モルモットコルチ器の電顕酵素細胞化学的研究†

瀬口 春道・小林 俊博・岡田 暉彦

要 約

モルモット内耳コルチ器における Ca-ATPase の活性の局在を観察し, Mg-ATPase, Na-K-ATPase, ALPase の活性の局在と比較検討した。Ca-ATPase 活性の反応産物は有毛細胞の形質膜, 特に頂部, 感覚小毛, 基底部の形質膜にみられ, また神経終末の形質膜上にもみられた。内柱細胞および外柱細胞には全く反応産物は認められず, 指節細胞の内リンパに接する指節突起の形質膜にも反応は全く検出されなかった。内らせん溝上皮細胞, 境界細胞, ヘンゼン細胞, クラウディオウス細胞では内リンパ腔に面する形質膜に強い反応がみられた。Mg-ATPase 活性はほぼ Ca-ATPase と同様の局在を示すが, 指節突起の内リンパに接する形質膜にも反応がみられた。ALPase 活性はコルチ器内には全く反応は認められなかった。Na-K-ATPase 活性は有毛細胞の感覚小毛の形質膜にのみ認められた。Ca-ATPase 活性はコルチ器内に広く検出され, その機能に深く関与しているが, 特に有毛細胞の感覚小毛において Na-K-ATPase 活性の局在と一致することは聴覚受容の興奮発生機序に重要な役割を担っているものと考えられる。

目 的

コルチ器の構成細胞は一方では内リンパに, 他方は外リンパに接している。内リンパの Ca イオン濃度は蝸牛管では 3×10^{-8} M と, 10^{-8} M のレベルにある外リンパに比し低い¹⁾²⁾。一般に細胞内の Ca イオン濃度は 10^{-7} M のレベルにあるが, Ca は細胞にとって種々の重要な機能を担っていることが明らかにされている。Ca-ATPase は Ca イオンの移送に関与する酵素であり³⁾, 血管条⁴⁾ および前庭の卵形嚢, 球形嚢および半規管⁵⁾ における酵素活性の報告はみられるが, コルチ器に関する報告はない。聴覚受容機構およびコルチ器内外の Ca イオン環境の調節機構を明らかにするため, コルチ器における Ca-ATPase 活性の局在を観察し, Mg-ATPase, ALPase, Na-K-ATPase の活性局在と比較検討した。

方 法

白色モルモット (体重 300~400 g) を材料に用いた。ネンブタール麻酔下に心臓より 0.1 M カコジル酸緩衝 (pH 7.4) 2% グルタルアルデヒド液で灌流後, 側頭骨鼓室腔を開け, 蝸牛よりコルチ器を摘出し, さらに上記固定液で 1 時間浸漬固定した。Ca-ATPase 活性の検出は Ando らの方法⁶⁾ により, pH 9.4, 37°C で 10 分間行った。Mg-ATPase および ALPase の活性の検出は上記と同様の固定を行った後, Mg-ATPase 活性は Oga-wa と Mayahara の方法により⁷⁾, pH 9.4, 37°C で 15 分間, ALPase 活性は Mayahara らの方法により⁸⁾, pH 9.4, 37°C で 30 分間反応させた。Na-K-ATPase 活性の検出には, 固定液として 0.1 M カコジル酸緩衝 (pH 7.4) 2% バラホルムアルデヒド液を用い, Mayahara らの方法で pH 8.8, 37°C で 10 分間反応を行った⁹⁾。反応終了後, 0.1 M カコジル酸緩衝液で洗った後, 1% オスミウム酸で後固定し, 型の如く脱水, 包埋した, 超薄切片は酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で電子染色をほどこし, 観察した。

結 果

光顕では Ca-ATPase 活性の局在をしめす反応産物は, 蝸牛管の内リンパに接するコルチ器の表面に認められた。特に内らせん溝上皮細胞, ヘンゼン細胞, クラウディオウス細胞の内リンパに接する面に, また外有毛細胞, 内有毛細胞の神経終末部に強い Ca-ATPase 活性の反応産物が認められた。しかし内柱細胞, 外柱細胞には反応は認められなかった (図 1)。電顕的には, 外有毛細胞においては, その形質膜全周にわたり Ca-ATPase 活性の反応産物がみられたが, 内リンパに接する頂部形質膜 および 感覚小毛の形質膜 (図 4), また, 基底部の神経終末および指節細胞に接する形質膜上には特に強い反応が認められ (図 5), ヌエル腔および外トンネルに面する側面形質膜上の反応は弱い傾向があった。内有毛細胞においても外有毛細胞とほぼ同様の活性局在が観察されたが, 境界細胞と接する側面形質膜にも強い反応産物が認められた。コルチ器内にみられる神経要素に関しては, 内および外有毛細胞に向う神経線維の形質膜および有毛細胞に接する求心性, 遠心性シナプスともに, その全周に強い Ca-ATPase 活性が認められた (図 5)。

† Ultracytochemical study of Corti's organ in guinea pigs.

Harumichi Seguchi, Toshihiro Kobayashi and Teruhiko Okada
高知医科大学第 2 解剖学教室

- 図1 Ca-ATPase 活性の光顕像。内リンパに接するコルチ器の表面，内有毛細胞，外有毛細胞の神経終末部に反応産物が認められる。×320
- 図2 Mg-ATPase 活性の光顕像。Ca-ATPase とほぼ同様の所に反応産物が観察される。×320
- 図3 ALPase 活性の光顕像。外らせん血管の内皮細胞にのみ ALPase 活性の反応産物がみられ，コルチ器内には全く認められない。×320

外指節細胞では指節突起の内リンパに接する頂部形質膜を含め，反応が認められなかったが（図4），外指節細胞間のギャップ結合には反応産物が認められた（図6）。内らせん溝上皮細胞，クラウディウス細胞では，それぞれの細胞が接する面の形質膜上にも弱い反応がみられたが，ヘンゼン細胞ではそれが認められなかった（図7）。内柱および外柱細胞では，その全周において全く反応産物は認められなかった（図8）。

対照実験として，10 mM の EGTA または PCMB を反応浸漬液に加えた場合，Ca-ATPase の活性は阻害され，CaCl₂ ないし基質を反応浸漬液より除いた場合には，反応産物は検出されなかった（図9）。

Mg-ATPase 活性の局在では Ca-ATPase の場合とほぼ同様であったが（図2），外指節細胞の内リンパに接する指節突起頂部形質膜に弱い反応産物が観察される

ことと（図10），有毛細胞の側面形質膜直下の小胞体膜および核上部細胞質内のヘンゼン体を形成する小胞体膜にも弱い反応産物が認められることが Ca-ATPase の場合とは異っていた。これらの Mg-ATPase の反応は，反応浸漬液より基質の ATP を除いた場合，全く認められなかった。

ALPase 活性はコルチ器には全く認められず（図3，11），基板の鼓室階側に存在する外らせん血管の内皮細胞形質膜にのみ反応産物が観察された。

Na-K-ATPase 活性は，その部分反応である p-NPPase 活性の検出を行った。その酵素活性は内および外有毛細胞の感覚小毛形質膜にのみ認められた。反応産物は微細顆粒状として形質膜の細胞質側に観察された（図12）。この反応は 10 mM ウアバインにより阻害され，反応液より K イオンを除くと検出されなかった（図13）。

- 図4 Ca-ATPase 活性。有毛細胞の頂部，感覚小毛の形質膜上に反応産物が認められ，指節細胞の頂部形質膜には反応産物が認められない。 $\times 8,000$ スケール=1.0 μm
- 図5 Ca-ATPase 活性。有毛細胞の基底部形質膜，神経終末部および神経線維の形質膜に反応産物が観察される。 $\times 10,000$ スケール=1.0 μm
- 図6 Ca-ATPase 活性。指節細胞間のギャップ結合に反応産物がみられる。 $\times 30,000$ スケール=1.0 μm
- 図7 Ca-ATPase 活性。ヘンゼン細胞の頂部形質膜に反応産物が認められる。その他クラウディウス細胞，内らせん溝上皮細胞の頂部および側面形質膜にも反応産物がみられた。 $\times 3,000$ スケール=1.0 μm

考 察

Ca イオンの濃度は，細胞外液では 10^{-8} M であるのに，細胞質内では 10^{-7} M と著しく低く， 10^4 倍の濃度勾配が存在している。この濃度勾配に抗して，細胞内より外向性に Ca イオンを輸送する系として，Na-Ca 交換輸送系と Ca-ATPase が形質膜に存在するが， 10^{-7} M レベルの低い Ca イオン濃度生理的状态では Ca-ATP-

ase が Ca ポンプとして働くことが知られている³⁾。Ca-ATPase は分子量約 140,000 で Ca の存在下で，Ca により活性化され，ATP を分解する酵素で，ATP 1 分子の分解により 1 分子の Ca イオンが移送される³⁾。

コルチ器において Ca-ATPase の活性の局在は，その構成細胞により異っているが，一般的に内リンパに接する面に強く酵素活性がみられた。有毛細胞では内リンパ

図8 Ca-ATPase 活性。内柱細胞，外柱細胞には反応産物が認められない。
×4,000 スケール=1.0 μm

図9 Ca-ATPase 活性。対照実験では反応は全く検出されない。×7,200
スケール=1.0 μm

図10 Mg-ATPase 活性。Ca-ATPase の場合とほぼ同様の活性局在を示すが，指節細胞頂部形質膜にも反応産物が観察される。
×11,000 スケール=1.0 μm

図11 ALPase 活性。反応産物はコルチ器内には全く認められない。×5,500
スケール=1.0 μm

に接している頂部形質膜および感覚小毛の形質膜に Ca-ATPase の活性が観察された。また Na-K-ATPase の部分反応である p-NPPase 活性も感覚小毛の形質膜に認められた。内リンパの Ca イオン濃度は $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ という低い濃度であるが，有毛細胞の上記部位の形質膜には，結合部位が存在することが報告されている。有毛細胞の感覚小毛に機械的刺激がくわわり，興奮が発生する

機序に，Ca-ATPase，Na-K-ATPase および Ca 結合部位がこの部に存在すること¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾¹³⁾が，Ca，Na，K などのイオン移送に対するチャンネルとなり，興奮発生の機構に重要な役割を演じていることが容易に示唆される。

一方，柱細胞や指節細胞など，コルチ器の網状膜を形成する細胞群に Ca-ATPase 活性が存在しないことは，

図12 Na-K-ATPase 活性。有毛細胞の感覚小毛の形質膜にのみ反応産物が認められる。×20,000 スケール=1.0 μ m

図13 Na-K-ATPase 活性。反応は 10 mM ウェバインにより阻害される。×24,000 スケール=1.0 μ m

それらの細胞が有毛細胞の支持を主たる機能としていることから考え、非常に興味深い。内らせん溝上皮細胞、ヘンゼン細胞、クラウドゥス細胞は主として内リンパに接する面の形質膜内に Ca-ATPase は存在していることから、これらが内リンパおよびコルチ器内のコルチ液の Ca イオンの濃度の調整に直接関与しているとは考えられず、主としてそれぞれの細胞の内環境の維持に働いているものと思われる。

尚、本研究は厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班の研究費援助により行われたものである。

文 献

- 1) Bosher SK, Warren RL : Very low content of cochlear endolymph, an extracellular fluid. *Nature*, 273 : 377-378, 1978
- 2) Ninoyu O, Meyer zum Gottesberge AM : Ca^{++} activity in the endolymphatic space. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243 : 141-142, 1986
- 3) 板野俊文, 畠瀬 修, Pennistov JJ : 神経細胞膜の Ca^{2+} -ATPase, 蛋白質核酸酵素, 27 : 2386-2392, 1982
- 4) Yoshihara T, Igarashi M : Cytochemical localization of Ca^{++} -ATPase activity in the lateral cochlear wall of the guinea pig. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243 : 395-400, 1987
- 5) Yoshihara T, Igarashi M, Usami S, Kanda T : Cytochemical studies of Ca^{++} -ATPase activity in the vestibular epithelia of the guinea pig. *Arch. Otorhinolaryngol.* 243 : 417-423, 1987
- 6) Ando T, Fujimoto K, Mayahara H, Miyajima H, Ogawa K. : A new one-step method for the histochemistry and cytochemistry of Ca^{2+} -ATPase activity. *Acta Histochem. Cytochem.* 14 : 705-726, 1981
- 7) Ogawa K, Mayahara H : Intramitochondrial localization of adenosin triphosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 17 : 487-490, 1969
- 8) Mayahara H, Ogawa K : The effect of thickness of specimen on the ultrastructural localization of alkaline phosphatase activity in the rat proximal convoluted tubule. *J. Histochem. Cytochem.* 16 : 721-724, 1968
- 9) Mayahara H, Fujimoto K, Ando T, Ogawa K : A new one-step method for the cytochemical localization of ouabain-sensitive, potassium-dependent p-nitrophenylphosphatase activity. *Histochemistry* 677 : 125-138, 1980
- 10) Gilula NB, Satir P : The ciliary necklace. A ciliary membrane specialization. *J. Cell Biol.* 53 : 494-509, 1972
- 11) Moran DT, Rowley III JC, Asher DL : Calcium-binding sites on sensory processes in vestibular hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 : 3954-3958, 1981
- 12) Tachibana M, Morioka H, Machino M, Oshima

W, Mizukoshi F, Mizukoshi O, Yoshioka T : Localization of triphosphoinositide in the cochlea. An electron-microscopic immunocytochemical study. *Histochemistry* 81 : 157-160, 1984

- 13) Tachibana M, Morioka H, Machino M, Mizukoshi F, Mizukoshi O, Yoshioka T : Immunocytochemical detection of triphosphoinositide in vestibular hair cells. *Histochemistry* 82 : 197-199, 1985

Abstract

Ca-ATPase activity, which is involved in the transport of Ca ions, was demonstrated cytochemically in Corti's organs of guinea pig inner ears and compared with Mg-ATPase, Na-K-ATPase and ALPase activities. The reaction products of Ca-ATPase activity were observed on the plasma membranes of hair cells, especially in the apical portion and in the hairlets. Moreover, the precipitate was also found in the basal portion and in the plasma membrane of the nerve endings. Both inner and outer pillar cells were completely devoid of reaction precipitate, as were the surface plasma membranes of the phalanges of the phalangeal cells. In the epithelial cells of the

inner spiral sulcus, border cells, Hensen's cells and Claudius' cells, a strong reaction was observed in the surface plasma membrane facing the endolymphatic space. The location of Mg-ATPase activity was very similar to that of Ca-ATPase except that it was also found on the surface plasma membrane of the phalanges of the phalangeal cells facing the endolymph. ALPase activity was never observed in Corti's organ. Na-K-ATPase activity was detected only on the cytoplasmic side of the plasma membranes of the hairlets.

The co-existence of Ca-ATPase and Na-K-ATPase, especially in the hair cells, may be important for the exchange of Ca and Na ions that initiates the excitation of these acoustic receptors.

Key words: Organ of Corti, Ca-ATPase, enzyme cytochemistry

(原稿到着：昭和63年4月30日)
別刷請求先：瀬口春道
〒781-51 南国市岡豊町小蓮
高知医科大学第2解剖学教室)