

学 位 論 文 題 名

# 内耳蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察

## 学位論文内容の要旨

### 【 目 的 】

蓋膜は、蝸牛コルチ器の上を覆う膜様の細胞外組織であり、コルチ器有毛細胞の感覚毛が屈曲し、それを契機として有毛細胞が脱分極する過程で、基底板とともに、重要な役割を担っている。蓋膜下面には、外有毛細胞の上部に位置する膜様組織に、感覚毛による圧痕がある。このことは、外有毛細胞感覚毛と蓋膜下面が常に結合していることを証明する。蝸牛の周波数選択性は、回転による解剖学的な差から生じると考えられている。しかしながら、蓋膜と外有毛細胞感覚毛の結合にもその差があるのかは不明である。また、蓋膜を構成する主要な線維であるタイプA線維の本態は生化学的研究から主に、2型コラーゲンとされているが、超微構造的にはいまだその詳細は明らかでない。原子間力顕微鏡（atomic force microscope, AFM）はカンチレバーで試料表面を走査することでその表面構造を画像化する新しい顕微鏡である。電子顕微鏡では電子染色や金属蒸着で修飾された試料を観察するが、AFMは試料の導電性を必要としないので、試料表面を直接に画像化することができる。三次元的解像度が高いこと、立体計測が可能であることも特徴である。

本研究は、AFMを用いて、圧痕の三次元的超微構造を検討し、蓋膜と外有毛細胞感覚毛の機能的結合様式を明らかにし、さらに、タイプA線維の本態を超微形態学的に証明することを目的とした。

### 【 材 料 と 方 法 】

実験動物に成熟ddマウスを用いた。化学固定した蝸牛から蓋膜を摘出した。

- 1) 圧痕の観察には、蓋膜を、液中にてポリ-L-リジン処理した硝子に貼り付け、臨界点乾燥し観察した。基底回転、中回転、頂回転の各場所で、30個の圧痕の幅と深さを測定した。統計学的解析には各群間の平均値の比較はone-way ANOVAを用いて、Post-Hoc testとしてFisher's PLSD法を用いた。
- 2) 線維の観察には、機械的に小片化した蓋膜を、シラン処理した硝子に貼り付け、TritonX-100でフラッシングし、臨界点乾燥、観察した。

### 【 結 果 】

蓋膜下面の外有毛細胞上部にあたる膜様組織Hardesty's membraneには、径20から50nmの粒子像が数珠つなぎに走行しているのが認められた。Hardesty's membraneには外有毛細胞感覚毛と同じ配列を示すW字型の圧痕が観察された。圧痕の配列は、基底回転から頂回転に向かうに連れ、W字型の底辺の角度が鋭角に変化し、外有毛細胞感覚毛の配列の回転による変化と一致した。圧痕を詳細に観察すると、周縁がやや突出するクレーター様の構造を示し、さらに、圧痕の周囲や内側壁は径20から50nmの粒子像からなるのが観察された。前述した粒子像と比べて、圧痕を構成する粒子像は規則的配列を示さず、また密に存在していた。圧痕の幅は、基底回転、中回転、頂回転においてそれぞれ、 $267.3 \pm 18.9$ ,  $329.9 \pm 27.1$ ,  $351.9 \pm 23.5$ （平均±標準偏差）nmであり、統計学的に各回転で有意差（ $p < 0.01$ ）を示し、頂回転に行くほど大きくなった。この結果は、外有毛細胞感覚毛が回転に伴って太くなる傾向と一致した。一方、深さは各回転でばらつきがあり、それぞれ、 $42.5 \pm 14.7$ ,

47.6±13.1, 52.3±12.6nmであり, 統計学的に各回転で有意差を示さなかった。

小片化された蓋膜の辺縁では, ほぐれたタイプA線維が, 単離された形で観察され, 69.1±0.6(平均±標準偏差) nm周期の凹凸からなる表面構造を示した。凹凸の高低差は1.6±0.3nmだった。試料表面の凹凸がより明瞭になる画像モードで観察すると, タイプA線維は明るい縞と暗い縞が交互に並ぶ周期的縞構造を示した。さらに明るい縞の中には1本の暗い縞が, 暗い縞には1本の明るい縞が認められた。

### 【 考 察 】

従来Hardesty's membraneは走査電顕の研究から無構造な膜様組織とされていたが, AFMで観察すると, 径20から50nmの粒子像から構成されていた。組織化学的研究からこの部位は, 感覚毛と蓋膜の結合に関与する糖蛋白などの糖関連物質からなることが知られている。圧痕の粒子像は糖関連物質の配列様式を表し, 感覚毛と蓋膜が機能的結合形態を持つことを示している。すなわち, 感覚毛が刺さる部位は, 糖関連物質が多く, さらに盛り上がって分布し, しっかりと感覚毛を固着させる機能的構築を示す。本研究の立体計測の結果は, 蓋膜下面の圧痕が, 生理的条件下における外有毛細胞感覚毛と蓋膜の結合様式を表していることを示すとともに, 外有毛細胞感覚毛と蓋膜との結合が部位により異なっていることを示す。したがって, この結合は, 蝸牛の部位によって異なる周波数選択性に関与していることを示唆する。本研究は, AFMを用いて蓋膜下面の圧痕表面を三次元的に観察し, 立体計測することで, 外有毛細胞感覚毛と蓋膜の機能的結合様式を初めて明らかにした。

1, 2, 3 型コラーゲン線維は, コラーゲン分子がたてにずれながら重合して線維を形成する。分子密度が高いところと低いところが交互に並び, コラーゲン線維は周期的な縞構造を示す。その周期は60から70nmでD周期と呼ばれる。形態学的にD周期を示す線維を認めたら, コラーゲン線維であることが証明される。本研究はタイプA線維の表面微細構造を初めて明らかにし, タイプA線維がコラーゲン線維であることを形態学的に証明した。2型コラーゲンの周期的な縞構造は1型コラーゲンに比べて明瞭でなく, それはプロテオグリカンなどの線維間物質が豊富なために, 線維の表面構造が観察しにくいせいと考えられている。単離された線維は, フラッシングにより線維間物質が取り除かれて, その表面構造を表出したと考えられた。Baseltらは, 1型コラーゲンをAFMで観察し, その表面構造はD周期の凹凸からなり, 凹凸の高低差は5から15nmだったと報告している。彼らの結果と比べて, 今回私たちが測定したタイプA線維の凹凸の高低差は, 約1.5nmと浅かった。AFMで試料表面を直接画像化することで, この浅い凹凸が明瞭になったと考える。透過電顕のレプリカ法を用いて1型コラーゲンを観察すると, 周期的な凹凸の他に, さらに細かい畦状の隆起が確認され, これらの畦状の隆起もコラーゲン線維内の分子密度の差を表していると考えられている。本研究で示した, 明るい縞の中の暗い一本の縞, 暗い縞の中の明るい一本の縞からなる構造は, フリーズエッチング法で認められる凹凸と細かい畦状の隆起に相当する。このことは, タイプA線維の線維内の分子密度の差が表面構造上も現れていることを示唆する。

### 【 結 語 】

- 1) 蓋膜下面の圧痕は, 粒子像から構成されている。これらの粒子像は外有毛細胞と蓋膜の結合に強く関与する糖関連物質の配列や形態の特徴を示す。
- 2) 圧痕の立体的構造がクレーター様の構造を示し, さらにそれを構成する粒子像が密に存在することは, 外有毛細胞と蓋膜の結合を強める機能的構築を持つことを示唆する。
- 3) 圧痕の深さは蝸牛の回転による差を示さず, 一方, 幅は差を示す。このことは, 外有毛細胞感覚毛と蓋膜の関係が部位により異なっていることを示す。したがって, この結合は, 蝸牛の部位によって異なる周波数選択性に関与していることを示唆する。
- 4) 蓋膜タイプA線維の表面構造は60から70nmの周期的な凹凸を示す。このことは形態学的にタイプA線維がコラーゲン線維であることを証明する。

- 5) タイプA線維の表面構造が、周期的な明るい縞と暗い縞、そのなかに認める細かい縞からなることは、線維内のコラーゲン分子密度の差が表面構造に現れていることを示唆する。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 阿 部 和 厚

副 査 教 授 渡 邊 雅 彦

## 学 位 論 文 題 名

### 内耳蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察

蓋膜は、蝸牛コルチ器の上を覆う膜様の細胞外組織であり、コルチ器有毛細胞の感覚毛が屈曲し、それを契機として有毛細胞が脱分極する過程で、基底板とともに、重要な役割を担っている。原子間力顕微鏡 (atomic force microscope, AFM) はカンチレバーで試料表面を走査することでその表面構造を画像化する新しい顕微鏡である。電子顕微鏡では電子染色や金属蒸着で修飾された試料を観察するが、AFMは試料の導電性を必要としないので、試料表面を直接に画像化することができる。三次元的解像度が高いこと、立体計測が可能であることも特徴である。本研究は、AFMを用いて、蓋膜下面にある外有毛細胞感覚毛による圧痕の三次元的超微構造を検討し、蓋膜と外有毛細胞感覚毛の機能的結合様式を明らかにし、さらに、タイプA線維の本態を超微形態学的に証明することを目的とした。

実験動物に成熟ddマウスを用いた。化学固定した蝸牛から蓋膜を摘出した。

圧痕の観察には、蓋膜を、液中にてポリ-L-リジン処理した硝子に貼り付け、臨界点乾燥し観察した。基底回転、中回転、頂回転の各場所で、30個の圧痕の幅と深さを測定した。統計学的解析には各群間の平均値の比較はone-way ANOVAを用いて、Post-Hoc testとしてFisher's PLSD法を用いた。線維の観察には、機械的に小片化した蓋膜を、シラン処理した硝子に貼り付け、TritonX-100でフラッシングし、臨界点乾燥、観察した。

蓋膜下面の外有毛細胞上部にあたる膜様組織Hardesty's membraneには、径20から50nmの粒子像が数珠つなぎに走行しているのが認められた。Hardesty's membraneには外有毛細胞感覚毛と同じ配列を示すW字型の圧痕が観察された。圧痕の配列は、基底回転から頂回転に向かって連れ、W字型の底辺の角度が鋭角に変化し、外有毛細胞感覚毛の配列の回転による変化と一致した。圧痕を詳細に観察すると、周縁がやや突出するクレーター様の構造を示し、さらに、圧痕の周囲や内側壁は径20から50nmの粒子像からなるのが観察された。前述した粒子像と比べて、圧痕を構成する粒子像は規則的配列を示さず、また密に存在していた。組織化学的研究からこの部位は、感覚毛と蓋膜の結合に関与する糖蛋白などの糖関連物質からなることが知られている。圧痕の粒子像は糖関連物質の配列様式を表し、感覚毛と蓋膜が機能的結合形態を持つことを示している。すなわち、感覚毛が刺さる部位は、糖関連物質が多く、さらに盛り上がって分布し、しっかりと感覚毛を固着させる機能的構築を示す。圧痕の幅は、

基底回転，中回転，頂回転においてそれぞれ， $267.3 \pm 18.9$ ， $329.9 \pm 27.1$ ， $351.9 \pm 23.5$ （平均±標準偏差）nmであり，統計学的に各回転で有意差（ $p < 0.01$ ）を示し，頂回転に行くほど大きくなった．この結果は，外有毛細胞感覚毛が回転に伴って太くなる傾向と一致した．一方，深さは各回転でばらつきがあり，それぞれ， $42.5 \pm 14.7$ ， $47.6 \pm 13.1$ ， $52.3 \pm 12.6$ nmであり，統計学的に各回転で有意差を示さなかった．本研究の立体計測の結果は，蓋膜下面の圧痕が，生理的条件下における外有毛細胞感覚毛と蓋膜の結合様式を表していることを示すとともに，外有毛細胞感覚毛と蓋膜との結合が部位により異なっていることを示す．したがって，この結合は，蝸牛の部位によって異なる周波数選択性に関与している可能性を示唆する．

小片化された蓋膜の辺縁では，ほぐれたタイプA線維が，単離された形で観察され， $69.1 \pm 0.6$ （平均±標準偏差）nm周期の凹凸からなる表面構造を示した．凹凸の高低差は $1.6 \pm 0.3$ nmだった．試料表面の凹凸がより明瞭になる画像モードで観察すると，タイプA線維は明るい縞と暗い縞が交互に並ぶ周期的縞構造を示した．さらに明るい縞の中には1本の暗い縞が，暗い縞には1本の明るい縞が認められた．1，2，3型コラーゲン線維は，コラーゲン分子がたてにずれながら重合して線維を形成する．分子密度が高いところと低いところが交互に並び，コラーゲン線維は周期的な縞構造を示す．その周期は60から70nmでD周期と呼ばれる．形態学的にD周期を示す線維を認めたら，コラーゲン線維であることが証明される．本研究はタイプA線維の表面微細構造を初めて明らかにし，タイプA線維がコラーゲン線維であることを形態学的に証明した．

公開發表では，阿部和厚教授から過去のAFMを用いた内耳組織観察例の有無，内耳組織を観察するうえでの試料作成方法の工夫，細胞の膜構造観察における分解能，および，外有毛細胞感覚毛の配列が内有毛細胞のそれと異なる理由について質問があった．渡邊雅彦教授はタイプA線維で認めた細かい縞の性質について質問した．犬山征夫教授は本研究の結果に関する機能的解釈と今後のAFMを用いた内耳研究への展望を求めた．いずれの質問に対しても，申請者はおおむね妥当な回答をした．

この論文は，内耳蓋膜の微細構造をAFMで観察し，外有毛細胞感覚毛と蓋膜の結合様式および蓋膜を構成する線維の本態をはじめて明確にしたことで高く評価され，今後のAFMを用いた内耳研究の発展が期待される．

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した．