前庭感覚細胞の割断法による走査電顕的観察

藪 田 良 三

Scanning Electron Microscopic Observation of Vestibular Sensory Cells by Means of the Cracking Method

Ryozo Yabuta

(Hiroshima University)

The frozen crack surface of the vestibular sensory epithelium in the guinea pig were observed by the scanning electron microscope.

The specimens were prepared by "Os-DMSO-Os method" which was introduced by Tanaka and Naguro.

Type 1 cells were surrounded by nerve chalice which was an afferent nerve ending and were floated in that nerve chalice.

The afferent nerve endings were observed in contact with nerve chalice.

Type 1 cells were seen mainly on the central part of the semicircular canal cristae.

The organelles in the vestibular sensory cells were observed with field emission scanning electron microscope and three-dimensional architectures of mitochondria, endoplasmic reticulum and Golgi apparatus could be observed.

I は じ め に

内耳の形態学的観察は、古くは光学顕微鏡にはじまり、現在では透過型、走査型電子顕微鏡へと飛躍的に進歩した。

走査電子顕微鏡による最近の内耳の形態学的観察は、J. Lim¹⁾, Lundquist²⁾, 原田³⁾, Rosenhall⁴⁾, 星野⁵⁾らによって前庭感覚器の表面微細構造が徐々に明らかにされてきた。

また最近では走査電子顕微鏡の改良に伴って試料作成技術も進歩し、高倍率で観察することが可能となり、田中⁶⁾らの報告の如く細胞内小器官も立体的に観察できるようになった。そこで今回私もまた、前庭感覚細胞内の内部構造および求心性、遠心性神経終末の付着状態などを観察すべく、前庭感覚細胞を冷凍割断法にて割断し、その割断面を走査電子顕微鏡にて観察し、若干の知見を得たのでここに報告する。

II 材料ならびに実験方法

体重300~400g 前後の成熟モルモットを断頭	スミウム酸液を注入し、1時間固定した。次に
後直ちに側頭骨を取り出し、卵円窓より1%オ	0.2 M リン酸 Buffer 洗浄し、骨迷路より前庭

器を取り出した。前庭器は卵形囊斑、半規管を DMSO 内に浸漬し、所謂 DMSO 割断(田中氏法)を行った。割断した試料は再び 0.1%オスミウム酸液に36時間放置し、その後2%タンニン酸、1%オスミウム酸液により後固定を行った。脱水は50~100%の上昇エタノール系列に

より行い、酢酸イソアミールに置換し、液体窒素ガスによる臨界点乾燥を行った。その後イオンコーターにより金のスパッタリング蒸着を行い、JSM-T200型並びに JSM-FE 15型 走査電子顕微鏡で試料の観察を行った。

III 観 察 結 果

1. 卵形囊感覚上皮(図1)

耳石器の卵形囊は、耳石、耳石膜、感覚毛、感覚細胞、神経終末、神経が割断した面において観察される。このうち、耳石、耳石膜の観察は表面的観察の方が詳細な形態がわかり、耳石は耳石膜にゼラチン様物質に付着している。耳石膜と感覚毛との間には veil という網状のものが感覚上皮から、耳石膜にまでのび、所謂クプラ下腔の支持に役立っている。

I型細胞とII型細胞の形態の相違と、表面構造即ち、感覚毛束の形態よりI型細胞、II型細胞が認識できるかという目的で、感覚細胞の割断を行ったが、この点は今回は解決するに至らなかった。

感覚毛束の太い、即ち、stereociliaの多い細胞と、stereociliaの短い細胞でKinociliumの長い細胞はどちらがI型細胞であるかを決定するには割断法しかないと思われるが、この方法

図1 I : I型細胞 II : II型細胞 ← : 感覚毛
← : 神経杯 * : 支持細胞
I型、II型細胞、支持細胞、感覚毛が観察される

によっても困難であった。しかし神経杯を持つI型細胞とこれを持たぬII型細胞は割断面を見ることにより区別する事ができた。

i) I型細胞

I型細胞は神経杯によりとり囲まれ、神経杯

の中には、糸粒体が多数認められた。この糸粒体は特に細胞上部に多く存在し、細胞体周囲の糸粒体は細胞体に粗にゴマをまぶしたような形態で存在するのがこの割断法により判明した。細胞下部の糸粒体の分布はむしろ粗であった。

これらの糸粒体の間には filamentous なものが存在し、糸粒体は神経杯の中に粗に浮いているような立体的な所見が見られた。

ii) II型細胞

II型細胞は神経杯を持たず、円柱型であるが、一般に細胞体の上部に核が存在していた。核は大きく、細胞内に糸粒体、その他の細胞内小器官が存在するが、切断法によるものより、透過型による観察の方が適しているようであった。細胞表面が広いのがI型細胞かII型細胞かの判定はこの切断法でも困難であった。

iii) 支持細胞

支持細胞の核は基底膜近くに存在し、細胞体は細長く感覚上皮表面にまで達しており、表面には microvilli が存在している。核は基底膜上に一線に並び極めて配列が正しい。I、II型の感覚細胞の核は感覚上皮の中央又は下 $\frac{2}{3}$ の部に存在するが、支持細胞の胞体は基底膜の近くで太くなり核はその部に存在する。

2. 半規管膨大部感覚上皮 (図2)

i) 感覚細胞

半規管膨大部感覚上皮もI型細胞、II型細胞と支持細胞で構成されている。膨大部中央部では、主にI型細胞により占められているのは周知の事であるが、図2においてもI細胞が主でII型細胞は少ない。I型細胞は卵形囊I型細胞と同様に神経杯により取り囲まれており、核は感覚上皮の中央部に多くは位置している。切断法による観察では神経杯の形態がよくわかり、神経杯の底部はフラスコ型で、糸粒体の存在は多くなく、細胞質も粗であることがわかる。

II型細胞は円柱状で主に感覚上皮の周辺部に多く、核の位置は、I型細胞より上部にあることが多い。II型細胞に関しては従来、透過型電子顕微鏡にて観察された所見に加えるべき新事実はみつからなかった。

ii) 支持細胞

支持細胞は核が基底膜上に一列に並び、細胞体は細長く、細胞表面にまで達している。I型細胞が主に並んでいる膨大部中央部では支持細胞

図 2

◀: 感覚毛 | : I型細胞 || : II型細胞
* : 支持細胞 ◁ : 神経杯
R : 赤血球 N : 前庭神経

I型細胞がほとんどをしめている

胞の形態は細胞表面近くで細胞体が大きくなり、細胞中央部では細く、核を底部に垂鈴型をしている事が切断法により明らかになった。

iii) 基底膜下の構造

基底膜下には血管が見られ、その中に赤血球の存在も見られた。また髄鞘をもつ前庭神経は容易に観察できた。基底膜下と感覚上皮とは極めて明らかに隔絶されており、求心性遠心性神経は無髄となり、基底膜をつらぬき感覚細胞の下端に付着している。

iv) 移行上皮

移行上皮は表面がドーム状に膨隆した長直径約10μm くらいの細胞である。核は丸く細胞最下部に存在し、核上部に糸粒体や細胞内小器官が存在する。核の直下には厚い基底膜が存在する(図3)。本細胞が時には内リンパの分泌に関与

図3 BM:基底膜 TC:移行上皮 N:核
直径約 5μ の円形の核が細胞下方に並んでいる

するという事も考えられているが、今回の観察ではこれらの点は明らかにすべき所見は得られなかった。

3. 神経終末

i) 神経杯

I型感覚細胞の周囲をとりまく神経杯は、耳石器においても、膨大部稜感覚上皮においても、

ほぼ同様な所見を呈していた。即ち、細胞下部において、フラスコの底部のように球状にひろがり、胞体をうかべているような形態をしていた。神経杯内の糸粒体は直径 0.5μ 前後の円形なものも多く、細胞下部よりも側方より上方にかけて多く存在した。一部糸粒体の cristae も観察された(図4)。

図4 NC:神経杯 ←:糸粒体 →:クリスタ
細胞周囲を神経杯が被い糸粒体が観察される。

場所によっては、完全に胞体が消失し、神経杯の内面を観察できる部位があったこの部位で

は神経杯内面の壁より, filamentous なものも観察することができた (図5).

図5 NC: 神経杯 I: I型細胞
細胞体が抜けて神経杯だけが観察される。

これらの所見を総合するとI型細胞の胞体は細胞表面近くで、隣接する細胞と tight junction により接着されるが、それより下部の胞体は神経杯の中に浮いたような状態にあること

が判明した。尚神経杯の底部より求心性神経が直接でている事も観察された。

ii) 遠心性神経終末

前庭感覚細胞には神経杯とよばれる求心性神

図6 NC: 神経杯 ◀: 遠心性神経終末 ←: 糸粒体
神経杯に遠心性神経終末が付着しているのが観察される。

神経終末と、Ⅱ型細胞の底部に見られる求心性神経終末が存在するが、その他に遠心性神経終末が存在する。

神経終末には遠心性神経終末が直接付着しており、半規管膨大部の遠心性神経終末を観察することができた。2×1 μ の大きさの球状の形態をした神経終末の中には、直径0.3~0.6 μ の大きさの糸粒体が観察された。この遠心性神経終

末は神経杯に1ヶだけでなく数ヶ付着していた(図6)。

求心性神経終末とⅠ型細胞との関係、遠心性神経終末との関係は透過型電子顕微鏡による知見に加えるものはなかった。

4. 細胞内小器官

i) 小胞体

Ⅰ型細胞の核下部に約100m μ の厚さをもち、

図7 N:核 ←:小胞体
細胞下部, 核に接して小胞体が観察される。

図8 ←:ゴルジ空胞 ←:ゴルジ層板 N:核

5層の層状構造を持つ小胞体が観察された。核との交通については不明であり、一般によく観察される顆粒は存在せず、層構造のみがみられた(図7)。

ii) Golgi 装置

IV 考

前庭感覚細胞の走査電子顕微鏡学的観察は Lim¹⁾, Kellerhals et al.⁷⁾, らが最初でその後原田⁸⁾により報告がなされ、その表面微細構造の特徴が明らかにされた。また感覚細胞の内部構造については、Engström⁹⁾ らが透過型電子顕微鏡を用いて詳しく観察し報告している。

このようにごく最近までは走査電子顕微鏡では、表面構造を観察することが主であったが、DMSO という永晶防止剤を使用した切断法の出現により、木瀬¹⁰⁾は Golgi 装置、益永¹¹⁾はミトコンドリア、松本¹²⁾は粗面小胞体などの細胞内小器官を立体的に観察し、その内部構造の観察にも充分有用である事を証明した。

そこで私も DMSO 切断を用いることによって前庭感覚細胞の内部構造、神経終末の付着状態を立体的に観察することを試みた。しかし今回の観察では細胞内の超微細構造を知るには充分と言いがたいものがあった。それは切断法では任意の部分の面の試料を作成することがむずかしく、とくに前庭器官は試料が小さく、切断部位を選ぶのはほぼ不可能に近いことであった。また蒸着による金粒子が観察の妨げとなることもあった。

このように試料作成に少なからず問題があったが、感覚上皮を立体的に観察することの利点も多くあるように思われた。今回の実験でも神経杯の立体的所見を捉えることができ、前庭感覚細胞の内部構造および神経終末について若干の知見を得ることができた。

I 卵形囊並びに膨大部感覚細胞

モルモット卵形囊及び膨大部感覚細胞にはフラスコ型をしたⅠ型細胞と円柱状のⅡ型細胞があり、切断するとⅠ型細胞は周囲を神経杯で囲

察

Ⅰ型細胞の上方には、Golgi 空胞と、Golgi 層板が見られ、Golgi 装置が立体的に観察出来、この方法によると Golgi 装置の立体的観察ができることがわかった(図8)。

まれてⅡ型細胞とは区別できる。特にⅠ型細胞の神経杯は本法により立体的観察ができ、胞体が神経杯の中に浮いているような構造である。

Wersäll¹³⁾あるいは Spoendlin¹⁴⁾ らは、半規管膨大部の中心部分にはⅠ型細胞がそして辺縁部分には主にⅡ型細胞が見られると報告し、一方 Engström⁹⁾ らは中心部分も辺縁部分もほぼ同様に分布し、Ⅰ型細胞が全体の約60%を占めると報告している。今回の私の観察では、中心部分に限っていえば、そのほとんどがⅠ型細胞により占められていた。この点 DMSO 切断法によるとⅠ型細胞の神経杯間の細胞質が粗である為にⅠ型細胞の確認が容易であり、透過型電子顕微鏡による観察よりもⅠ型細胞を走査型電子顕微鏡により全視野観察できる利点もあった。

卵形囊においては、striola の部においてⅠ型細胞がほぼ等しく交互に並んでいる部分もあった。この様に切断法では切片による観察に比し不確実な点は前庭感覚上皮のように直径数 mm のような小さな試料には不適當であることもわかった。

Ⅱ 神経終末

神経杯は今まで Engström⁹⁾, 中井¹⁵⁾ らが透過型電子顕微鏡を用いて観察し、詳しく報告している。しかしながら、走査電子顕微鏡により立体的に観察したものは未だいない。図4、図5で明らかにした如く、Ⅰ型細胞は神経杯の中に浮かんでいるような状態であることが今回の観察で明らかになった。

また求心性神経終末と遠心性神経終末はその中の糸粒体の大きさ、数、シナプス小胞の数などにより区別されると言われているが、確かに

神経杯の糸粒体の方が大きかった。しかしシナプス小胞については確認が困難であった。

Ⅲ 細胞内小器官

細胞内小器官を走査電子顕微鏡で観察する試みはフリーズフラクチャーの応用¹⁶⁾¹⁷⁾、イオンエッチング法の応用など各種試みられてきたが、現在では DMSO 割断田中氏法が主流を占めている。

木瀬¹⁰⁾は成熟雄ラットの精巣上体の Golgi 装

置を詳細に観察し、Golgi 層板内腔表面に大小の開口部が存在することを発見した。

益永¹¹⁾は家兎心筋内ミトコンドリアを観察し、今までは捉えることができなかったクリスタの走行などについて詳しく報告している。

今回の観察では、Golgi 装置、糸粒体、小胞体とある程度の確認はできたが、未だ微細な点に関しては不十分な部分が多く、新知見を捉えることが困難であった。

V 結 語

前庭感覚細胞を DMSO 割断法により走査電子顕微鏡を用いてその内部構造及び神経終末の状態につき観察し報告した。

特にⅠ型細胞は神経杯の中に浮かんでいるかの如く存在する事を明らかにした。また神経終末の状態や細胞内小器官も立体的に観察し得た。

稿を終るに当たり、ご指導、ご校閲を賜った原田康夫教授に深甚の謝意を表します。

本論文の要旨は、日本電子顕微鏡学会第37回学術講演会にて発表した。

文 献

- 1) Lim, D. J. : Three-dimensional observation with the scanning electron microscope. *Acta Otolaryng, Suppl.* **255** : 1-38, 1969.
- 2) Lundquist P.-G., et al. : Raster-und Elektronen-Mikroskopie des menschlichen Labyrinths. *Mtschr. Ohrenheilk.*, **105** : 285-300, 1971.
- 3) Harada, Y. : Observation of morphological changes, in the vestibular sensory epithelia. *Equil. Res.*, **3** : 48-54, 1973.
- 4) Rosenhall, U., et al. : Surface structures of the human vestibular sensory regions. *Acta Otolaryng. Suppl.*, **319** : 3-18, 1974.
- 5) Hoshino, T. : Attachment of the innersensory cell hairs to the tectorial membrane. A scanning electron microscopic study. *O.R. L.*, **38** : 11-18, 1976.
- 6) Tanaka, K., Iino, A. and Naguro, T. : Scanning electron microscopic observation of intracellular structures of ion-etched materials, *Arch. histol. jap.* **39**, 165-175, 1976.
- 7) Kellerhals, B., Marti, E. and Villiger, W. : Surface View of the Guinea Pig Otolithic Membrane. *Pract. otorhino laryng.* **32** : 65, 73, 970.
- 8) 原田康夫 : 前庭器官の走査電子顕微鏡による表面構造の研究. *耳鼻臨*, **64** : 201-211, 1971.
- 9) Engström, H., Bergström, B. and Ades, H. W. : Macula Utriculi and Macula Sacculi in the Squirrel Monkey. *Acta oto-laryng. (Suppl. 301)* 75-126, 1973.
- 10) 木瀬照康 : ゴルジ装置の走査電顕的考察. *米子医学雑誌*, **30**(6) : 527-534, 1979.
- 11) 益永恭光 : 心筋内ミトコンドリアの走査電顕的観察. *米子医学雑誌*, **30** (6) : 519-526, 1979.
- 12) 松本行雄 : 走査電顕における細胞内構造剖出に対する実験的考察 *米子医学雑誌*, **30**(4) : 308-317, 1979.
- 13) Wersäll, J. : Studies on the structure and innervation of the sensory epithelium of the cristae ampullares in the guinea pig as revealed by the electron microscope. *Acta Otolaryng. (Stockh), Suppl.* **126** : 1, 1956.
- 14) Spoendlin, H. : Organization of the sensory

- hairs in the gravity receptors in utricle and saccule of the squirrel monkey. *Zellforsch* **62** : 701-716, 1964.
- 15) 中井義明 : 前庭半規管感覚上皮および壁細胞の微細構造. 耳鼻, **16** (補 3) 845-854, 1973.
- 16) Boyde, A. and Wood, C. : Preparation of animal tissues for surface-scanning electron microscopy. *J. Microscopy* **90**, 221-249, 1969.
- 17) Haggis, G. H. and Phipps-Todd, B.: Freeze-fracture for scanning electron microscopy. *J. Microscopy* **111**, 193-201, 1977.
- (別刷請求先 : 藪田良三
〒734 広島市南区霞 1 丁目 2 番 3 号
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室)