研 究

コルチ器有毛細胞および
支持細胞の細胞内微細立体構造

酒井 利忠

Intracellular Structure of the Hair
Cells and the Supporting Cells of the
Organ of Corti in the Guinea Pig
—Three Dimensional Observation by
Scanning Electron Microscope—

Toshitada Sakai

(Hiroshima University)

The freeze fracturing technique followed by maceration with 0.1% OsO₄ solution (Osmium-DMSO-Osmeium <O-D-O> method) was used to prepare specimens for scanning electron microscopy.

Among the cell organelles, the endoplasmic reticulum (ER) of the outer hair cell showed the most characteristic features, such as Hensen's body and subsurface cisterna. The subsurface cisterna which formed a specific network covered the inner surface of the outer hair cell membrane. Hensen's body consisted of cisterna, tubular ER and mitochondria all of which aggregated at the upper part of the outer hair cell.

The inner hair cell was almost the same shape as the outer hair cell, but the characteristic structure of the ER in the outer hair cell was not observed.

Among the supporting cells, the pillar cell, Deiter's cell and Hensen's cell which faced the Corti's lymph had well-developed tubular ER, while Claudius' cell had poorly developed tubular ER.

The O-D-O method employed in this study is the most feasible for scrutinizing intracellular structures of the outer hair cells.

Key words : organ of Corti, guinea pig, scanning electron microscope, cochlea

緒 言

コルチ器は聴覚の感受にあずかる微細な器官であり、感覚細胞としての内、外有毛細胞と数種の支持細胞により構成されている。これらのうち、音の受容に直接関与する内外有毛細胞には、求心、遠心の2種の神経終末が付着していることが知られている。このコルチ器に関しての形態学的研究は光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡（以下、TEMと略す）、走査型電子顕微鏡（以下、SEM

と略す)を用いて成されており、特にその内部微細構造に関しては、Engström ら (1953)¹⁾のTEMによる観察以降、詳細な報告がすでに行なわれている。しかしながらTEMによる観察では、細胞内小器官の立体構造や、神経の立体的な走行等について追求することは極めて困難を伴う。一方、三次元構造の観察が可能なSEMが医生物学へ応用されるようになり、コルチ器もその観察対象として、多くの報告が成されてきた (Lim, 1969²⁾, Bredberg, 1977³⁾, Mangape and Harada, 1982⁴⁾)。しかし、これまでは、その表面立体構造の観察のみであり、細胞内部構造は得られていない。しかしながら、近年のSEMの高分解能化と試料作製技術の進歩は、微細な細胞内小器官の立体的観察をも可能とした。今回著者は、Osmium-Dimethyl sulfoxide (DMSO)-Osmium 法⁵⁾ (以下、O-D-O法と略す)を応用し、コルチ器細胞の内部構造、および神経終末の構造をSEMで立体的に観察し、幾つかの所見を得たので報告する。

実験材料および実験方法

実験動物には、体重250~350gのプライエル反射正常なハートレー系モルモットを使用した。

試料作製は、田中らのO-D-O法⁵⁾に従って行った。まず、動物をネブタール麻酔下に、0.5%パラホルムアルデヒド、0.5%グルタルアルデヒド等量混液 (0.1Mリン酸緩衝液加) にて、心腔内より灌流固定した。次に、側頭骨を採取した後、実体顕微鏡下に正円窓膜およびアブミ骨を除去し、マイクロピペットを用いて蝸牛内を局所灌流した。同液にて30分から2時

間固定し、引き続き、1%OsO₄溶液で30分間固定をし、この後、25%DMSO、次いで、50%DMSOに浸漬させ液体窒素中にて蝸牛を凍結切断した。切断試料を0.1%OsO₄溶液で60~100時間組織浸軟を行った後、再び1%OsO₄にて固定、上昇エタノール系により脱水し、酢酸イソアミルに浸漬後、臨界点乾燥 (CO₂) し、白金スパッタコーティングを行った。

なお、観察にはHITACHI S-800形走査型電子顕微鏡を用いた。

結

a) 外有毛細胞

細胞の長軸に平行な面で切断された試料では、細胞頂部から下部にかけてその内部立体構造の観察が可能であった。外有毛細胞の核は、すでに報告されている様に、細胞の下方に偏在していた。また細胞内小器官は、細胞体上部および核下部に集中し、細胞体中央部では細胞側壁に偏在し、細胞の軸 (中心部) に相当する部では疎であった (図1a)。一方、切断の方向が細胞長軸に対し垂直である場合には、有毛細胞をはじめとして、周囲の支持細胞の内部構造を上方より観察することも可能であった (図1b)。

外有毛細胞の頂部には、聴毛が規則正しい配列をしているが、今回の試料作製によって、聴

果

毛が蓋板部の細胞膜より移行している部分を捉えることが出来た。蓋板の裏面、すなわち細胞質面には、直径0.10~0.12μmの小孔が開き、聴毛へと連続している像が得られた。本来、蓋板部には聴毛の rootlet が入り込んでいることがTEMで観察されている⁶⁾が、今回用いた組織浸軟法では、細胞質の膜構造以外のものが浸軟除去される為、蓋板部は空洞として観察された (図2a)。蓋板下部には細胞内小器官が集中しており、以下、これらの小器官の立体構造について示す。ミトコンドリアの多くは、直径0.4μmの球状あるいは長楕円体で、長径の長いものの多くには、くびれや屈曲がみられた。また、この部では、滑面小胞体の発達は良好で、その形態と細胞内での存在部位には特徴が

みられた。すなわち、滑面小胞体は径 $0.1\mu\text{m}$ の小管状のものが、極めて密に連結した扁平なネットワークを形成し、これが4~6層に重層した厚さ約 $0.4\mu\text{m}$ の層が、外有毛細胞壁に沿って、あたかも細胞膜内面を覆うかの様に存在していた(図2b)。また、蓋板直下部には、滑面小胞体の嚢状の部分を中心としてその周囲を網状構造をした小管状の滑面小胞体を取り囲み、更にその外周にミトコンドリアが配列している、Hensen's body が観察された(図2c, d)。

外有毛細胞中部では、細胞内小器官が乏しく、少数のミトコンドリアが有毛細胞側壁近傍に偏在しているのみであった。この部でも、細胞上部と同様に、網状構造の小管状滑面小胞体が数層重なり、細胞内面を覆っていた。ミトコンドリアは $0.4\sim 0.5\mu\text{m}$ の径を有する球状のものや、長さ $1.5\mu\text{m}$ 程の長桿状のものが混在していた(図3)。

細胞下部には核が存在し、細胞内の大部分を占めていた。核下部には細胞内小器官が比較的豊富で、ミトコンドリア、滑面小胞体が混在していたが、細胞膜内面に層状構造を呈する滑面小胞体の層は認められなかった。また、この部では細胞膜外部に神経終末の付着しているのが観察された(図4)。

b) 内有毛細胞

内有毛細胞では、外有毛細胞に比べ、細胞内で核の占める割合が大きく、核は細胞中央に位置していた。細胞内小器官の分布は外有毛細胞ほどの特徴はないが、蓋板下部への集積が認められた(図5a)。

細胞頂部では、外有毛細胞と同様に、聴毛が規則正しく配列し、蓋板部の細胞膜に移行し、聴毛の基部では、直径 $0.10\sim 0.12\mu\text{m}$ の小孔が開いていた。蓋板部は組織浸軟により空洞として観察された(図5b)。蓋板下部にはミトコンドリア、滑面小胞体が集積していた。ミトコンドリアは径 $0.4\mu\text{m}$ の球状~橢円体のものが多くを占め、外有毛細胞でみられた様な長桿状

のものは殆ど認められなかった(図5c)。

内有毛細胞中部では、核周囲は比較的疎で、細胞膜近傍にミトコンドリア、滑面小胞体が偏在していた。外有毛細胞にみられたような滑面小胞体の網状の重層構造は認められず、径 $0.1\mu\text{m}$ の小管状のものが比較的疎なネットワークを形成し、ミトコンドリアと混在していた(図5d)。

細胞下部は、細胞内小器官に乏しく、細胞中部と同様、細胞膜近傍への偏在が認められた(図5e)。

c) 神経終末

今回の観察では、種々の断面において、神経終末の内部立体構造、および終末の外有毛細胞への付着様式が立体的に得られた。終末の大きさは種々であり、小型のものでは直径が約 $0.6\mu\text{m}$ 、大型のものは約 $2\mu\text{m}$ で、その外部形態も、半球状、長楕円体と様々であった。終末内の構造物では、ミトコンドリアがよく観察された。ミトコンドリアは径 $0.6\sim 1.2\mu\text{m}$ 、球形~長楕円体と大きさ、形状は様々であり、内部のクリスタは、層板状であった。求心、遠心終末の区別を可能とする、外有毛細胞側の synaptic vesicle 等、他の微細な構造物については、今回、良好な観察ができなかった(図6)。

一方、神経終末の外有毛細胞への付着様式については、切断操作中に有毛細胞が脱落したものでよく観察された。ここでは、有毛細胞を支えているダイテルス細胞の凹面が残り、同時に、脱落した有毛細胞下部に付着していたと考えられる数個の神経終末が露出していた。終末の大きさは種々であり、各々は一部で重なり合っているものの、有毛細胞に接する面では、すべての終末の凹面が連続して一つの曲面を形成していた(図7)。

d) 支持細胞

(i) 柱細胞

柱細胞は内外2種の細胞でコルチトンネルの内側および外側壁を形成している。柱細胞で

は、有毛細胞の様な小胞体、ミトコンドリアの細胞内での偏在は認められなかった。内外柱細胞とも、細胞内部の大部分は小胞体であり、小管状の滑面小胞体が分岐、連続し網状構造を呈していた。外柱細胞では、小胞体の嚢状の部分が多く存在したが、内柱細胞では殆ど認められなかった。ミトコンドリアは径 $0.3\sim0.4\mu\text{m}$ のほぼ球状の形態を呈していた(図8)。

(ii)ダイテルス細胞

網状膜の部では、小管状の滑面小胞体が比較的疎にネットワークを形成しており、一部では有窓状の構造も認められた。ミトコンドリアは殆ど認められなかった。Bulgeの部でも小管状の滑面小胞体がネットワークを構成していた。ミトコンドリアは径 $0.4\mu\text{m}$ のほぼ球状の形態をしていたが、その数は少なかった(図

9)。

(iii)ヘンゼン細胞

滑面小胞体は、ダイテルス細胞と同様、小管状のものが、分岐、連続し、ネットワークを形成していた。ミトコンドリアは、径 $0.4\mu\text{m}$ の球状あるいは長桿状のものが存在し、ダイテルス細胞に比し、数は多く認められた(図10)。

(iv)クラウジウス細胞

クラウジウス細胞では、細胞内小器官の密度は低く、小管状の滑面小胞体が疎なネットワークを形成していた。核の大多数は細胞上部に位置し、核上部では、核下部に比し滑面小胞体のネットワークの密度がやや増大していた。ミトコンドリアは径 $0.4\sim0.8\mu\text{m}$ と大小様々であったが、形状はほぼ球形、一部で長桿状のものもみられた(図11)。

考

案

従来、SEMによるコルチ器の観察は細胞表面構造をみたものが殆どである。一方、種々の断面法による観察も試みられてきたが、SEMによる細胞内部の観察は困難であった⁷⁾。また、コルチ器の神経終末の観察も、試料作製の困難さの為、Bredberg³⁾、Engström⁸⁾、Hara-da⁹⁾、マンガベ¹⁰⁾などの報告をみるのみである。また、コルチ器の神経終末付着様式をTEMで観察し再構築した報告もSmith and Sjöstrand¹¹⁾、Takasaka⁶⁾によるものなど小数がみられるに過ぎない。今回用いたO-D-O法は、細胞内部の立体的観察という利点を持った手法であり、コルチ器の観察にも有用な方法と思われる。

本法により、コルチ器の細胞内小器官では、滑面小胞体の立体構造に特異な点が見出せた。今までのTEMによる観察で、外有毛細胞蓋膜直下には滑面小胞体とミトコンドリアの集合による特徴的な構造物が、Hensen's bodyとして報告されている¹²⁾¹³⁾。今回の観察において、嚢状の小胞体を中心とした小管状滑面小胞体、およびミトコンドリアの集合したHensen's

bodyの立体構造を観察できた。また、外有毛細胞膜内面に数層重なって存在する滑面小胞体は、subsurface cisternaとしてTEMでも観察されているが、今回の観察で、これが極めて密なネットワークを形成し、細胞膜内面全面を覆っているのが認められた。この構造は、その形態から、神経線維における軸索周囲の髄鞘に相当する役割を果しているものとも推測されている¹⁴⁾。これら外有毛細胞内の上部、下部そして細胞壁内側にみられる複雑な層構造を呈する滑面小胞体は、細胞上部で受容した聴覚刺激を細胞下端に付着する神経終末に伝える為のより高度な機能を反映しているようにも思える。

内有毛細胞では、滑面小胞体、ミトコンドリアが蓋板下部および細胞膜近傍へ偏在するなど、基本的には外有毛細胞と同様な細胞内構造を認める。しかしながら、外有毛細胞にみられたHensen's bodyやsubsurface cisternaの様な特徴的な構造は認められなかった。内外有毛細胞はその神経支配に差があり¹⁵⁾、細胞の形態的相異も、音の感受における役割の違いを反映しているものと思われるが、これについては

生理, 形態の両面より, さらに検討されなければならない。

支持細胞では, コルチリンパに接する柱細胞, ダイテルス細胞, ヘンゼン細胞と, コルチリンパに接しないクラウジウス細胞との間に大きな差が認められた。前者は細胞内小器官が豊富であったが, 後者では乏しく, 滑面小胞体のネットワークの発達も不良で, この差はコルチ器有毛細胞周囲での代謝量の相異によるものかもしれない。柱細胞およびダイテルス細胞は, TEMで微細管を豊富に含んでいることが観察されている¹⁴⁾が, 今回は, 試料作製の過程で浸軟除去されるため観察することが出来なかった。

細胞内小器官の立体構造についての報告は, 今回と同様, O-D-O法を用いて示したものがすでにある。これらの報告では観察対象が, 心筋⁵⁾, 精管¹⁶⁾, 前庭器¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾ など, コルチ器以外の器官の細胞であるが, 細胞内小器官は, 小胞体のネットワーク, ミトコンドリアの種々の形態など, 基本的には, コルチ器における今回の観察とはほぼ同様な構造を示している。

結 語

正常モルモットコルチ器を, Osmium-DMSO-Osmium 法により作製した切断標本で観察した。本法により, 走査型電子顕微鏡を用い, 細胞表面のみならず細胞内面の観察が可能となり, 有毛細胞内の小器官の立体構造や, 神経終末の付着様式を立体的に明らかにすることができ, 本法は, 今後, 種々の病態の観察にも有用なものと思われた。

稿を終えるにあたり, 御指導ならびに御校閲をいただいた恩師原田康夫教授に深く感謝致します。また, 本研究に際し, 絶えず御指導と御助言をいただいた田頭宣治講師ならびに当教員各位に深謝致します。

本研究の一部は, 第11回日本耳鼻咽喉科学会中国地方部会および第30回日本オージオロジー学会において発表した。

文 献

- 1) Engström H and Wersäll J: Structure of the organ of Corti. Acta Otolaryngol 43: 1~10, 1953.
- 2) Lim DJ: Three dimensional observation of the inner ear with the scanning electron microscope. Acta Otolaryngol Suppl 255, 1969.
- 3) Bredberg G: Innervation of the organ of Corti. A scanning electron microscopic study. Acta Otolaryngol 83: 71~78, 1977.
- 4) Mangape D and Harada Y: Scanning electron microscopy of the nerve endings of

神経終末の形態については, すでにTEMによって観察され, 多くの報告がなされている¹¹⁾¹²⁾¹⁵⁾²⁰⁾。外有毛細胞に付着する神経終末には, 遠心性, 求心性の2種があり, その解剖学的特徴も述べられている。求心性終末は, 径は0.5~1 μm と遠心性終末に比べ小型で, 内部にはミトコンドリアおよび少量の小胞などを有し, これに面する外有毛細胞内には, synaptic bar, synaptic ball 等の特徴的な構造が認められるという。これに対し, 遠心性終末は, 径が1.8~3.5 μm と大型で, ミトコンドリアや多数の小胞を有し, 有毛細胞側には synaptic cisterna を認める。また, 外有毛細胞側壁に付着する小型の遠心性終末も知られている⁹⁾¹⁰⁾²¹⁾。今回の観察では, これら両者を区別する特徴的な構造物は観察できなかったが, 原田¹⁹⁾はすでに, モルモットおよびカエルの前庭器で, 遠心性, 求心性終末をO-D-O法を用いSEMにより区別して観察しており, 今後, コルチ器においても同様に, 本法を用いた神経終末の形態学的観察が可能なものと思われる。

- the outer hair cells in the organ of Corti. *Jarnal of Otolaryngology and Otology* 96 : 591~597, 1982.
- 5) Tanaka K and Naguro T : High resolution scanning electron microscopy of cell organelles by a new specimen preparation method. *Biochemical Res* 2 suppl : 63~70, 1981.
- 6) 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.
- 7) Lim DJ : Scanning electron microscopic observation on non-mechanically cryofractured biological tissue. *Scanning electron microscopy /II TRI/* : 257~264, 1971.
- 8) Engström H and Engström B : A survey of the cyto-architecture of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol* 83 : 65~70, 1977.
- 9) 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'Hara (Chicago)*, 183~188, 1983.
- 10) Dominggus Mangape : コルチ器の外有毛細胞神経終末に関する研究—SEMによる観察—. *耳鼻臨床* 77 : 429~439, 1984.
- 11) Smith CA and Sjöstrand FS : Structure of nerve endings on the external hair cells of the guinea pig cochlea as studied by serial sections. *J Ultrastruct Res* 5 : 523~556, 1961.
- 12) Spoendlin HH : Ultrastructural features of the organ of Corti in normal and acoustically stimulated animals. *Ann Otol* 71 : 657~677, 1962.
- 13) Lim DJ and Flock A : Ultrastructural morphology of enzyme-dissociated sensory cells. *Acta Otolaryngol* 99 : 478~492, 1985.
- 14) 中井義明 : 蝸牛の微細構造. *Audiology* 14 : 543~565, 1971.
- 15) Smith AC and Rasmussen GL : Recent observation on the olivo-cochlear bundle. *Ann Otol* 72 : 489~506, 1963.
- 16) Inoue T : The continuity of endoplasmic reticulum in rat spermatids by scanning electron microscopy. *J Electron Microsc* 31 : 261~263, 1982.
- 17) 原田康夫 : 前庭器の形態、機能と病態. 新潟, 西村書店, 56~66, 1984.
- 18) Harada Y, et al : Three-dimensional structure of the vestibular sensory epithelia. *Acta Otolaryngol* 99 : 411~418, 1985.
- 19) 田頭宣治, 他 : カエル前庭神経節の微細立体構造. *耳鼻臨床* 78 : 2469~2478, 1985.
- 20) Engström H : On the double innervation of the sensory epithelia of the inner ear. *Acta Otolaryngol* 49 : 109~118, 1958.
- 21) Bredberg G : Further studies on the innervation of the organ of Corti : small efferent nerve endings on the outer hair cell. *Inner ear biology. ed. by Portmann M and Aran JM., INSERM* 68 : 61~66, 1977.

原稿到着 : 昭和60年9月20日 急載
別刷請求先 : 酒井利忠
〒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

図1 a) コルチ器断面

図1 b) 網状膜が除去され、細胞上部の内部構造が、露出している。1～3：第1～3列外有毛細胞

図2 外有毛細胞上部

a) 外有毛細胞蓋板部。組織の浸軟除去により、蓋板部は空洞として観察される。蓋板細胞質面では聴毛の基部に一致して、直径0.10～0.12μmの小孔が開き、聴毛に移行している。

図2 b) 蓋板下部にミトコンドリア、滑面小胞体などの細胞内小器官が集中している。蓋板部は浸軟除去され、空洞化している。

図2 c)

図2 d)

Hensen's body. 網状構造の滑面小胞体周辺にミトコンドリアが配列している。
C：聴毛，CP：蓋板，sER：滑面小胞体，M：ミトコンドリア

図3 外有毛細胞中部

- a) 細胞内小器官は細胞膜近傍に偏在している。ミトコンドリアの形態は、球形、長桿状のくびれたものなど種々である。

- 図3 b) a図の拡大。種々の形態のミトコンドリアが認められ、滑面小胞体は網目状構造を呈し(星印)、切断部では細胞膜内面に層状構造を形成しているのがわかる(矢印)。

図4 外有毛細胞下部

- a) 核が大部分を占め、核下部には細胞内小器官が集中している。

図4 b) 外有毛細胞に付着する神経終末

- OHC: 外有毛細胞,
N: 外有毛細胞核,
E: 神経終末,
D: ダイテルス細胞

図5 内毛細胞

a) 核は細胞中央に位置し、細胞内小器官は核上部に集積して、他の部は比較的疎である。

CT: コルチトンネル,

IPC: 内柱細胞,

IHC: 内毛細胞

b) 内毛細胞蓋板部。組織浸軟により、蓋板部は空洞となっている。聴毛基部の細胞膜には $0.10\sim0.12\mu\text{m}$ の小孔が開き、聴毛へ移行している。

C: 聴毛,

CP: 蓋板

c) 内毛細胞下部。径 $0.4\mu\text{m}$ のほぼ球状をしたミトコンドリアが、小管状の滑面小胞体とともに集積している。

CP: 蓋板, M: ミトコンドリア,

sER: 滑面小胞体

d)

e)

d, e) 内毛細胞中部および下部。核周囲は比較的疎で、細胞内小器官は細胞膜近傍に偏在している。

N: 内毛細胞核,

IPC: 内柱細胞,

IHC: 内毛細胞

図6 外有毛細胞神経終末,
ダイテルス細胞切断像

a) ダイテルス細胞が切断され, 外有毛細胞下端に付着する神経終末が観察できる (矢印).

図6 b) a図の拡大. 大小の終末がみられ, 内部には層板状のクリスタを有すミトコンドリアが観察される.

OHC: 外有毛細胞

D: ダイテルス細胞

図7 外有毛細胞神経終末

a) 外有毛細胞が脱落し, 神経終末が露出している (矢印).

図7 b) a図の拡大. 外有毛細胞との接触面は凹状に弯曲している.

OHC3: 第3列外有毛細胞

D1, 2: 第1, 2列外有毛細胞を支持するダイテルス細胞

図8 柱細胞 a) コルチトンネル断面

図8 c) 内柱細胞内部構造。外柱細胞と同様な滑面小胞体のネットワークが認められる。 OPC: 外柱細胞, IPC: 内柱細胞, IHC: 内毛細胞, CT: コルチトンネル, M: ミトコンドリア

図9 b) a図の強拡大像。一部で有窓状の部分も認められる (矢印)。

図8 b) 外柱細胞内部構造。小管状の滑面小胞体がネットワークを形成している。所々に囊状の部分も認められる (矢印)。

図9 ダイテルス細胞

a) 網状膜部。滑面小胞体は疎なネットワークを形成している。

図9 c) Bulge 部。網状膜部に比べ、滑面小胞体のネットワークは密度が増大している。 OHC: 外有毛細胞, D: ダイテルス細胞

図10 ヘンゼン細胞
a) ヘンゼン細胞切断面

図10 b) a図の強拡大像。滑面小胞体のネットワークの中に種々の形態のミトコンドリアが混在している。
N: ヘンゼン細胞核
M: ミトコンドリア

図11 クラウジウス細胞
a) クラウジウス細胞切断面。核の大部分は細胞上部に位置している。細胞内小器官は極めて少ない。

図11 b) a図の強拡大像。疎な滑面小胞体と共に、種々の形態のミトコンドリアが存在する。
N: 核
M: ミトコンドリア