研 究

蓋膜 imprint の深さの測定

— 3次元形状解析装置による観察 —

川端五十鈴・八木 昌人・多持隆一郎*

Depth of Imprint on the Tectorial Membrane

— Studies Using by 3 Dimensional Measurement System —

Isuzu Kawabata and Masato Yagi

(Saitama Medical Center, Saitama Medical School)

Ryuichiro Tamochi

(Hitachi Instrument Engineering Co. Ltd.)

This study estimated the depth of imprint on the tectorial membrane using a new three dimensional measurement system. The tectorial membrane covers the surface of the organ of Corti. The tips of the sensory cell hairs are firmly embedded in the undersurface of the tectorial membrane. Scanning electron microscopic findings show the existence of small holes (hair imprint) made by tips of sensory hairs.

Since the sensory cells of the organ of Corti are believed to be stimulated by bending the sensory hair, it is interesting to determine the depth of imprint. The three dimensional measuring system used in the present studies, was recently developed and can measure the surface structure of a material. The principles of the system are described.

According to this system, the depth of imprint varies but average values are from 0.02 to 0.03 μm . The bird's-eye view of the imprints obtained by this system are also shown. The findings are briefly discussed.

Key words: imprint tectorial membrane, imprint depth, scanning electron microscopy

はじめに

蓋膜はラセン器の表面を覆い、有毛細胞の聴毛の先端は蓋膜に陥入している。この部位を走査電顕で観察すると、聴毛の先端が陥入して生じた小孔が存在し、聴毛の imprint と呼ばれて

いる^{1)~5)}。

このように聴毛の先端と蓋膜とは強く結合しており、基底板の上下の振動により、聴毛はたわみを生じ、これが有毛細胞の興奮を生じるものとされている⁴⁾⁶⁾。したがって聴毛の先端が

どのくらい蓋膜表面に食い込んでいるか, すなわち imprint の深さはどのくらいかを知るかは重要なことである.

imprint の深さは透過電顕の超薄切片よりの計測^{6)~8)}, あるいは走査電顕のステレオ・ペアー写真よりの測定などで行なわれてきた⁹⁾.

最近, 走査電顕の反射電子信号を用いて, 試料表面の凹凸像を 3 次元解析し, その深度を測定する方法が開発された¹⁰⁾. 私共はこの方法を蓋膜の imprint の深度測定に応用したところ, 2~3 の興味ある所見が得られたので, その所見を供覧すると共に若干の考察を加えて報告する.

研究材料と研究方法

研究材料はブライエル反射正常の白色モルモット (体重 250~300 g) の内耳蓋膜を用いた. ネンブタール麻酔後, 断頭し, 迷路骨包を摘出した. 迷路骨包を開放し, 正門窓膜より 2.5% グルタルアルデヒド (リン酸緩衝液) を注入し, 内耳還流固定を行なった. さらにオスミウム酸とタンニン酸で後固定を行なった後, 試料は通常の走査電顕試料作成法にしたがって, エタノール脱水, アミールアセテート置換, 臨界点乾燥を行なった. 蓋膜は実体顕微鏡下に注意

深く摘出し, 試料台に貼布したあと, 金属蒸着を行ない, 走査電顕で観察した.

本研究に用いた日立製 RD-500 形 3 次元形状解析装置の構成図を図 1 に示す¹⁰⁾. 反射電子検出器により検出された試料表面からの反射電子信号はプリアンプ・メインアンプで増幅され, A/D 変換器によりデジタル信号に変換され,

図 2 3 次元計測のための反射電子の検出方法とその原理

図 1 RD-500 形 3 次元形状解析装置の構成図

その信号はフレームメモリーに格納される。

試料表面からの反射電子の検出は図2に示すように、4つの検出器、即ちアナニラー型4分割検出を用いた。試料表面から反射される反射電子の信号量は表面の形状にしたがって異なるものである。例えば図2の試料のP2より出る反射電子量は電子ビームに対する試料表面の角度により異なり、検出器Bより検出器Aの方が反射電子信号量が多い。したがって検出される信号はX、Y方向で図3のように2次元的な積分を行なって、高さ分布Z(P2)を求められる。

$$Z(P_1) = Z(P_0) + \int_{y_0}^{y_1} \frac{Cs - Ds}{Ss + Ds} dy$$

$$Z(P_2) = Z(P_1) + \int_{x_0}^{x_1} \frac{As - Bs}{As + Bs} dx$$

As : 検出器Aの反射電子信号

Bs : 検出器Bの反射電子信号

Cs : 検出器Cの反射電子信号

Ds : 検出器Dの反射電子信号

以上の如く、この4チャンネル反射電子信号を演算することにより、表面の凹凸の測定、高精度の鳥瞰図、画像上のあらゆる方向の断面プロフィールの計測が可能である。

今回、この3次元形状解析装置をモルモット内耳蓋膜にある聴毛のimprintの超微細形態な

らびに深さの測定に応用してみた。

結 果

1. 聴毛 imprint の深度の測定

RD-500 形 3 次元形状解析装置で測定した imprint の深さを示す。

1) W型中央部の imprint

代表例として蝸牛第2回転の外有毛細胞2例目の imprint の深さの測定値を示す。

図4-Aはimprintの中央部の8個をみたものであり、図4-Aの右上方のものはW形の中

図3 3次元計測のための演算方法

図4 imprintの深度の測定

A : W型の中央部 B : W型の中心部
C : W型の末梢部

中央部のもので、これと右端の1個を除いた6個について測定した。これらのimprintはほぼ一直線上にあり、これらの真上に引かれた緑色の線が測定線であり、その上にみられる黄色の線は緑色の線の断面プロファイルである。走査電顕像をみながら、赤丸1はimprintの孔底であり、青丸1はimprintの孔縁に相当する。したがって赤丸1と青丸1との差がこのimprintの深さであって、 $0.023\text{ }\mu\text{m}$ となる。同様にimprint 2, 3, 4, 5, 6の各々の深さは 0.039 , 0.016 , 0.062 , 0.013 , 0.030 であり、平均値は $0.031\text{ }\mu\text{m}$ である。

imprintの中央部はいわゆるW型の頂点でその配列は凹状となっている。そして走査電顕像でみると、imprintの深さが浅いように思われる。そこでこの部位のimprintの深さを測定してみた。図4-Bのimprint 1は $0.016\text{ }\mu\text{m}$ 、imprint 2は $0.030\text{ }\mu\text{m}$ で平均 $0.023\text{ }\mu\text{m}$ となり、前述の中央部のものに比べて少し浅いようである。

2) W型末梢部のimprint

W型末梢部のimprintの深さを測定した。代表例として蝸牛第2回転第2例のimprintの測定例を示す。図4-Cの如く6個のimprintについて、緑色の線の測定線上でみると、imprint 1, 2, 3, 4, 5, 6の深度は、 0.025 , 0.014 , 0.017 , 0.025 , 0.026 , 0.014 であり、平均値は $0.020\text{ }\mu\text{m}$ であった。

3) imprintの形状の測定

本装置は試料表面の凹凸の深度の測定のみでなく、その他の形状の分析も可能である。例えば図5に示すような孔で、左右の孔縁をA, B, 底部をCとすると、A(B)とC間の高さ Z_1-Z_2 は前述の深度に相当する。孔の半径は X_1-X_2 であり、B-Cは孔縁と孔底の距離Lを表わす。また孔縁Bと底部Cを結ぶ線と底面の交わる角度も測定できる。図4-Cで示したimprint 6個のそれぞれの形状測定値を表1に示した。

2. imprintの形状の3次元画像化

反射電子信号で得られたimprintの形状は、

3次元画像化が可能であるので、その代表例を示す。図6に示すものは蝸牛基底回転の第2列目のimprintである。図6-Aは通常の反射電子像である。図6-Bは画像処理を行なって、試料表面の凹凸を断面プロファイルを線で表わしたもので、imprintの凹凸の形態を表現したものである。さらにこの断面プロファイルを連続させて画像化したものが、図6-Cの鳥瞰図であり、imprintの形状がよくわかるようである。

そこで、imprintの深度の測定値と3次元画像化されたimprintの形状を比較してみた。図7は蝸牛第3回転の第2列のW型末梢部の7個

図5 陥凹部の形状測定法の模式図

表1 imprintの形状の測定値

図4-Cに示すimprint 6個についての半径(X_1-X_2)、深度(Z_1-Z_2)を示す(図5を参照のこと)。

imprint	X_1-X_2 (μm)	Z_1-Z_2 (μm)	L (μm)	角 度
1	0.134	0.025	0.136	10.359
2	0.143	0.014	0.144	5.768
3	0.130	0.017	0.131	7.595
4	0.216	0.025	0.218	6.466
5	0.195	0.026	0.196	7.595
6	0.151	0.014	0.152	5.440
最小値	0.130	0.014	0.131	5.440
最大値	0.216	0.026	0.218	10.359
平均値	0.162	0.020	0.168	7.204

の imprint である．図 7-A の反射電子像からも 3 番目と 7 番目の imprint の深度は浅いように思われる．測定値(図 7-B)でも 7 個の平均値は， $0.019\mu\text{m}$ であるにもかかわらず，3 番目は $0.010\mu\text{m}$ ，7 番目は $0.012\mu\text{m}$ であった．この imprint を 3 次元画像化した，いわゆる鳥瞰図を図 7-C に示した．この図からも imprint 3 と 7 の深さが他のものに比べて浅いことがよく表現されている．

考 察

モルモットの内耳蓋膜に存在する聴毛の imprint の深度を新しい 3 次元形状解析装置(日立製 RD-500 形)を用いて測定し，その結果を報告したので，2～3 の点について考察を試みたい．

1. imprint の測定機器について

走査電子顕微鏡は試料の表面を 3 次元的に立体視できるものである．これは表面の凹凸をエッジ効果により画面に濃淡をつけて表現するも

図 6 imprint の 3 次元画像

A : imprint の反射電子像 B : 断面プロフィール
C : 鳥瞰図

図 7 imprint の 3 次元形状解析の結果の比較

A : 反射電子像 B : 深度計測値 C : 鳥瞰図

のであって、真の3次元像ではない。そこで角度をかえて2つの方向から試料を撮影した、いわゆるステレオ写真をステレオ眼鏡で観察する方法が考案されている。そしてこれから試料表面の凹凸の深度を測定する方法も開発されている。また走査電顕による表面構造の深度測定法として鏡体内に2つの検出器を位置をかえておき、2次電子信号を同時に検出して、それぞれの信号量をコンピューターで演算させて深度を計算する方法が開発されている¹¹⁾。

今回私共が使用した方法は2次電子の代わりに試料表面より生じる反射電子信号を利用したものである。電子ビーム照射方向に対して、直角に同心円状に4つの反射電子検出器を配置してある(4分割アニューラー型)。試料表面から出る反射電子信号を4つの方向で検出し、各々検出器の信号量をコンピューターで演算することで、凹凸の深度を測定するものである。電子機器の進歩で試料表面の超微細な凹凸の測定も可能になったので¹⁰⁾、私共はこの方法で蓋膜のimprintの測定をしてみた。

2. 蓋膜のimprintについて

蓋膜はラセン器の表面上を覆うコラーゲン線維を主成分とした膜様の構造物であり⁶⁾⁸⁾、有毛細胞の聴毛の先端は蓋膜の表面と接触している。蝸牛の感覚細胞である有毛細胞が脱分極して興奮するのは聴毛が屈曲し、変位するのが契機となるとされている⁴⁾⁶⁾。すなわちアブミ骨より伝えられた音刺激は前庭窓を介して外リンパの移動を生じ、この移動はコルチ器の基底板を振動させる。基底板の振動は基底板の上に存在する有毛細胞、したがって聴毛も振動し、聴毛の先端と蓋膜との間の位置関係に変化を生じ、聴毛の屈曲が有毛細胞の興奮の引金となる。基底板の振動によって聴毛の先端が蓋膜にさらに接近し、聴毛が屈曲するためには聴毛の先端が蓋膜表面に単に接しているだけでなく、両者がもう少し強く接合していることが必要であろう。

聴毛先端と蓋膜表面との間の接合について従来から多くの研究が行なわれてきた。しかし蓋

膜は極めて微細で、人工産物を生じやすく、光顕レベルでの解明は困難であった。ついで透過電顕による蓋膜の観察が行なわれた。その中でKimura⁷⁾が、聴毛の先端と蓋膜の接着の状態を詳細に報告している。更に高坂¹²⁾は超高圧透過電顕を用いて、聴毛の先端が蓋膜に接する状態を報告している。一方、走査電顕による蓋膜の観察によると、聴毛の先端が蓋膜の表面に陥入してできたと思われる小孔がみられ、しかも聴毛と同様にW型の配列を示すので、聴毛のimprintと名付けられた^{1)~5)}。この所見は聴毛の先端は単に蓋膜表面に接しているのではなく、深く陥入して、強く結合していることを示す間接的な証拠であろう。

3. imprintの深さ

有毛細胞の聴毛の先端は蓋膜の表面に接するのではなく深く陥入していることが報告されているが、どのくらい深く陥入しているか、即ちimprintの深度はどのくらいかを知ることは興味あるところである。Kimura⁷⁾はリスザルの蓋膜で外有毛細胞の聴毛の陥入の深さは0.2~0.3 μm と述べている。高坂⁶⁾の報告では250~3000 nmまであり一定しなかったと述べている。

一方走査電顕によるimprintの深度の測定法として、前述のステレオ・ペアー写真による計測法があるが、高倍率写真の場合、誤差は多くなり、imprintの場合も同様に測定値にはばらつきがみられる⁹⁾。

今回、私共の反射電子信号を用いる測定法ではimprintの深さはいろいろであるが、W型の中央部、末梢部を問わず0.02~0.03 μm であり、従来の報告とほぼ一致するものであった。

4. imprintの深さの不一致

図7に蓋膜のimprintの反射電子像(図7-A)、その深度の測定値(図7-B)ならびに3次元画像(図7-C)の組合せを示した。図7-Aにみるimprintの深度は一定でなく、少なくとも反射電子像でみるかぎり、深度は浅いもの、深いもののいろいろである。今回使用した測定値と

比較すると、両者はほぼ一致し、深度の浅くみえるものは測定値も小さく、深度の深くみえるものは測定値でも大であった。さらに3次元画像化した鳥瞰図の場合も、前述の反射電子像、測定値とほぼ同じ結果であった。したがって本法はimprintの深さをある程度正しく表現しているものと思われる。したがって同一のW型のimprintの内でも深さは一定しないことを意味する。勿論、imprintに対応する聴毛そのものは観察していないので、聴毛の先端が不揃いであったかは不明であるが、imprintの深さの一定でない点など、imprintの超微細形態について今後、さらに検討を加えてみたい。

結 語

蝸牛有毛細胞の聴毛先端が陥入して生じた蓋膜表面の陥凹、imprintの形状について報告した。本研究に用いた試料は正常モルモットの蓋膜であり、研究方法は走査電頭の反射電子信号を利用した3次元形状解析装置(日立製RD-500形)である。

今回得られたimprintの深度は平均0.025 μm であり、今までに報告された測定値と比較検討した。また本装置で得られたimprintの3次元画像も同時に供覧した。

本論文の要旨は第2回日本耳科学会基礎学会で口演した。試料作成については青木志津子氏(埼玉医科大学総合医療センター共同利用研究室)、画像解析については小林由美氏(日立計測エンジニアリング株式会社)の御協力に深謝する。

文 献

- 1) Kosaka N, Tanaka T, Takiguchi T, et al : Observation on the organ of Corti with scanning electron microscope. *Acta Otolaryngol*

72 : 377~384, 1971.

- 2) Hoshino T : Relationship of the tectorial membrane to the organ of Corti. A scanning electron microscope study of rats and pigs. *Arch Histol Jpn* 37 : 25~39, 1974.
- 3) Ross DM : The tectorial membrane of the rat. *Am J Anat* 139 : 449~482, 1974.
- 4) Lim DJ : Fine morphology of the tectorial membrane. *Arch Otolaryngol* 96 : 199~215, 1972.
- 5) Kawabata I and Nomura Y : The imprints of the human tectorial membrane. *Acta Otolaryngol* 91 : 29~35, 1981.
- 6) 高坂知節 : 蝸牛の微細構造と音受容機構. *Otology Japan Suppl* 2, 1991.
- 7) Kimura RS : Hairs of the cochlea sensory cells and their attachment to the tectorial membrane. *Acta Otolaryngol* 61 : 55~72, 1966.
- 8) Iurato S : Organ of Corti. Submicroscopic structure of the inner ear (ed by Iurato S). pp 80~106, Pergamon Press, Oxford, 1967.
- 9) 川端五十鈴, 齊藤宏学 : 蓋膜のimprintについて. *Ear Res Jpn* 18 : 182~184, 1987.
- 10) 多持隆一郎, 大野輝昭 : 走査電子顕微鏡による三次元計測の応用例. *The Hitachi Technical data*. SEM No. 56, 日立製作所, 1992.
- 11) Suganuma T : Measurement of surface topography using SEM with two secondary electron detectors. *J Electron Microsc* 34 : 328~337, 1985.
- 12) 高坂知節 : 超高压電子顕微鏡による聴器の構造. *神経研究の進歩* 25 : 777~791, 1981.

(原稿受付: 平成5年3月26日

原稿採択: 平成5年4月30日

別刷請求先: 川端五十鈴

〒350 川越市鴨田辻道町1981

埼玉医科大学総合医療センター耳鼻咽喉科)