コルチ器の外毛細胞神経終末に関する研究

— SEMによる観察 —

ドミンクス・マンガペ

Nerve Endings of the Outer Hair Cells
in the Organ of Corti

— Examined by Scanning Electron Microscope —

Dominggus Mangape

(Hiroshima University)

With the use of double sided adhesive tape in the microdissection, the space of Nuel in all turns of the cochlea can be exposed and observed by scanning electron microscope. The nerve endings in the basal turn were exposed entirely in the endolymphatic space, whereas in the upper turns almost all nerve endings were covered by the Deiters cell bulge. A gradual decrease in the number and size of nerve endings from the lower basal turn toward the apical turn was observed. In the basal turn, there were about 6-12 nerve endings on the surface of the lower pole of the outer hair cell. The size of the majority of these nerve endings was between 1 and 3.5 micrometers. In the apical turn, about 4-6 nerve endings with diameters of 0.5 to 2 micrometers were seen around the tip of the lower pole of the outer hair cell. The shape of the nerve endings also changed from spindle shaped in the basal turn to gradually rounded in the upper turns. In addition to the well known nerve endings on the lower pole of the outer hair cells, nerve endings located high on the outer hair cells were also observed. These high nerve endings varied in size and were located at various distances from the lower pole of the outer hair cell.

In guinea pigs treated with high doses of streptomycin or kanamycin, there was no pathological change of the nerve endings 24 hours after ten consecutive days of treatment or after the completion of injections given every other day. Although the nerve endings seemed to be more resistant to these ototoxic drugs, the outer hair cells consistently showed shrinkage, especially at the basal location where an ototoxic effect on the hair cell cilia was also observed. It appears that shrinkage of the outer hair cells may be an early sign of an ototoxic effect on the organ of corti.

緒 言

内耳に関する基礎的研究は19世紀後半より盛んに行なわれ、20世紀前半にかけて光学顕微鏡により、その基本的な構造が明らかにされた。この後、1951年に電子顕微鏡が生物学的研究に導入され

たことにより、今までの光学顕微鏡ではとらえ得ることのできなかった内耳の微細構造を観察することが可能となった。Engström, Wersäll (1953)¹⁾ は、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、内耳の感覚細胞、支持細胞、神経終末、神経線維などについて、その超微細構造を報告した。

一方、1961年 Békésy による聴覚生理機構の発見により、更に、コルチ器の表面形態への関心が高まった²⁾。時期を同じくして開発された走査電子顕微鏡が 1968 年生物試料の観察に導入され、内耳の表面立体構造の観察が可能となった。以後、電子顕微鏡の改良および試料作製技術の発達により、更に詳細な内耳立体構造に関する報告がなされるようになった (Lim D.J.³⁾ Bredberg^{4)~8)}, Mangape and Harada⁹⁾)。

コルチ器における神経支配に関しては、Rasmussen (1946)¹⁰⁾ がラセン板に遠心性線維の存在を確認して以来、コルチ器の神経支配についての優れた研究がなされている (Engström¹¹⁾, Spoendlin^{12)~15)}, Lorento de No^{16) 17)}, Bredberg^{4)~8)})。

しかしながら、コルチ器内における神経支配様式は極めて複雑であると同時に、動物により、また蝸牛内での部位によりその支配様式が異なるため依然として不明な点も多い。したがって、その立体的構造に関しては多くの研究もなく、Bredberg^{4)~8)}, Mangape and Harada⁹⁾, Harada, Hirakawa, Mangape¹⁸⁾ などの SEM による研究、高坂による 100 万ボルト超高压電子顕微鏡による研究¹⁹⁾ などがあるのみである。

今回著者は、未だ不明点の多い蝸牛の神経系と毛細胞との立体的構造を SEM にて明らかにするとともに、聴器毒性を有するアミノ配糖体系抗生物質である硫酸ストレプトマイシン (SM) および硫酸カナマイシン (KM) による毛細胞への影響と、神経終末神経線維に及ぼす影響の有無について研究を行なった。

実験材料および実験方法

実験動物には体重 300~500 g のプライエル反射正常なモルモットを使用した。ネブタール腹腔内麻酔後、心腔より 2% グルタルアルデヒド (pH 7.4 磷酸緩衝液加) にて灌流固定した。次いで、断頭後側頭骨を採取し、蝸牛を摘出した。摘出した蝸牛を 2% OsO₄ (pH 7.4 磷酸緩衝液加) にて 2 時間固定後、上昇エタノール系列により脱水し、酢酸イソアミルに浸漬後、臨界点乾燥 (CO₂) を行なった。この後、試料を両面テープにて分割し、コルチ器内部を露出後、白金スパッタリング蒸着を行い、JEOL JSM-T200 型走査電子顕微鏡にて観察した。

SM, KM を投与した障害実験には体重 250~350 g のプライエル反射正常モルモットを用

い、各 10 匹ずつの 5 グループに分けた。

グループ 1: SM を 250mg/kg 連続 10 日間腹腔内投与。

グループ 2: KM を 400mg/kg 連続 10 日腹腔内投与。

グループ 3: SM を 250mg/kg 隔日に 10 回腹腔内投与。

グループ 4: KM を 400mg/kg 隔日に 10 回腹腔内投与。

グループ 5: 生理食塩水を腹腔内に連続投与し、対照群とした。

尚、各動物の断頭は最終投与より 24 時間後に行ない、前述の方法で試料作製を行なった。

結

果

1. 正常モルモット

コルチ器断面ではコルチトンネル内を走行す

る求心、遠心の両神経線維が観察された。両神経線維はともにコルチトンネルを横断している

が、基底膜表面を走行する線維は求心性線維である。一方、遠心性線維は基底膜上コルチトンネル内を宙吊の状態を横断する。また、この断面では所謂コルチ器の inner fluid space も観察出来た。

以上の様にコルチ器を横断して観察面を露出することは比較的容易であるが、ラセン板に沿って蝸牛軸に平行な面でコルチ器を分割することは困難なことが多い。今回の研究では毛細胞の基底部に存在する神経終末を露出させる為にコルチトンネル、ヌエル腔、外トンネル部を両面テープを用いて分割し、このうち特にヌエル腔から外毛細胞に分布する神経終末を観察した。

1) 蝸牛基底回転下半部においては神経終末の形態は紡錘形でその平均的な大きさは直径 $1.0 \sim 3.5 \mu\text{m}$ であった。この部では、神経終末は毛細胞の基底部にのみ付着し、細胞体側壁部にはみられなかった。その数については、各終末が互いに重なり合っているため、正確な数をつかむことは困難であったが、おおよそ6個～12個と考えられた。またヌエル腔で分割した露

出面であるため Deiter's 細胞表面をラセン状に走行する求心線維である外ラセン神経束の観察も可能であったが、複雑な分枝や Deiter's cell bulge によって覆われる為、神経終末まで連続的に追う事は不可能であった。一方、遠心性神経線維については、時にその終末まで追う事が可能であった(図1)。

2) 蝸牛基底回転上半部では下半部と比較すると大きな差異は認められなかった。ただ、Deiter's 細胞が下半部に比べやや大きく、この為、神経終末の多くが Deiter's cell bulge に覆われることにより、神経線維との関係を観察することは困難であった。

この Deiter's cell bulge の増大は第2回転下半部より頂回転に向うに従って著明となり、神経終末塊を覆い隠すようになる。このため上部回転になるほど、神経束と神経終末の連絡をとらえることは難かしくなる。

3) 蝸牛第2回転下半部では外毛細胞基底部に付着する神経終末は、その上部のみが観察できるのみで、終末の大部分は Deiter's cell bulge によって覆われていた。また一部で観察

図1 正常モルモット蝸牛基底回転

第1列の外毛細胞下極内面に付着する神経終末がヌエル腔に露出している。外毛細胞は数個の紡錘形の神経終末が付着している。

可能であった神経終末の大きさは、基底回転のものと比較すると小型でその形も丸いものが大部分を占めていた。

4) 蝸牛第2回転上半部になると、毛細胞下部の神経終末を観察することは殆んど不可能となる(図2)。一方、この部よりも下方回転ではみられなかった **high nerve ending** (毛細胞側壁の高位置に付着する終末) が観察された。

5) 蝸牛第3, 第4回転では第2回転上半部よりも更に **Deiter's cell bulge** が増大し、毛細胞基底部を大きく覆うようになるため、終末を観察することは殆んど不可能であった(図3-a, b)。 **High nerve ending** については、第2回転上半部でみられたものよりもその数が更に増加していた。また、試料作製時に外毛細胞第1列の脱落した部より、第2列の外毛細胞を観察することが出来たが、第2列外毛細胞にも **high nerve ending** がみられた(図3-c)。 **high nerve ending** が外毛細胞に付着する位置は、外毛細胞体側壁の特定の部位に限定していることはなかった。また、終末の直径は

0.5~2 μ m の種々の大きさであったが、一般に細胞壁の高位に付着するものは低位のものよりも小型という傾向がみられた。

正常モルモットにおいても櫛の歯が抜けたように、外毛細胞第1列が欠損する場合のあることがわかったが、この現象の原因については現在不明である。第3, 4回転では前述の如く毛細胞下極に付着している神経終末は、 **Deiter's cell bulge** に覆われており、殆んどみることはできなかった。しかし、なかには **bulge** が極端に小さい場合、また **bulge** のみられない場合もあり、このような部位では毛細胞下極に付着する終末を観察することが可能であった。その終末の大きさは下方回転のものよりも小型であり、また、1個の外毛細胞に付着する数も少なく、平均的には4~6個であった(図4)。

今回の観察で、 **high nerve ending** は2つのタイプに分けられた。そのうち1つはボタン状の丸い終末、もう1つは神経線維とほぼ同じ太さでヒモのようなタイプのものであった。また、このいずれのタイプの **high nerve ending** をもつ神経線維において終末までの途中

図2 正常モルモット蝸牛第2回転上半部

ダイテルス細胞が神経終末の殆んどを覆い、上部のみが観察される。神経終末は小さく、丸くなっている。

でボタン状に膨隆しているものが観察された(図3).

2. SM, KM投与群

方法の項で記した如く, SM, KM投与群は4つのグループに分け, その各々についてコルチ器の表面構造およびヌエル腔よりの外毛細胞

体の観察を行なった. まずコルチ器表面構造の変化について述べると, SM, KM両投与群ともにこれまでの多くの報告にみられると同様, 聴毛の癒合, 脱落とともに毛細胞の消失, 支持細胞によるその部の置換がみられた. ただ, 今回は2種類の投与法を用いたが, 両薬剤とも

図3 正常モルモット蝸牛の high nerve ending

様々な形態, 高さの high nerve endingが観察される.

- a: 第4回転下半部の第1列外毛細胞でみられたボタン状の high nerve ending.
- b: 第3回転下半部の第1列外毛細胞でみられたヒモ状の high nerve ending.
- c: 第2回転上半部の第2列外毛細胞でみられた小型のボタン状 high nerve ending.

図4

a, b: 正常モルモット蝸牛第4回転上半部.

外毛細胞下極端周囲に丸い神経終末が Deiter's 細胞の収縮のため, 観察できる.

に、連日投与群の方が、隔日投与群よりも障害の程度は強いという結果を得た。また、障害の部位的差異は投与法の違いでは差がなく、いずれの方法においても障害は基底回転に強く、外毛細胞第1列に著明であり、何れも従来よりの報告と一致した結果が得られた。

次に、外毛細胞へ付着する神経終末へのSM, KMの影響であるが、全てのグループで、異常と思われる変化を認めることは出来なかった。

外毛細胞の聴毛に明らかな変化が生じている細胞体に付着している終末においても異常がなく、神経終末に対してはSM, KM両薬剤とも障害性がないものと思われた(図5, 6)。

ヌエル腔を開放すると第1列の外毛細胞の胞体が観察されるが、今回のSM, KM投与群では、外毛細胞体の収縮が異常所見として得られた。この収縮は聴毛の変性の強い基底回転において最も強く、上方回転になるに従って弱くな

図5 SM 250mg/kg 隔日投与モルモット蝸牛

a: 第3回転 b: 第2回転 c: 基底回転

最終投与より24時間後では、外毛細胞下極に付着する神経終末および high nerve ending (矢印) に著変はみられない。外毛細胞の収縮は、基底回転で最も強い。

り、頂回転では殆んどみられなかった(図5, 6)。収縮を来した細胞数は、聴毛の変性を来した細胞数よりも多く(すなわち細胞体が収縮像を呈していても聴毛は正常なものがある)、更に細胞体収縮の程度の強い細胞では聴毛の変性像がみられることから、別報¹⁸⁾で報告したよ

うに、細胞体の収縮は耳毒性薬物(SM, KM)によるコルチ器障害の初期変化であると考えられた。

更に変化が進行すると、コルチ細胞体よりの原形質突出も観察することが出来た。

図6 KM 400mg/kg 隔日投与モルモット蝸牛

a: 第2回転 b: 第3回転 c: 基底回転

投与群でも、high nerve ending (b) 及び外毛細胞下極に付着する神経終末(a, b)に著変はみられない。外毛細胞の収縮は基底回転で最も強く、第2回転(a)、第3回転(b)では軽度であった。

考

コルチ器の神経支配に関して、光学顕微鏡やTEMを用いての研究は数多く成されているが^{11)~15) 19) 20)}、SEMによる観察は、試料作製技術の困難さのためか、あまり行われていない。1974年 Engström²¹⁾ はSEMを用いて内耳の表面形態を初めて報告した。その後、Bredbergはコルチ器を開放して、その神経支配をSEMで観察した^{4)~7)}。彼らの初期の報告では、外毛細胞の神経終末に関しては簡単な記載があるのみである。それによると、蝸牛の基底回転では外毛細胞の神経終末は塊状となっており、ヌエル腔に露出しているが、上方回転になると、Deiter's細胞に覆われているとしている。神経終末の数や形態は各回転による差異のみならず、各細胞によっても種々であることはよく知られている。これまで1個の毛細胞に付着する神経終末の数や、その形態については多くの報告がある^{15) 19) 22)}。数については諸家によって異なるが、共通している点は、基底回転で最も多く、上方回転に向うにつれて減少するとされている。また大きさについても上方回転では下方回転よりも終末が小さくなるといわれている。Spoendlin¹⁵⁾ は基底回転における外毛細胞1個に付着する神経終末を10~12個と、またSmith C.A. and Sjöstrand F.S.²²⁾、Takasaka¹⁹⁾らはTEMによる連続切片の観察で、第3回転では12~24個と報告している。今回の観察では、神経終末が互いに重なり合っているため、その数を正確に数えることは困難であったが、基底回転ではおおよそ8~12個と推定され、Spoendlinの報告と一致した。また、上方回転に向うにつれて神経終末の数は減少する傾向があり、頂回転ではおおよそ4~6個と思われた。

コルチ器は求心性および遠心性の2種の神経支配の存在することが知られているが、今回のSEMによる観察では、この両者を区別することは不可能であった。Bredbergは遠心性神経の選択的切断実験により、求心性の神経終末は小型であり、大型の神経終末は遠心性のものが多

察

いと報告し^{4)~8)}、high nerve endingについては、小型ではあるが全て遠心性終末と述べている⁶⁾。このhigh nerve endingについては、TEMによっても遠心性終末としての特徴を備えていることが判っている⁶⁾。神経終末の毛細胞下極への接続様式は蝸牛の回転により異なる。基底回転では外毛細胞の蝸牛軸側面でも毛細胞下極端より数 μm の部に集中していた。第2回転ではhigh nerve endingが現われる他は基底回転と同様であったが、第3回転より上部では毛細胞下極の周囲に分布していた。この上位回転における終末の分布部位はTEMによっても確認されている¹⁹⁾。

耳毒性物質の蝸牛毛細胞および神経系への影響に関しては数多くの研究がなされている。初期の報告では、アミノ配糖体系抗生物質は毛細胞とともに、支配神経にも変性障害を来たす(Riskaer²³⁾)との説と、逆に神経変性は認められないとする説(Ward and Fernandez(1961)²⁴⁾)とがあり議論の分かれるところであった。

しかし、その後の追試によると、コルチ器の完全破壊があっても蝸牛神経節細胞が一部残存しているという報告(Ylikoski(1974)²⁵⁾)や、骨ラセン板に神経線維が残存し、神経終末にも障害はみられないとの報告がみられる。

今回の実験では短期間にかなり大量のSM、KMを投与しているのであるが、コルチ器毛細胞の高度の変性障害は従来と同様の結果を得た。一方、神経終末および神経線維については全く異常を認めなかった。耳毒性薬物投与動物では、高濃度のこの物質を含む内リンパ液に毛細胞も神経終末も同じように露出している訳である。それにもかかわらず神経終末では障害がみられないという事実は、SM、KMの毒性に対して抵抗性のあることを示唆している。一方、神経終末にも障害がみられるという報告では²³⁾、SM、KMの投与後長期間生存した動物であり、この場合の変性は薬物による一次的な障害なのか、あるいは毛細胞の変性に引き続い

て起こった二次的な変化なのかの検討が必要と思われる。

SM, KM投与群でみられた外毛細胞の収縮像は基底回転で最も強く、上方回転では弱いか、全くみられなかった事実は、聴毛の障害パターンと非常によく一致している。また、細胞

体の収縮したものの数が聴毛の障害を来している細胞よりもはるかに多いということより、SM, KMによるコルチ器障害のSEM像における最も初期の変化は毛細胞の収縮である可能性を示している。

結 語

正常モルモット蝸牛の各回転における神経終末および、硫酸ストレプトマイシン、カナマイシン各投与による蝸牛の変化を走査電子顕微鏡で観察し、以下の如き知見を得た。

1. 正常動物の蝸牛基底回転では外毛細胞の神経終末は、ヌエル腔を含めた内リンパ腔に露出した状態で、毛細胞の基底部に付着しており、その大きさは $1.0\mu\text{m}$ から $3.5\mu\text{m}$ であった。

2. 基底回転において、1個の毛細胞に付着する神経終末は求心性、遠心性を含めて6個から12個であった。

3. 蝸牛の上方回転になるにつれて神経終末の大きさは次第に小さくなり、併せて1個の細胞に付着する神経終末の数も減少していた。頂回転での神経終末の大きさは $0.5\mu\text{m}$ から $2\mu\text{m}$ で、その数は4個から6個であった。

4. high nerve ending は第2回転からみられ、その形態は、ボタン状に丸いものと、ふくらみの全くないヒモ状の2種類があった。

5. 硫酸ストレプトマイシン、およびカナマイシンの投与による聴毛の変性障害は、従来の報告通り基底回転の第1列外毛細胞に強かった。また、薬剤による最初の変化は細胞体の収縮と考えられた。

6. 神経終末や神経線維には、これらの薬剤による変性を認めなかった。

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導、御校閲をいただいた恩師原田康夫教授に深謝致します。また、本研究に御協力をいただいた広島大学耳鼻咽喉科学教室員一同に感謝の意を表します。

なお、本研究は文部省の奨学金によって行なわれた。

本論文の要旨は第29, 30回日本基礎耳科学会、および第82回日本耳鼻咽喉科学会総会において発表した。

文 例

OHC: 外毛細胞

DC: Deiter's 細胞

NE: 神経終末

HN: high nerve ending

OSB: outer spiral bundle

RTF: radiating tunnel fiber

OHC 1: 第1列外毛細胞

OHC 2: 第2列外毛細胞

参 考 文 献

- 1) Engström, H. and Wersäll, J.: Structure of the organ of Corti. Acta Otolaryngol. 43: 1~10, 1953.
- 2) Lundquist, P.G. and Wersäll, J.: Scanning electron microscope studies on the inner

ear: A discussion on labyrinthine pathology. SEM in cell biology and medicine, ed. by Tanaka, K. and Fujita, T., Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 379~389, 1981.

- 3) Lim, D. J. : Three dimensional observation of the inner ear with the scanning electron microscope. *Acta Otolaryngol. suppl.* 255, 1969.
- 4) Bredberg, G. : Innervation of the organ of Corti as revealed in the scanning electron microscope. *Psychophysics and physiology of hearing*, ed. by Evans, E. F. and Wilson, J. P., Academic Press, London : 3~13, 1977.
- 5) Bredberg, G. : The innervation of the organ of Corti. A scanning electron microscopic study. *Acta Otolaryngol.* 83 : 71~78, 1977.
- 6) Bredberg, G. : Further studies on the innervation of the organ of the organ of Corti : small efferent nerve endings on the outer hair cell. *Inner ear biology*, ed. by Portmann, M. and Aran, J.M., INSERM 68 : 61~66, 1977.
- 7) Bredberg, G. : Scanning electron microscopy of the nerves within the organ of Corti. *Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 217 : 321~330, 1977.
- 8) Bredberg, G. : SEM studies of Corti's organ with special reference to its innervation. *SEM in cell biology and medicine*, ed. by Tanaka, K. and Fujita, T. *Excerpta Medica*, Amsterdam-Oxford-Princeton, 403~413, 1981.
- 9) Mangape, D. and Harada, Y. : Scanning electron microscopy of the nerve endings of the outer hair cells in the organ of Corti. *Journal of laryngology and Otology* 96 : 591~597, 1982.
- 10) Rasmussen, G.L. : The olivary peduncle and the other fibers projections of the superior olivary complex. *J. Comp. Neurol.* 84 : 141~219, 1946.
- 11) Engström, H. : On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol.* 49 : 109~118, 1958.
- 12) Spoendlin, H. H. and Gacek, R. R. : Electron microscopic study of the efferent and afferent innervations of the organ of Corti in the cat. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 72 : 660~686, 1963.
- 13) Spoendlin, H. : Innervation patterns in the organ of Corti of the cat. *Acta Otolaryngol.* 67 : 239~254, 1969.
- 14) Spoendlin, H. : Innervation densities of the cochlea. *Acta Otolaryngol.* 73 : 235~248, 1972.
- 15) Spoendlin, H. : The innervation of the cochlear receptor. *Basic mechanism in hearing*, ed. by Møller, A. R. and Boston, P., Academic Press, London, 185~234, 1972.
- 16) Lorento de No, R. : Some unresolved problems concerning the cochlear nerve. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85 : suppl. 34 : 1~28, 1976.
- 17) Lorento de No, R. : The neural mechanism of hearing. I. Anatomy and physiology. *Laryngoscope* 47 : 373~377, 1937.
- 18) Harada, Y., Hirakawa, K. and Mangape, D. : Scanning electron microscopy of the nerve endings of Corti's organ. *Scanning Electron microscopy*, SEM Inc., AMF O'Hare (Chicago), 183~188, 1983.
- 19) Takasaka, T. et al. : High voltage electron microscopic study of the inner ear. Technique and preliminary results. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 92, suppl. 101, 1983.
- 20) Morrison, D., Schindler, R. A. and Wersäll, J. : A quantitative analysis of the afferent innervation of the organ of Corti in guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 79 : 11~23, 1975.
- 21) Engström, B. : Scanning electron microscopy of the inner structure of the organ of Corti and its neural pathways. *Acta Otolaryngol. suppl.* 319 : 57~66, 1974.
- 22) Smith, C. A. and Sjöstrand, F. S. : Structure of nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J. Ultrastructure Research* 5 : 523~556, 1961.
- 23) Riskaer, N. et al. : The ototoxicity of some neomycin. *Acta Otolaryngol.* 46 : 137~152,

- 1956.
- 24) Ward, P. H. and Fernandez, C. : The ototoxicity of kanamycin in guinea pigs. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 70 : 132~142, 1961.
- 25) Ylikosky, J., Wersäll, J. and Björkroth, B. : Degeneration of neural elements in the co-

chlea of the guinea pig after damage to the organ of Corti by ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol. suppl.* 326, 1974.

（ 原稿到着：昭和58年10月17日 急載
別刷請求先：ドミンクス・マンガベ
〒734 広島市南区霞1丁目2の3
広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 ）