内耳有毛細胞の運動性と細胞骨格†

山根 英雄¹⁾・中井 義明¹⁾・小西 一夫¹⁾
坂本 平守¹⁾・井口 広義¹⁾・中川 隆之¹⁾
森 中 耕介¹⁾・高橋 研一²⁾

はじめに

単離細胞の技法が内耳に応用され、蝸牛有毛細胞の運

動性が認められたことにより^{1)~3)}、その細胞骨格についての報告が、運動性という面から検討されているが⁴⁾⁵⁾、

図1 単離前庭感覚細胞

- A 数個の細胞集団に I 型感覚細胞 (矢印) が識別できる。
- B 膨化した感覚細胞。おそらく II 型感覚細胞と思われる。
- C I 型感覚細胞。傾いた蓋板に長い感覚毛が認められる。
- D 膨化した感覚細胞と遊離した感覚毛。(×600倍)

†Inner Ear Hair Cell Motility and Cytoskeleton

1) Hideo Yamane, Yoshiaki Nakai, Kazuo Konishi, Hiramori Sakamoto, Hiroyoshi Iguchi, Takayuki Nakagawa, Kousuke Morinaka and 2) Kenichi Takahashi

1) 大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室

2) 大阪市立大学医学部第一解剖学教室

今回われわれは、内耳有毛細胞の単離を試みると共に、In vitro 実験の手始めとして、有毛細胞の F-アクチンの存在について検討を行った。

実験方法

体重 250～350 g のハートレイ系モルモットを使用し、ネンブタール麻酔後、断頭にて側頭骨を採取した。Eagle MEM 中でラセン器および前庭感覚器を採取後、0.1 % コラゲナーゼにて細胞分離を行い、仔牛血清加 MEM 中にて有毛細胞の観察を行った。F-アクチン観察のためには有毛細胞をホルマリン固定後の 0.1 % Triton X-100 処理を行い、5 μ g/ml ロードミンファロイジンに 15 分間作用させた。観察は、位相差、ノマルスキー、および蛍光顕微鏡にて行った。

結果

同一操作を行ったにもかかわらず、前庭感覚器有毛細胞を正常形態で分離するのは難であり、ほとんどの細胞は、球状に変化しやすく、時間経過と共に、I 型、II 型感覚細胞の区別が難であった (図 1)。

蝸牛においては、外有毛細胞はかなりの割合でほぼ正常形態のものが得られた (図 2)。

ファロイジン染色を行った外有毛細胞では F-アクチ

ンの存在が感覚毛、蓋板、蓋板下部組織 (infracuticular network : ICN)、細胞側壁、細胞基底部に主として認められ、その形態も種々のものが存在した (図 3)。内有毛細胞では、感覚毛と蓋板にその存在を認め、前庭感覚細胞の一部には、さらに ICN も認められた (図 4)。

考察

今回の単離操作実験より、ダイテルス細胞とは接するものの、ヌエル氏腔に他細胞と離れて存在する外有毛細胞に比べ、周囲を支持細胞などの他細胞と接する内有毛細胞、前庭感覚細胞は、単離操作でその正常形態を維持しうることが示唆された。アクチン以外の他の細胞骨格については組織レベルで検討されているが⁽⁴⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾、単離細胞の形態との関係については不詳であり、現在検討中である。

外有毛細胞においてファロイジンに染色された F-アクチンが ICN として認められたが、ICN の解釈について判然としない。Throne ら⁸⁾ はモルモットにおいて ICN の存在を 2～4 回転の主として 2～3 列の外有毛細胞に認めている。また、音響外傷で観察される同様の構造物の質、量との差については深く言及していないまでも、細胞の収縮については、これら蓋板下部のアクチ

図 2 単離された外有毛細胞

- A 頂回転外有毛細胞 (位相差顕微鏡写真)
 - B 第 3 回転外有毛細胞 (ノマルスキー顕微鏡写真)
 - C 第 1 回転外有毛細胞 (ノマルスキー顕微鏡写真)
- ($\times 450$ 倍)

図3 ファロイジン染色された各回転外有毛細胞
A—Dはそれぞれ第1—第4回転を示す。感覚毛の存在が認識しにくい
ものや、様々な ICN の存在様式が認められる。(×450倍)

ンの重合が関係していると結論している。

一方 Slepecky ら⁸⁾ は使用する抗体により外有毛細胞のアクチンの染色態度が異なり、抗平滑筋アクチンやファロイジンは感覚毛、蓋板、細胞壁のほか細胞質をも染めるが、抗非平滑筋アクチンは細胞質を染めず、抗骨格筋アクチンでは蝸牛は染まらなると報告している。

また、この ICN の機能についても主として病態、細胞骨格、細胞運動などの面から種々検討されているが⁴⁾⁵⁾⁷⁾⁸⁾、ICN が存在するということは、少なくとも細

胞内に細胞運動には不可欠な F-アクチンが存在することであり、細胞運動のための必要条件を満たしていると考えられる。

Throne ら⁸⁾ のグルタル固定によるファロイジン染色では蝸牛基底回転には ICN が欠如するのに対し、Slepecky⁵⁾ は細胞内蛋白を凍結操作で不動化し、細胞内水分をアルコールで置換することにより、ICN としてではなく、細胞質にび慢性に存在する F-アクチンを蝸牛上方回転のみならず、我々と同様に、基底回転にも認めて

図4 ファロイジン染色された2個の前庭上皮感覚毛の下部に少量のICN(矢印)が存在する感覚細胞が認められる。(×600倍)

いる。すなわち、ICNは細胞正常構造物ではなく、化学固定を含め、種々の条件下で細胞膜の透過性が変化し、細胞外イオンが細胞内に流入したため、微細なF-アクチンが中央に凝集した障害細胞を示すと考案している。すなわち、固定操作の不適にしろ、*in vivo*での細胞の病態にしろ、その細胞はファロイジン染色時にはすでに障害を受けていたことを意味する。このことは前述のICNの機能をも含め、その出現背景となる原因を充分説明できるように思われる。

今回の我々の検討のみならず、現在のところ内毛細胞の細胞質内に、F-アクチンの存在は報告されていないが、単離内毛細胞にSlepecky⁵⁾の用いた細胞固定法を応用し、内毛細胞の運動性についても今後さらに検討する必要がある。

一方、Valatら⁹⁾の報告と違い、前庭感覚細胞にICNを認めたことは、細胞運動のための必要条件である細胞内F-アクチンの存在を示すものであり、その運動性に関しては今後の検討が必要である。

結 語

モルモットの内耳有毛細胞を機械的および酵素を用いて単離し、細胞内F-アクチンの存在から、その細胞運動について検討を行った。その結果、

1. 内毛細胞、前庭感覚細胞(とくにII型感覚細胞)は、外毛細胞に比べ、単離操作でその正常形態を維持しにくい傾向が認められた。
2. 外毛細胞のF-アクチンは種々の形のICNとして認められ、ICNが、細胞内F-アクチンの一表現形で

あることが推察された。

3. 内毛細胞の細胞質にはF-アクチンの存在を認めなかったが、細胞固定法などの手技の改良で今後の検討の必要がある。
4. 前庭感覚細胞にICNの存在を認めたことは、細胞質のF-アクチンの存在を示唆するものであり、同細胞の運動性に対しても今後検討の必要がある。

謝 辞

本研究の一部は、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なわれたものである。

文 献

- 1) Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, et al : Evoked mechanical response of isolated cochlear hair cells. *Science* 227 : 194-196, 1985
- 2) Zenner HP, Zimmermann U, Schmidt U : Reversible contraction of isolated mammalian cochlear hair cells. *Hear Res* 18 : 127-133, 1985
- 3) Zajic G, Schacht J : Comparison of isolated outer hair cells from five mammalian species. *Hear Res* 26 : 249-256, 1987
- 4) Slepecky N, Ulfendahl M, Flock A : Effect of caffeine and tetracaine on outer hair cell shortening suggest intercellular calcium involvement. *Hear Res* 32 : 11-22, 1988
- 5) Slepecky N : Cytoplasmic actin and outer hair cell motility. *Cell Tissue Res* 257 : 69-75, 1989
- 6) Steyger PS, Furness DN, Hackney CM, et al : Tubulin and microtubules in cochlear hair cells : Comparative immunocytochemistry and ultrastructure. *Hear Res* 42 : 1-16, 1989
- 7) Sobin A, Flock A : Immunohistochemical identification of actin and fibrin in vestibular hair cells in the normal guinea pig and strain of the waltzing guinea pig. *Acta Otolaryngol* 96 : 407-412, 1983
- 8) Throne PR, Carlisle L, Zajic G, et al : Difference in the distribution of F-actin outer hair cells along the organ of Corti. *Hear Res* 30 : 253-266, 1987
- 9) Valat J, Devau G, Dulon D, et al : Vestibular hair cells isolated guinea pig labyrinth. *Hear Res* 40 : 255-260, 1989

Abstract

Inner ear hair cells of the guinea pig were isolated mechanically and enzymatically, and their motility and the presence of F-actin in the cytoplasm were investigated.

1. Inner hair cells and vestibular hair cells tended to lose their cell body shape during the isolating procedure more than did outer hair cells.
2. In outer hair cells F-actin was demonstrated as the infracuticular network (ICN), indicating that ICN is one expression of the presence of F-actin.
3. Further studies by other methods are needed to determine whether inner hair cells have F-actin in their cytoplasm.

4. The existence of ICN in the vestibular hair cells shows that F-actin is present in the cytoplasm and suggests that they have motility.

Key words: inner hair cells, single cell, F-actin

(原稿到着：平成2年3月7日
別冊請求先：山根英雄
〒545 大阪市阿倍野区旭町1-5-7
大阪市立大学医学部耳鼻咽喉科学教室)