よりはやや安定しているが培養10日ないし20日の間には大部分が変性する.

培養経過中に緩徐に進行する細胞の変性とは質的に異なる急性の変化が高カリウム液内で見

られる事実は高カリウム液は内外毛細胞の生活維持に何ら貢献しないのみならずむしろ細胞毒として働くことを示している。

この事実はまた、内外毛細胞、ラセン稜歯間細胞は生体内では高カリウム液との間に液交換の場を有していないことを意味する。ヘンゼン、クラウヂウス、ダイテルス細胞や内ラセン溝細胞は高カリウム液に接しているか、あるいは高カリウム液によっても細胞の生存に何ら影響を受けないものと解し得る。

生体内で内外リンパの混合が起こる場合、外リンパ(コルチリンパ)内へ、内リンパが混入する場合と、内リンパへ外リンパが混入する場合が考えられる。

ライスネル膜破裂により内リンパと外リンパの混入する場合は、内、外リンパ、コルチリンパは全て均質化するので今回の実験成績からみて毛細胞に特異の変化を生じないであろう。逆に蝸牛管上皮細胞壁の破綻によってコルチリンパ内、または細胞間隙に内リンパが流入しK濃度が40mEq/l以上となれば、毛細胞および歯間細胞には急激な細胞崩壊が惹起されるであろう(Silverstein 1970)。

結 言

1. 蝸牛上皮細胞のうち内ラセン溝細胞、ダイテルス細胞、ヘンゼン細胞、クラウヂウス細胞、ライスネル膜細胞は内リンパ液と類似した高カリウム、低ナトリウム液に培養しても、形態的变化を示さない。

2. 外毛細胞は高カリウム、低ナトリウム液に培養されると、カリウム濃度の上昇に比例して急速に細胞浮腫を来し、細胞は破裂する。短時間に毛細胞が崩壊、消失してもクチクラ板は現形を保存する。

3. ラセン稜の外側帯の上皮細胞は高カリウム液に反応を示すが、その程度は外毛細胞に比して軽度である。

Schuknecht ら(1962)はメニエル氏病に見られる血管条の萎縮、感覚細胞の脱落などの内耳病変は内リンパ圧上昇の直後の結果ではなくむしろライスネル膜破裂に伴った内、外リンパの混入が原因と考えられている。

しかし組織培養実験の結果からみるとライスネル膜破裂によって外リンパと内リンパが混入し内リンパのK濃度が低下しても機能的障害のみで感覚細胞の変性が起こるとは考えがたい。むしろ内リンパ圧上昇の結果、蝸牛管上皮細胞の細胞表面もしくは細胞間隙に何らかの破綻を生じその結果、内リンパがコルチリンパあるいは組織液中に流入したと考えるのが妥当であろう。血管条の組織培養ならびに血管条上皮細胞の高K液内での変化については後報に詳述するが感覚細胞と略類似した反応を示している。

培養という極めて模式化された実験の結果からは直ちにメニエル病の発生のメカニズムを論じ得ないのは当然である。しかし高カリウム液に浸漬された感覚細胞が急激に変性崩壊する事実は、若し細胞間隙へ内リンパの流入があればメニエル病に見られる様な内耳病変が起り得ることを示唆している。

参 考 文 献

- 1) Duvall, A.J. : Reissner's Membrane, Arch Otolaryngol 86 : 37-45, 1967.
- 2) Echandia, E.L.R. and Burgos, M.H. : The fine structure of the stria vascularis of the guinea pig inner ear. Z. Zellforsch. 67 : 600-619, 1965.
- 3) Engström, H : The Cortilymph, The third lymph of the inner ear. Acta Morph Neerl-Scand 3 : 195-204, 1960.
- 4) Iurato, S. : Elektronenmikroskopische Strukturen der Innenohrmembranen mit Rückschlüssen

- auf ihre Eignung zum Stoffaustausch. Arch. klin. exp. Ohr. -Nas. -u. Kehlk. Heilk. **189** : 113-126, 1967.
- 5) Konish, T., Kelsey, E. and Singleton, G.T. : Effects of chemical alternation in the endolymph on the cochlear and deafness. J. Am. Med. Assoc. **171** : 1927-1932, 1959.
- 6) Misrahy, G.A., Shinabarger, E.W. and Arnold, J.E. : Changes in cochlear endolymphatic oxygen availability, action potential and microphonics during and following asphyxia, hypoxia and exposure to loud sound. J. Acoust. Soc. Amer. **30** : 701-704, 1958.
- 7) Okano, Y., Iwai, H., and Yamashita, T. : In vitro Morphological study of cochlear epithelium. Arch. Oto-Rhino-Laryng. (in press)
- 8) Rauch, S. : Biochemie des Hörorgans. Einführung in Methoden und Ergebnisse, G. Thieme, Stuttgart. 1964.
- 9) Schuknecht, H.F., Benitez, J.T. and Beekhuis, J. : Further observations on the pathology of Meniere's disease. Ann Otolaryng. **71** : 1039-1054, 1962.
- 10) Schuknecht, H.F. : Meniere's disease. A correlation of symptomatology and pathology. Laryngoscope **73** : 651-665, 1963.
- 11) Silverstein, H. : The effect of perfusing the perilymphatic space with artificial endolymph. Ann Otolaryng. **79** : 754-765, 1970.
- 12) Smith, C.A. and Dempsey, E.W. : Electron microscopy of the organ of corti. Amer. J. Anat. **100** : 337-367, 1957.
- 13) Smith, C.A. : Structure of the stria vascularis and the spiral prominence, Ann Otolaryng. **66** : 521-536, 1957.
- 14) Tonndorf, J., Davall, A.J. and Reneau, J.P. : Permeability of intracochlear membranes to various vital stains. Ann Otolaryng. **71** : 801-841, 1962.

(原稿到着：昭和49年9月19日
別刷請求先：岡野安雅
〒606 京都市左京区聖護院川原町53
京都大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

会 告

THE FOURTH BRITISH ACADEMIC CONFERENCE IN OTOLARYNGOLOGY

This Meeting will take place from Sunday, 20th July to Friday, 25th July, 1975 in the Royal Festival Hall, London, England.

World authorities on many topics will be presenting their views at formal lectures and in panel discussions. There will also be Instructional Sessions, Films and a full social programme.

Those interested should write for details to :—

Mr. Andrew Morrison, F.R.C.S.,
38, Devonshire Street,
LONDON, W1N 1LD.