半規管クプラの実験的研究

——クプラへの直接刺激法について——

鈴木 衛・原田 康夫

Experimental Study of the Cupula

——Exposure and direct stimulation of the cupula——

Mamoru Suzuki and Yasuo Harada

(Hiroshima University)

The ampullary wall of the isolated frog posterior semicircular canal was cut, and the cupula was exposed in frog Ringer's solution. The cupula was stimulated by depressing it with a fine glass micropipette at three points: A, the lowest point on the midline of the cupula surface of the utricular side, B, the uppermost point on the midline of the same surface, and C, in the middle of the lateral surface of the cupula. The direction of depression at points A and B was towards the canal, whereas depression at point C was towards the center of the cupula. The amount of depression was controlled by a micromanipulator. At point A, the minimum depression which facilitated the posterior canal action potential was $1\ \mu\text{m}$. At point B, more depression was needed to produce the action potential. Depression at point C caused only a small action potential, even with a large amount of depression, possibly because sensory cell polarity is on the long axis of the canal.

はじめに

クプラは、その形状、運動様式などから、きわめて興味深い研究対象である。しかしながら、クプラ自体がきわめて脆弱であり、生体内で観察困難なことから、その機能については未だ不明の点が多い。前回は、カエル摘出半規管を用いて、クプラの除去が半規管活動電位に及ぼす影響を電気生理学的に検討した¹⁾。今回も、やはりカエル半規管を用いて、傷害することなくクプラを明視下に露出し、これを直接微細ガラス管で刺激することを試みたので報告する。

対象と方法

ウシガエル (*Rana catesbeiana*) 10匹を用いた。前回¹⁾と同様に、断頭後、実体顕微鏡下に frog Ringer 内で後半規管を摘出し、canal を微細ポリエチレン管に挿入固定した。つい

で、墨汁を緩徐に卵形囊側の切開口より流し込んだ。これにより、クプラの輪郭がほぼ明らかになった。

クプラの露出は、図1に示した手順で行

図1 後半規管膨大部切開法

番号でしめしたように、卵形嚢側、側壁、天蓋、canal 側側壁の順で切開を加え、クプラを露出した。

った。すなわち、膨大部側壁、頂上、さらに canal 側の順に微細なハサミを用いて切開し、膨大部壁を *crista* の高さより、ほぼ全周にわたって切開除去した。クプラ側面と膨大部側壁、さらに、クプラ頂上と膨大部天蓋との間にはわずかの間隙があり、膨大部壁を除去してもクプラは何ら形態的な障害をうけることなく *crista* 上に残ることがわかった。

つぎに、後半規管膨大部神経を前回報告¹⁾したと同様のガラス吸引電極で吸引し、活動電位を記録した。誘導した反応は増幅後、オシロスコープにて観察、データレコーダーにストックした。反応の解析は、スパイク密度ヒストグラムにて行った。

クプラの刺激方法としては、クプラを微細ガラス管にて直接圧迫することにより行った。すなわち、直径 $2\mu\text{m}$ の微細ガラス管を micro-

図2 露出したクプラと刺激部位

卵形嚢側の面では、正中線上最下点A、ならびに最上点Bを、canal 方向に向かい圧迫した。側面では、側面正中中部Cを膨大部中央に向けて圧迫した。さらに、canal 側の面では、A、Bに対応する各点を卵形嚢側に向かって刺激した。

manipulator に接続し、micromanipulator を $1\mu\text{m}$ または $10\mu\text{m}$ 単位で駆動することにより、実体顕微鏡下にクプラの圧迫を行った。刺激量は、1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, $60\mu\text{m}$ 、また刺激時間は10秒とした。

クプラの圧迫部位は、図2のように、卵形嚢側ならびに、canal 側の平面では、これらの面の正中線上の最下端(A)、ならびに最上端(B)、さらに、クプラの側面の中央部(C)とした。圧迫方向は、卵形嚢側の面上では、膨大部の長軸に沿った canal 方向、また canal 側の面上では、卵形嚢方向とした。さらに、側面からの刺激は、canal の長軸と直交する線上で膨大部中央向きに行った。

結 果

実体顕微鏡下に観察したクプラの形状は、卵形嚢側の面では、ほぼ膨大部壁に沿った半楕円形をしており、上方よりみると、すでに Hillman²⁾ が報告しているような亜鈴型を呈していた。この形は両端が膨らんだ *crista* の形に一致するものとされ、クプラと *crista* との接触が機能上重要であることをうかがわせている。

クプラ卵形嚢面の最下端(A)に、圧迫を加えた際の活動電位 spike 密度ヒストグラムの一例を図3に示す。 $20\mu\text{m}$ から $60\mu\text{m}$ の圧迫量にしたがって増大する明瞭な活動電位の発生がみら

れた。

つぎに $1\mu\text{m}$ ~ $5\mu\text{m}$ という少量の圧迫を加えた際の電位の変化を図4に示した。最下点(A)を $1\mu\text{m}$ 圧迫すると、すでにスパイク数147/secの活動電位の発生がみられた(図4-a)。さらに、 $5\mu\text{m}$ の刺激量では、286/secの著明な電位が生じた。同一の preparation にて、クプラ卵形嚢面の最上端(B)に刺激を与えた時の電位の変化を図4-bに示した。この場合は、 $1\mu\text{m}$ の刺激では、電位はみられていない。 $5\mu\text{m}$ の刺激量で、はじめてわずかの電位が得ら

図3 卵形囊側の面A点を canal 側に向かって刺激したときの後半規管神経活動電位。圧迫量は、上段よりそれぞれ20 μm , 30 μm , 40 μm , 50 μm , 60 μm である。刺激時間は10秒 (bar でしめす)。

考

半規管に対する刺激方法としては、Harada³⁾の機械的内リンパ流動をはじめとして、これまで回転刺激や温度刺激が用いられてきた。このうち、温度刺激と機械的内リンパ流動によるカエル後半規管神経の反応については、すでに報告した⁴⁾。半規管の反応からみたクプラの sensitivity については興味をもたれるところであるが、これまでの刺激方法を用いては、その sensitivity を決定することは困難である。Malcolm ら⁵⁾は、機械的内リンパ流動に対す

れたのみである。以上のように、クプラ最下端の刺激では反応を起こすに足る最小刺激量は1 μm であるが、最上端を圧迫した際は、同じ刺激量では反応量が低下する傾向のあることがわかった。

ついで、クプラの canal 側の面を卵形囊側へ圧迫した時の反応について検討した。最下点の刺激では、やはり1 μm の圧迫で図5にしめしたような自発放電の抑制が観察された。一方、クプラ最上点を圧迫した際は、卵形囊側の面を刺激した場合と同様、反応域値が上昇する傾向がみとめられた。

クプラ側面を圧迫した時の反応を図6にしめした。この場合は、5 μm までは明らかな電位はみられず、10 μm にてはじめて spike 数154/secの小さな電位が発生した。なお、クプラの反対側の側面より圧迫を加えた時も、ほぼ同様の反応が得られた。以上のように、クプラ側面を膨大部中央へ圧迫した時は、反応域値は著明に上昇する傾向があった。

察

る半規管神経の反応量と、回転刺激のそれとを比較して、反応を起こすに足る最小内リンパ移動量は、計算上、0.74~0.77 μm とした。McLaren ら⁶⁾は、クプラに marking を行い、正弦波運動の時のクプラの動きを観察し、クプラ下方が上端に比して運動性が大で、200°/secの回転刺激の際、6.6 μm 偏位したとした。また Oman ら⁷⁾は、機械的な障害を起こさないクプラの移動量は、おそらく5 μm 以下であろうと推論している。

図4 卵形囊側の面A点(図4-a), B点(図4-b)を canal 側へ圧迫したときの後半規管神経活動電位。

刺激量は, a, bともに1 μm (上段), ならびに5 μm (下段)とした。A点では1 μm の刺激で明瞭な活動電位がみられている。B点の刺激では, 5 μm ではじめて活動電位が記録された。

図5 canal 側の面を卵形囊側へ圧迫したときの活動電位。

最下点の圧迫(a)では, 1 μm で自発放電の抑制がみられた。

最上点の圧迫(b)の際は, 1 μm では明らかな抑制はみられなかった。

図6 クプラ側面中央部C点を刺激したときの活動電位。

刺激量は、上段より1, 5, 10 μ m. 10 μ mの刺激で活動電位の発生が観察された。また、刺激終了時にも、小さいながら spike の増加がみられている (矢印)。

今回のクプラを露出させる方法では、すでに述べたように、クプラ下端では1 μ mの圧迫で活動電位の発生がみられた。これは、微細ガラス管の先端のみによる圧迫であり、もし内リンパ流動でクプラが同じ1 μ m 偏位したとすれば、より広い範囲のクプラが動くことになり、さらに大きな活動電位が発生することが予想される。すなわち、内リンパ流動下では、電位を発生するに足るクプラの偏位量は、1 μ mよりさらに小となるであろう。したがって、おそらく Malcolm ら⁵⁾の0.74 μ mという値は、反応域値に近いものと考えられる。

クプラに、側面からの刺激を加えた報告はこれまで見られていない。我々の実験では、クプラの側面からの圧迫では、半規管の反応性は、きわめて低くなることがわかった。これは、半規管感覚細胞が canal 長軸方向に、極性を有することによるものと考えられる。ただし、刺激量を増すと、活動電位は小さいながらも発生するのが観察された。おそらく、過大な圧迫によるクプラのねじれが ampullofugal 方向に作用し、電位の発生をみたものと考えられる。なお、図6にしめたように、刺激終了時にも電位の増加をみることが多かった。これは、ampullopetal 方向にねじれていたクプラの一部が刺激終了時に ampullofugal 方向に動き、興奮性の作用をもたらすに至ったためと推測された。

今回、クプラ全体を露出させることにより、クプラへの種々の直接の操作が可能となった。この方法を用いれば、さらに、クプラ自体の弾性や粘性、crista との接着性などの物理的性状も、詳細に測定しうるものと考えられる。

結 語

frog Ringer液内で、カエル後半規管膨大部を切開し、クプラを露出した。露出したクプラを直接微細ガラス管で圧迫し、後半規管膨大部神経より活動電位を記録した。

1) クプラの卵形囊側の面を canal 方向へ圧迫すると、1 μ mの圧迫ですでに活動電位の発生がみられた。

2) 刺激部位に関しては、crista に近い部位の圧迫の方が、クプラ上部の圧迫よりも刺激効果が

大であった,

3) クプラ側面を膨大部中央へ圧迫した場合は, 刺激効果が小で, 約 $10\mu\text{m}$ の圧迫ではじめて活動電位の発生が観察された.

本研究の一部は, 科学研究費一般研究A (課題番号00444062) によった.

参 考 文 献

- 1) 鈴木 衛, 他: 半規管クプラの機能に関する実験的研究—特にクプラ除去の活動電位に及ぼす影響について—. 耳鼻臨床投稿中.
- 2) Hillman, D. E. : Cupular structure and its receptor relationship. *Brain Behav Evol* 10 : 52~68, 1974.
- 3) Harada, Y. and Musso, E. : Study of the action potential in the isolated posterior ampullar receptor. *Acta Otolaryngol* 72 : 274~280, 1971.
- 4) 鈴木 衛, 他: 半規管機能モデルの研究. 耳鼻臨床 77 : 1993~2001, 1984.
- 5) Malcolm, R. E. and Bechard, T. E. : Semicircular canals : Measurement of endolymphatic and cupular displacements at threshold. *Acta Otolaryngol* 93 : 275~282, 1982.
- 6) McLaren, J. W. and Hillman, D. E. : Displacement of the semicircular canal cupula during sinusoidal rotation. *Neuroscience* 4 : 2001~2008, 1979.
- 7) Oman, C. D., Frishkoph, L. S. and Goldstein, M. H. : Cupula motion in the semicircular canal of the skate. *Acta Otolaryngol* 87 : 528~538, 1979.

原稿到着: 昭和59年4月9日
別刷請求先: 鈴木 衛
〒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