ウシガエル平衡斑の走査電顕的観察及び その面積と感覚細胞数について

藪 田 良 三

A Study of the Three Dimensional Structure, Surface Area, and Hair Cell Population of the Vestibular Maculae in the Bullfrog

Ryozo Yabuta

(Hiroshima University)

The three dimensional structure of the vestibular maculae in the bullfrog was observed with a scanning electron microscope (SEM), and these surface areas were measured with a digitizer on SEM micrograph used computer. The hair cell population of three maculae was obtained by counting each hair cell on the micrographs. The results were as follows.

1. The hair bundles were classified into three types in the utricle and the lagena and two types in the saccule.

2. The mean value of the surface area was 0.34 mm^2 in the utricular macula and 0.24 mm^2 in the saccular macula.

The hair cell population was 9946 in the utricular macula, 2583 in the saccular macula, and 3610 in the lagenar macula.

3. The hair cell density of the utricle was three times as high as the saccule.

は じ め に

内耳前庭に関する形態学的研究は、1885年 Retzius¹⁾ により光学顕微鏡を用いてなされて以来、各種脊椎動物の内耳前庭の特徴ある所見が報告されている。1950年代後、Wersäll²⁾, Engström³⁾, らが透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて感覚細胞を観察し、I 型、II 型の細胞がある事を発見した。その後、1960年代に入り、走査型電子顕微鏡 (SEM) の出現により前庭感覚上皮の立体的観察が可能となり、Lim⁴⁾⁵⁾, Rosenhall⁶⁾, 原田^{7)~10)} らによって幾多の新知見がもたらされた。

ウシガエル内耳の SEM による観察は、Hillman & Lewis¹⁾, 原田⁷⁾¹²⁾, Lewis & Nemanic¹³⁾, 篠崎¹⁴⁾ らによってなされているが、ヒト、モルモットなどに比べると報告は少ない。今回著者はウシガエル平衡斑を SEM を用いて観察し、その表面積を測定するとともに、感覚細胞数をかぞえ、他の動物と比較検討したので、ここにその結果を若干の考察を加えて報告する。

実験材料及び方法

本実験には、体長約 8.5 cm～13.5 cm 大の健康な成熟ウシガエル数十匹を用いた。これを断頭後、直ちに膜迷路を取り出し、Frog リンゲル液にて洗浄し、2% グルタルアルデヒド、1% オスミウム酸で2重固定を行ない、固定後試料を通常のアルコール上昇系列にて脱水した。その後アルコールを酢酸イソアミルにより置換し、液化二酸化炭素による臨界点乾燥を行なった。この乾燥試料に、金のスパッター蒸着を施し、JSM T-200 型 SEM を用いて観察した。これら試料を弱拡大(100～150倍)で写

真撮影後、得られた写真を4ツ切り大に引き延ばし、更にそれらを基にして、digitizer を用いて computer Spoutias GP 200 にて面積を測定した。各々の試料につき5回測定し、その平均値を各試料の面積値とした。又、写真上で感覚細胞を一つずつ count し、各平衡斑の感覚細胞数を求め、2回の平均値を各々の試料の感覚細胞数とした。尚 lagenar macula は円弧状に彎曲しており、平面上での面積測定は誤差が大きいため、その面積値を求めることができなかった。

観 察 結 果

ウシガエル膜迷路は、図1の如くで、哺乳類と異なり、第3の耳石器と呼ばれる lagena が存在し、卵形嚢、球形嚢と併せて3つの耳石器官と前、後の垂直半規管と外側半規管より成っている。卵形嚢は pars superior に、球形嚢、

lagena は pars inferior に属している。耳石器の中で、感覚細胞の存在する部分は、平衡斑と呼ばれ、耳石、耳石膜、感覚毛、感覚細胞、神経という基本構造をもっている。正常頭位に対して、卵形嚢斑は水平位に、球形嚢斑と lag-

A, H, P : ampullae of the anterior
horizontal and posterior
semicircular canals.

L : Lagena

S : Sacculus

U : Utriculus

図1 Left Labyrinth of the frog

enar macula はほぼ垂直位に位置している。

1. 平衡斑と感覚毛束

ウシガエル卵形囊斑は、長径約 $800\ \mu\text{m}$ 、短径約 $400\ \mu\text{m}$ の腎臓に似た形をしていた(写真1)。感覚毛束を眺めると、kinocilium が stereocilia の約3倍の長さをしたものの、kino

写真1 卵形囊斑感覚上皮

写真2 卵形囊斑感覚毛

- ← Kinocilium が stereocilia の約3倍の長さをしている
- ← stereocilia が全体的に短くて数も少ない
- ◆ Kinocilium の先端が bulb 状を呈している

cilium の先端が bulb 状を呈しているもの、あるいは stereocilia が全体的に短くて、その数も少ないものなど、概ね3つの type に分類することができた(写真2)。

球形囊斑は長径約 $500\ \mu\text{m}$ 、短径約 $400\ \mu\text{m}$ のハートに似た形をしていた(写真3)。球形囊斑の多くの感覚細胞においては、kinocilium の先端が bulb 状を呈しており、kinocilium と stereocilia の長さにはほとんど差がなく、卵形囊斑にみられるような長い kinocilium を持った感覚毛束はみられなかった。又ところどころに、細胞表面が小さく、stereocilia が全体的に短い感覚毛束を持った感覚細胞がみられた(写真4)。このように球形囊斑では感覚毛束には、2つの type がみられた。

lagenar macula は長径約 $400\ \mu\text{m}$ 、短径約

写真3 球形囊斑感覚上皮

写真4 球形囊斑感覚毛

- ← Kinocilium の先端が bulb 状を呈している
- ← stereocilia が全体的に短く細胞表面も小さい

写真5 lagenar macula 感覚上皮

写真6 lagenar macula の感覚毛

- ← stereocilia が全体的に短い感覚毛束
- ← Kinocilium が長い感覚毛束
- ← Kinocilium の先端が bulb 状を呈している striola (St) には stereocilia の長い感覚毛束が多くみられる

200 μm の長方形を呈し、円弧状に少し彎曲していた (写真5)。感覚毛束は卵形囊斑感覚細胞にみられたように, kinocilium の長いもの, あるいは kinocilium の先端が bulb 状を呈しているもの, stereocilia が全体的に短いものなど3つの type に分類することができた (写真6)。また卵形囊斑, lagenar macula の striola には stereocilia の長い感覚細胞が多くみられた。

2. 平衡斑面積と感覚細胞数

各平衡斑を SEM で観察後, その中で感覚細胞が区別されやすく, しかも感覚毛束の欠損の少ないものを選び面積を測定するとともに, 感覚細胞数を求めた (写真7)。卵形囊では8個, 球形囊では9個, lagena では2個の試料を

写真7

← digitizer を用いて平衡斑の面積を測定

表 I
Surface areas and sensory cell
calculations of macula utriculi

Specimen (gr, cm)	Surface area (mm^2)	Total number of cells
1(100, 9.0)	0.370067	9800
2(180, 13.0)	0.355939	10080
3(200, 13.5)	0.375067	9800
4(200, 13.0)	0.323237	—
5(150, 10.5)	0.362796	10600
6(160, 12.5)	0.324274	—
7(150, 11.0)	0.326015	9450
8(130, 10.0)	0.248047	—

えることができた。

卵形囊斑面積は最小値約 0.25 mm^2 , 最大値約 0.38 mm^2 で, 感覚細胞数は最小値 9450, 最大値 10600 であった (表 I)。

球形囊斑ではその表面積は, 最小値約 0.19 mm^2 , 最大値約 0.27 mm^2 で, 感覚細胞数は最

表 II
Surface areas and sensory cell
calculations of macula sacculi

Specimen (gr, cm)	Surface area (mm ²)	Total number of cells
1(130,10.0)	0.245216	2311
2(90, 8.5)	0.194896	—
3(160,10.5)	0.254768	—
4(150,10.0)	0.249424	2395
5(180,11.0)	0.245634	—
6(150,10.5)	0.249134	2766
7(160,10.5)	0.258978	2683
8(180,11.5)	0.229818	—
9(150,11.0)	0.272475	2763

小値2311, 最大値2766であった (表II)。

lagenar macula の感覚細胞数は試料が少な

表 III

Sensory cell calculations of macula lagenae

Specimen (gr, cm)	Total number of cells
1(180,11.5)	3680
2(150,11.0)	3540
Mean value	3610

かったが, 平均 3610 であった(表II)。lagenar macula の感覚細胞は試料が少なかったが, 平均 3610 であった (表III)。

以上の各試料よりえられた結果を平均して, ウシガエル 平衡斑面積と感覚細胞数を求めると, 卵形囊斑が最も大きく, 感覚細胞数も多かった。lagenar macula はその長径, 短径より考えて, 球形囊斑面積より小さかったが, 感覚細胞数は球形囊斑よりも多かった (表IV)。

表IV Surface areas and sensory cell populations of the maculae of the Bullfrog

	Surface area mm ² (mean value)	Total number of cells (mean value)
Saccular macula	0.24	2583
Utricular macula	0.34	9946
Lagenar macula	—	3610

考 案

ヒト, モルモットなどの哺乳類の耳石器官は卵形囊, 球形囊だけであるが, 哺乳類以外の脊椎動物では lagena が存在する。これら耳石器官は重力, 直線加速度, 遠心力を感受し, 中枢機構の関与により, 身体の姿勢の保持や, 運動を円滑にするのに役立っている。しかし鳥類の lagena は, 哺乳類の蝸牛と同様に前庭階, 鼓室階, 中央階をもつ基部と, 耳石を持った斑部に分けられ, 発生学的には耳石器官というよりコルチ器に属している¹⁵⁾。

ウシガエル卵形囊斑はハート形をしており, 球形囊斑は腎臓形をしていて, lagenar macula は長方形をしている。ヒト, モルモットの卵形囊斑は貝殻状を, 球形囊斑はL字形を呈してい

る¹⁰⁾。鳥類のハトでは, 卵形囊斑は楕円形に, 球形囊斑はL字形に似た形をし, lagenar macula は半円形に近い三日月形をしている⁶⁾。このように動物の種類によって平衡斑の形は, それぞれ違っているが, 同一種類でも魚類のように硬骨魚類と軟骨魚類で平衡斑の形が随分違うものもある¹⁶⁾。

平衡斑には, 感覚上皮が末梢のものと比べ線状にやや異なった部分があり, Werner¹⁷⁾ はこれを striola と名付けた。卵形囊斑上の striola では, 感覚細胞の kinocilium が striola の方に向かって位置し, 球形囊斑上では striola を境として kinocilium が平衡斑縁の方に向かうように位置している。このように striola を境と

して細胞の極性は異なっている。ウシガエルの lagena では魚類、鳥類と同様に、球形嚢と同じ極性をしていた。また哺乳類の striola には、I 型細胞が多く、しかも感覚細胞が粗である事²⁾、あるいは組織学的にコハク酸脱水素酵素の活性が強い事⁸⁾、耳中毒性薬物による障害もこの部分から起こってくる事¹⁹⁾など、多くの興味ある知見が報告されている。ウシガエルもトノサマガエル同様に²⁰⁾、striola では stereocilia の長い感覚毛束を持った感覚細胞が多くみられた。

ところで、平衡斑感覚細胞にはフラスコ型で、その周囲を求心性神経の神経終末で囲まれた I 型細胞と、円柱形でその周囲を求心性、遠心性神経終末がボタン状に付着している、II 型細胞の 2 種類の感覚細胞が存在している。発生学的には II 型細胞の方が古く、I 型細胞がより分化しているといわれているが、その機能の違いについては、現在のところわかっていない。これらの特徴的な所見を持った I 型、II 型細胞をその表面上から区別すると、I 型細胞の方が細胞表面は大きいという報告があるものの¹⁰⁾、区別は難しく、TEM²⁾ や切断法による SEM の観察²¹⁾によって、その区別がなされている。ウシガエルなどの両棲類や魚類では、II 型細胞のみ存在するとされているが²²⁾、各平衡斑の感覚細胞の感覚細毛束の形態は均一ではなく、kinocilium あるいは stereocilia の状態によって、卵形嚢斑、lagenar macula では 3 つの type に、球形嚢斑では 2 つの type に分類することができた。しかも、球形嚢斑の感覚毛束は、卵形嚢斑、lagenar macula と違い、ほとんどすべての kinocilium の先端が bulb 状を呈し、しかも stereocilia の最長のものと、その長さが違わなかった。Hillman²³⁾はこれら bulb 状の部分で、kinocilium は耳石膜と強く connect しているのだと報告している。しかし、トノサマガエルにおいては、球形嚢斑耳石膜に開孔している小孔に、感覚毛束が陥入しているのをすでに報告したが²⁰⁾、感覚毛束と耳石膜と

の connect は、それほど強いものとは思われない所見が得られた。Lewis²⁴⁾ は、これらウシガエルの感覚毛束を、6 つの type に細かく分類し、その分布状態を詳しく調べている。そして、カエルの聴器である両棲類乳頭、基底乳頭の感覚毛束は、stereocilia、kinocilium が全体的に短く、卵形嚢斑、lagenar macula の感覚毛束よりどちらかといえば、球形嚢斑感覚毛束に似た形態であると報告している。又、星野は²⁵⁾ ²⁶⁾、Lewis と同じく感覚毛束の違いによりカワヤツメの平衡斑感覚毛束を 2 つの type に、キンギョ平衡斑感覚毛束を 3 つの type に分類している。一方ヒトをはじめとした哺乳類や、あるいは鳥類などの平衡斑感覚毛束には、それほど違いがない。このように II 型細胞しか存在しないといわれている両棲類、魚類において、type の違う感覚毛束を持つ感覚細胞は異なった機能を営んでいるのか、あるいは Lewis²⁷⁾ のように単なる発達段階の差であるのかまだ不明である。そして、トノサマガエルやウシガエルの卵形嚢斑、lagenar macula の striola に、stereocilia の長い感覚細胞が多いこと、哺乳類においては striola に I 型細胞が多くみられること²⁾の事実を考え併せると、これら stereocilia の長い細胞が、I 型細胞類似の働きをしているのではないかと推察される。又星野²⁶⁾らもこれら感覚毛束の違いは、単なる発達段階の違いというより、それぞれの感覚毛束の被刺激性の違い、あるいは機能の違いによるものではないかと推察している。

平衡斑の面積、感覚細胞数は、その形と同様、動物によって種々異なっており、今までにも、各種動物において、Rosenhall⁶⁾²⁸⁾、Igarashi²⁰⁾、Lindeman³⁰⁾、綿貫³¹⁾らによって報告されている。しかし、ウシガエルについては、未だその報告をみていない。従来の報告は、いわゆる surface preparation 法²⁸⁾~³¹⁾により、光学顕微鏡下で各平衡斑を数十の視野に分け、それぞれの写真を合成し測定したものである。ところが今回の実験では SEM で観察後、写真を

表V Surface areas and hair cell populations of the utricular and the saccular maculae in human and in animals

	Surface area (mm ²)		Hair cell populations	
	Utriclar macula	Saccular macula	Utriclar macula	Saccular macula
*Human	4.29	2.44	33100	18800
**Squirrel Monkey	1.313	0.955	11360	9867
***Guinea Pig	0.541	0.495	9260	7560
*Pigeon	1.29	0.46	25200	7200
Bullfrog	0.34	0.24	9946	2583

from *Rosenhall, **Igarashi and ***Lindeman

表VI Sensory cell densities in humans and in animals
(Density : number of cells per mm²)

	Utriclar macula	Saccular macula
*Human	7716	7705
**Human	8603	7233
***Squirrel monkey	8652	10332
****Guinea Pig	17116	15273
*Pigeon	19535	15652
Bullfrog	29253	10763

from *Rosenhall, **Watanuki, ***Igarashi and ****Lindeman

引き延ばし、測定したため渡銀染色法に比べ、誤差が少なく、しかも簡単に測定することができた。手技的には、本実験の如く平衡斑に感覚細胞の defect が少なく、しかも、一つ一つの感覚細胞を、明瞭に区別できるだけの試料を作成するのに、やや困難な点もあった。しかし、従来の方法においても macula 全体を試料に供するのが難しく、感覚細胞と支持細胞の区別が付きにくいなどの難しさもあり、手技的には、ほぼ同等と思われた。

ウシガエルも含めて、今まで報告のあった^{6), 28)~30)} 各種動物の球形囊斑、卵形囊斑面積とその感覚細胞数を眺めると、卵形囊斑面積は球形囊斑面積より常に大きく、又、感覚細胞数も多かった (表V)。しかし、動物の大きさと、平衡斑の大小とは関係がないようであった。Retzius⁶⁾はヒト蝸牛の感覚細胞数は、15500 で、ネ

コは12300であったと報告している。このように蝸牛においては、高等、下等の哺乳動物の感覚細胞数はあまり差がないのに、平衡斑では感覚細胞数に差が大きいのは、恐らくヒトが4ツ足から2本足へと進化し、平衡斑に入る情報量が多くなったため、感覚細胞数も多くなったのではないかと綿貫³¹⁾は推察している。

更に、各種動物の平衡斑 1mm² あたりの感覚細胞密度を求めてみると、表VIの如く、ウシガエル以外では、卵形囊斑と球形囊斑の感覚細胞密度はほぼ等しかった。しかし、ウシガエルでは、卵形囊斑の感覚細胞密度は、球形囊斑の約3倍であった。

このように、ウシガエル球形囊斑と卵形囊斑とでは、その感覚毛束の type や、感覚細胞密度など、他の動物ではみられない違いがあったが、その生理学的意義は不明である。

ま と め

ウシガエル平衡斑を SEM で観察し、その面積と、感覚細胞数を測定し、次の結果を得た。

1. ウシガエル卵形囊斑, lagenar macula の感覚細胞の感覚毛束は3つの type に、球形囊斑では2つの type に分類することができた。

2. ウシガエル卵形囊斑面積は、約 0.34 mm^2 で感覚細胞数は9946, 球形囊斑面積は約 0.24 mm^2 で感覚細胞数は2583, lagenar macula は一番小さく、その感覚細胞数は3610であった。

3. 文献上、ヒト、サル、モルモット、ハトでは、卵形囊斑と球形囊斑の感覚細胞密度はほぼ等しかったが、ウシガエルでは卵形囊斑の感覚細胞密度は、球形囊斑の約3倍であった。

本論文の要旨の一部は第31回日本基礎耳科学会において発表した。

文 献

- 1) Retzius G: Das Gehörorgan der Wirbelthiere, 1885.
- 2) 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 Otolaryngol* (Stockh) Suppl **126**: 1~85, 1956.
- 3) Engström H: On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol* (Stockh) **49**: 109~118, 1958.
- 4) Lim DJ and Lane WC: Vestibular sensory epithelia. *Arch Otolaryngol* **90**: 283~292, 1969.
- 5) Lim DJ: Vestibular sensory organ. *Arch Otolaryngol* **94**: 69~76, 1971.
- 6) Rosenhall U: Some morphological principles of the vestibular maculae in birds. *Arch Ohr Nas Kehlkopfheilk* **197**: 154~182, 1970.
- 7) 原田康夫: 半規管膨大部の生体観察並びに走査電顕による観察. *日耳鼻* **74**: 1036~1039, 1971.
- 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. *耳鼻臨床* **64**: 201~211, 1971.
- 9) 原田康夫: 走査電顕による前庭器表面構造の研究. *耳鼻臨床* **65**: 1335~1346, 1972.
- 10) 原田康夫: 中耳・内耳走査電顕アトラス. 金原出版, 東京, 1980.
- 11) Hillman DE and Lewis ER: Morphological basis for mechanical linkage in otolithic receptortransduction in the frog. *Science* **174**: 416~419, 1971.
- 12) Harada Y: In vivo and scanning electron microscopic observations of semicircular canal ampullare. *Equilibrium Res Suppl* **1**: 81~87, 1971.
- 13) Lewis ER and Nemanic P: Scanning electron microscope observation of saccular ultrastructure in the mudpuppy (*Necturus maculosus*). *Z Zellforsch* **123**: 441~457, 1972.
- 14) 篠崎直子, 他: カエル内耳感覚上皮の走査電顕的研究. *日耳鼻* **80**: 1~10, 1977.
- 15) 平山方哉: 鶏胚内耳における聴神経終末の発生学的研究. *耳鼻臨床* **63**: 173~192, 1970.
- 16) Popper AN: Scanning electron microscopic study of the otolithic organs in the bichir (polypterus bichir) and shovel-nose sturgeon (scaphirynchus platyrhynchus). *J Comp Neurol* **181**: 117~128, 1978.
- 17) Werner CF: Die Differenzierung der Maculae im insbesondere bei Säugetieren. *Ztschr f Anat u Entwicklungsgesch* **99**: 696~709, 1933.
- 18) 鈴木政昭: 感覚細胞の障害度と前庭反応. *Equilibrium Res* **31**: 119~120, 1972.
- 19) 綿貫幸三, 他: 前庭耳石器のストレプトマイシン中毒における耳石および耳石膜の変化. *日耳鼻* **75**: 539~545, 1972.
- 20) 藪田良三, 他: カエル前庭細胞の走査電子顕微鏡学的観察. *Equilibrium Res* **42**: 1~8, 1973.
- 21) 藪田良三: 前庭感覚細胞の割断法による走査電顕的観察. *耳鼻臨床* **74**: 2013~2021, 1981.
- 22) Wersäll J, Flock Å and Lundquist PG: Structural basis for directional sensitivity in cochlear

- and vestibular sensory receptors. Sympos Quant Biol **30** : 115~132, 1965.
- 23) Hillman DE : Observations on morphological features and mechanical properties of the peripheral vestibular receptor system in the frog. Brain Res **83** : 69~75, 1972.
- 24) Lewis ER and Li CW : Hair cell types and distribution in the otolithic and auditory organs of the bullfrog. Brain Res **83** : 35~50, 1975.
- 25) 星野知之, 児玉 章 : 平衡斑における形のことなる感覚毛束. 内耳生化 **7** : 14~15, 1974.
- 26) 星野知之, 松本健次 : 平衡斑感覚毛束の2つのタイプについて. 内耳生化 **7** : 51~59, 1974.
- 27) Lewis ER and Li CW : Evidence concerning the morphogenesis of saccular receptors in the bullfrog (*Rana catesbeiana*). J Morph **139** : 351~361, 1973.
- 28) Rosenhall U : Vestibular macular mapping in man. Ann Otol **81** : 339~351, 1972.
- 29) Igarashi M, Watanuki K, Miyata H, et al : Vestibular end-organ mapping in squirrel monkey. Arch Klin Exp Ohr Nas Kehlkopfheilk **211** : 153~161, 1975.
- 30) Lindeman HH : Studies on the morphology of the sensory regions of the vestibular apparatus. Adv Anat Embry Cell Biol **42** : 1~113, 1969.
- 31) Watanuki K and Schuknecht HF : A morphological study of human vestibular sensory epithelia. Arch Otolaryngol **102** : 583~588, 1976.

(別刷請求先: 藪田 良三
〒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)