

## 綜 説

# 聴覚発達過程におけるコルチ器形成 と支持細胞の分化

伊 藤 誠

信州大学医学部第2病理学教室

## Cellular Differentiation of Cochlear Supporting Cells in the Process of Hearing Inception: A Review

Makoto ITO

Department of Pathology, Shinshu University School of Medicine

**Key words:** cochlea, organ of Corti, hearing development, ultrastructure

蝸牛, コルチ器, 聴覚発達, 超微形態

### I はじめに

高齢者人口の急増に伴い痴呆や視覚障害と並んで、老人性難聴の問題が今後深刻になると考えられる。様々な hearing device が開発され、cochlear implant も臨床に応用されているが、感覚受容器としての蝸牛の機能を完全に代償し得る人工的な装置の開発にはほど遠い。感覚生理学者である Hudspeth の言葉を借りれば、内耳は平衡・聴覚機能を担う臓器として、ミニチュア化の極限まで進化した器官であり、とりわけ聴覚受容器としてのコルチ器の構造はきわめて精緻に組織化されている<sup>1)</sup>。その3次元構築の機能美もさることながら、約32,000個しかない有毛細胞には、細胞レベルでの周波数分析機能、各特性周波数ごとの音刺激の増幅機能といったこれまで考えられていた以上の精密な機能が備わっていることが明らかにされつつある。反面、コルチ器細胞は障害に対しての脆さも併せもっている。

この20年間は、コルチ器とそれを支える基底板が、

単に与えられた音の振幅や周波数を感知し、それを単純に電氣的インパルスに変換する受動的な装置であるという、von Békésy の提唱した感覚受容器としてのモデル<sup>2)</sup>に大きな変更が迫られた時期である<sup>3)</sup>。音刺激の強さと基底板の振動、さらには蝸牛神経や脳幹部蝸牛神経細胞での活動電位との間には非線形的な入力-出力関係が成立していることが1980年代から次々と明らかにされ<sup>4)~7)</sup>、コルチ器そのものに、能動的に特性周波数に応じた周波数の分析を行い、音の刺激を増幅し、それを神経伝達するための巧妙な仕組が存在することが1980年代以降次々と明らかにされてきている。しかし、コルチ器を構成する支持細胞の役割と他の細胞との相互の機能的関連については、完璧には理解されていない現状である。とりわけ感覚有毛細胞の再生が起り得ることが証明されて以来<sup>8)~11)</sup>、development and regeneration の観点から再度コルチ器の発生や支持細胞の機能について見直すべき時期を迎えている。

本稿では、cochlear biomechanics についての過去10年間の進歩、感覚有毛細胞の再生能を廻る新たな展開を踏まえ、コルチ器の発生と分化に焦点を絞り、超微形態的な観点からコルチ器形成の仕組を説明する。

別刷請求先: 伊藤 誠

〒390 松本市旭 3-1-1 信州大学医学部第2病理学

## II コルチ器の構造と機能

コルチ器 (organ of Corti) はコウモリからヒトまで哺乳類に共通する聴覚受容器の形態である。内、外有毛細胞を中心に、それを構造的に支える多様な形態を示す支持細胞群からなり、振動板である基底板 (basilar membrane) に沿って蝸牛基底回転から頂部回転までラセン状に規則的に並び、高周波数領域から低周波数領域までの音をもれなく検知する仕組みになっている (tonotopic organization)<sup>12)~14)</sup>。内有毛細胞 (inner hair cell=IHC) は音の波を感じし、これを神経の活動電位に変換し、求心性神経を通して中枢に伝達する。一方、外有毛細胞 (outer hair cell=OHC) は後述するように周波数分析と音の刺激の増幅によりコルチ器の active process に関与している<sup>4)13)</sup>。

有毛細胞表面には微絨毛から進化した感覚毛 (stereocilia) が規則的に傾斜配列している (Fig. 1)。感覚毛の形態、基底板の長さにも特性周波数に対応した階層的な変化が認められる<sup>13)14)</sup>。感覚毛はアクチンフィラメントやアクチン結合蛋白を含む特有の細胞骨格構造を持つが<sup>15)~17)</sup>、しなやかさのある微絨毛や繊毛の構造と異なり、感覚毛は剛性を帯びたビョットとして機能している点の特徴である。隣合う感覚毛の先端は tip link と称する弾力性細繊維で締結されていることが走査電顕などにより知られていたが<sup>18)19)</sup>、この細繊維の一端の感覚毛先端に mechano-sensory transducer channel が存在することが細胞生理学的に証明された<sup>20)~22)</sup>。このチャンネルは非選択的な陽イオン透過性を有する<sup>23)</sup>。感覚毛の先端は蓋膜に接しており、内リンパを伝わった音の振動により感覚毛が一方に傾斜することで、イオンチャンネルが開放し、内リンパの主成分である  $K^+$  の流入に基づき inward current が生じ、外有毛細胞の側壁細胞膜に  $-100 \mu V$  の膜電位が発生する<sup>24)</sup>。この mechano-sensory channel の活性は鋭敏かつ敏速であり、エッフェル塔の先端を 2 cm 傾ける程度の微細な刺激で OHC の細胞伸縮運動 (fast motile response) を惹起する<sup>1)</sup>。この fast motile response は ATP drive や second messenger の介在しない敏速な反応であり、時定数は数  $10 \mu sec$  の単位である。したがって、OHC は特性周波数に依存して 1 秒間に約 100,000 回以上もの微小共鳴振動を惹起する計算になる<sup>1)</sup>。コウモリのような echo-location system の発達した動物では  $\sim 150 kHz$  の超音波

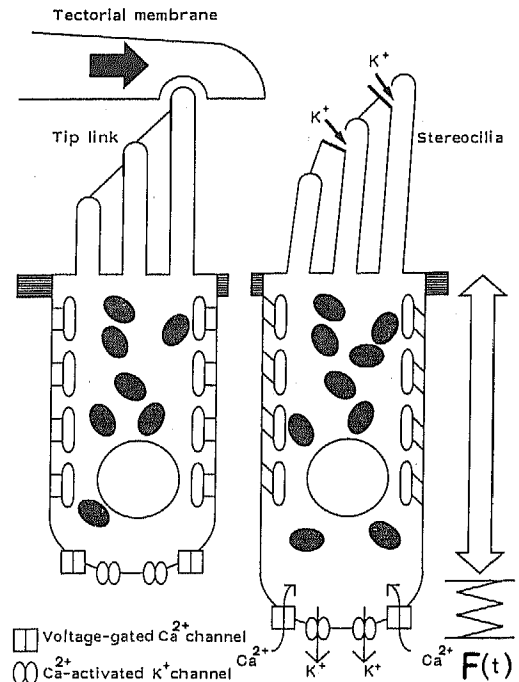


Fig. 1 外有毛細胞の fast motile response (本文参照)。

を聞き分ける能力があり、ヒトでも両耳の間の  $700 \mu sec$  程度の時差を感知し、音源定位を行う能力があるが、このような優れた聴覚機能の一部は、時定数の短い OHC の fast motile response が可能にしている<sup>1)</sup>。細胞レベルでの周波数分析機能が OHC に備わっていることは細胞生理学的に知られていたが、そのメカニズムは謎であった。しかし、OHC の細胞基底部には olivocochlear nerve の遠心性シナプスが形成されており<sup>25)</sup>、この postsynaptic active zone の部分に voltage-gated  $Ca^{2+}$  channel と  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel が存在することが証明され、イオンチャンネルの分布の密度、活性により個々の OHC の周波数選択性が決定されようと考えられるようになった<sup>26)</sup>。

以上より、OHC は mechano-sensory transduction の過程で能動的に特性周波数の選択を行い、音刺激の増幅を行っている。音の波により引き起こされる基底板の物理的振動は、本来は時間とともに減衰していく性質 (damping) があるが、OHC の fast motile response により周波数特異的に基底板の物理的振動を局所的に増幅する (negative damping) という、能動的なメカニズム (active process) が OHC そのも

のに備わっていることを意味する<sup>7)</sup>。このメカニズムは蝸牛の微小機械系 (cochlear micromechanics) と呼ばれ、様々なシミュレーション回路が提唱され、数学的解析が行われている<sup>27)28)</sup>。

感覚毛先端の mechano-sensory channel は非選択的な陽イオン透過性を有することで、耳毒性物質としてよく知られるアミノグリコシド系抗生物質やポリカチオンによる有毛細胞障害の標的ともなっている点でも注目される<sup>29)</sup>。

### III コルチ器支持細胞の機能

周波数分析器、刺激増幅装置としての OHC の機能は解明されたが、支持細胞の機能については十分な理解には至っていない。支持細胞にはコルチトンネルを構成する inner and outer pillar cell, OHC を構造的に支える Deiters 細胞、さらにその外側に並ぶ Hensen 細胞, Claudius 細胞, Boettcher 細胞が知られている。Hensen 細胞, Claudius 細胞, Boettcher 細胞以外の細胞に共通する性状は、細胞の上極から下極にかけて発達した微小管束の存在である<sup>30)~32)</sup>。これにより細胞個々の形態とコルチ器全体の立体的な構築が支えられている。Larsell ら<sup>33)</sup>によれば、pillar cell は微小管束の発達により、剛性の梁柱としてコルチ器の天井を構成する reticular lamina を下支えし、一方 Deiters 細胞の指状突起 (phalangeal process) は柔らかいバネの様な役割を果たすことで、reticular lamina に弾力性を賦与して、基底板の振動を調節変容させ、音受容体としてのコルチ器機能を一層効率の良いものにしていてと考えた。Cochlear micromechanics という概念がなかった時代としては優れた洞察である。

病的過程でも支持細胞は重要な役割を担っている。Deiters 細胞は音響外傷、耳毒性物質によりもたらされる有毛細胞死に対して、指状突起が反応して、有毛細胞欠損によって生じた reticular lamina の穴を塞ぐ役割を果たす<sup>34)35)</sup>。このことで、内リンパからコルチリンパへの  $K^+$  の流入を防いでいる。このような修復機転により生ずる reticular lamina の変化を phalangeal scar と呼ぶ。

もうひとつの支持細胞の役割は水やイオンの輸送である。Pillar cell や Deiters 細胞は pinocytosis によりコルチリンパ内あるいは外リンパとコルチリンパ間の solute transport を営んでいると考えられる<sup>36)37)</sup>。Spicer と Schulte<sup>38)</sup> は滑面小胞体から分化した tubulo-

cisternal reticulum が Deiters 細胞の核上部にあることを指摘し、またこれに似た細胞小器官構造は pillar 細胞の上極と下極や<sup>39)</sup>、Reissner 膜上皮にも存在すること<sup>40)</sup>も証明された。こうした細胞内小管系は内耳に限らず、汗腺上皮、胃の壁細胞など多くの電解質代謝を営む細胞に共通して見られる構造である。このことより蝸牛支持細胞の多くは、血管条組織やラセン靱帯細胞と共同して、膜迷路内での水や電解質の輸送を定常的に行っていると考える得る。

先に述べたように、支持細胞は有毛細胞とともに reticular lamina を形成し、内リンパ腔に接する面ではよく発達した tight junction などの細胞間接合装置で堅くシールされ、内リンパとコルチリンパ (イオン組成としては外リンパと同じ) の間を電氣的に遮断している<sup>41)</sup>。それでは支持細胞は有毛細胞の活動電位の影響を直接受けるのであろうか? ワニなど爬虫類の聴覚神経上皮では支持細胞と有毛細胞の間に gap junction が介在することから、両者は電氣的にカップリングしていることを Santos-Sacchi と Dallos<sup>42)</sup> は指摘している。しかし、哺乳類のコルチ器支持細胞と有毛細胞との間には gap junction の形成がなく、有毛細胞の電氣的興奮がそのまま支持細胞に伝えられることはないといわれる。むしろ支持細胞と支持細胞との間に存在する gap junction は細胞間の栄養や代謝産物のやりとりに関係すると考えられている<sup>43)44)</sup>。最近の報告で注目すべきは Dulon<sup>45)</sup> の報告で、彼は Deiters 細胞に purinergic ATP receptor が存在すること、細胞外  $K^+$  依存性に  $Ca^{2+}$  signaling による Deiters 細胞の伸縮運動が観察されることから、Deiters 細胞は OHC と基底板との間に位置して、OHC の motile response に共鳴反応し、active process に直接関与している可能性を示唆している。このような能動的な働きが Deiters 細胞にあるのか、さらに検討の余地がある。

### IV コルチ器発達と支持細胞の分化

哺乳類のコルチ器形成は有毛細胞と支持細胞の協調的な分化と細胞小器官の成熟によって誘導される<sup>33)46)~51)</sup>。胎生期には蝸牛、前庭神経節細胞の発生分化の誘導には Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) と Neurotrophic factor-3 (NT-3) が関わっている<sup>52)~58)</sup>。BDNF は前庭神経節細胞、NF-3 は蝸牛神経節細胞の survival factor であり、BDNF は OHC への efferent innervation を誘導する。有毛細胞には BDNF の産生能があり、自身の細胞分化と成

Table 1 ヒトとラットのコルチ器形成過程の経時的比較。ラット新生仔のコルチ器発達は、ヒトの胎生期14~30週齢の変化に相似である。

Morphologic events	RAT	HUMAN
Trigger of hair cell differentiation	?	?
Afferent innervation into cochlea	E 16 day	9 weeks*
IHC, then OHC distinguishable histologically	E 17 day	10-12 weeks
Afferent synaptic contacts established	E 17 day	11-12 weeks
Emerging stereocilia on IHC, then OHC	E 18 day	12 weeks
Efferent synapse on IHC first established	P 0 (at birth)	14 weeks
Corti tunnel and Nuel space open	P 9 day	20 weeks
Efferent synaptic contacts on OHC established	P 10 day	22 weeks
Histologic maturation	P 16 day	30 weeks

E : 胎生期日齢, P : 新生仔日齢 Pujol R, Lavigne-Rebillard M<sup>50)</sup>より改変

\* : 在胎週齢

熟に関わっている。

ヒトの蝸牛の形態形成は、胎生期の15週より始まり、30週頃には原始的聴覚機能が開始する<sup>50)</sup>。モルモット、ネコ、イヌも同様に胎生期に初期の聴覚が開始される<sup>47)</sup>。ヒトの蝸牛の形成過程を研究することは、技術的にも法的にも困難であるが、都合の良いことに実験動物として用いられる齧歯類の蝸牛は出生時には未分化な神経上皮である organ of Kölliker と呼ばれる形態であり、齧歯類新生仔の蝸牛形成過程を研究することで、ヒト胎生後期のコルチ器の形態形成について多くの知見をもたらす (Table 1)<sup>50)</sup>。著者ら<sup>39)</sup>は、コルチ器形成過程について Mongolian gerbil 新生仔の蝸牛を電顕的に検索し、pillar cell と Deiters 細胞の細胞分化と小器官形成を経時的に電子顕微鏡的に観察した。

蝸牛の発達を巨視的にみると、感覚細胞の分化は基底回転と中回転の境界部で始まり、徐々に頂回転方向と基底回転方向に進展する<sup>33)</sup>。同時に、コルチ器細胞の分化は基底板に沿って内側から外側に放射状に進展する。生後2日目まではコルチ器部分は lesser epithelial ridge と呼ばれる重層性未分化神経上皮で構成され (Fig. 2a), すでに有毛細胞と支持細胞の細胞分化

が明確であるが、細胞小器官の発達は乏しく vesicular and tubular organelle が主体であった (Fig. 2b)。生後4日目より inner pillar cell の細胞内上極から下極に向かった微小管束の伸長が明らかになり (Fig. 3a-c), 核上部にはゴルジ装置と粗面小胞体が発達し (Fig. 3d), 豊富なグリコーゲン顆粒の蓄積が認められた (Fig. 3a)。内耳の器官形成期には嫌気性代謝が優位であると考えられ, pillar cell と Deiters 細胞のグリコーゲン量は成熟とともに減少する<sup>50)</sup>。生後4日目の有毛細胞には, cuticular plate の形成と stereocilia の分化が確認され, 細胞質にはミトコンドリアの増加が認められた (Fig. 3a)。生後8日頃には支持細胞の細胞小器官の発達が outer pillar cell から Deiters 細胞にかけても明瞭になり, 核周囲を中心に粗面小胞体やゴルジ装置が豊富に認められた (Fig. 4a)。このころより inner pillar cell と outer pillar cell の間, outer pillar cell と Deiters 細胞指状突起間にはコルチリンパ空隙の形成が徐々に顕著になり, 外有毛細胞への遠心性神経のシナプス形成も明確になった (Fig. 4a)。生後10日頃まではコルチリンパ腔は蛋白量の豊富な組織液で満たされていた。生後10日までに Nuel space は開放し, 指状突起にも微小管

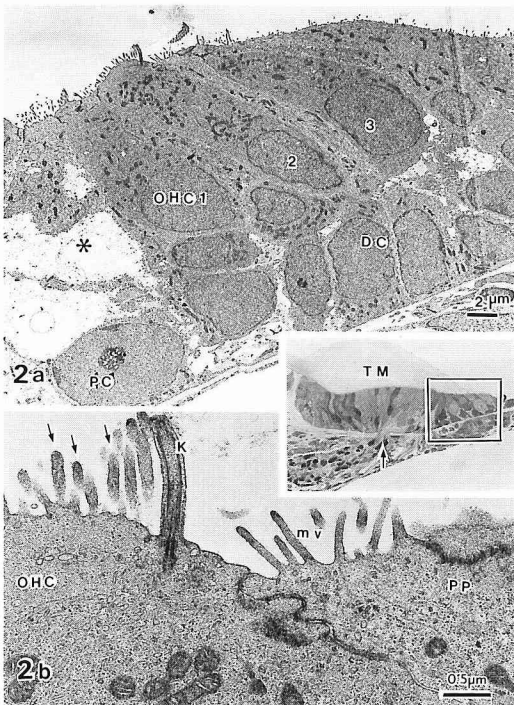


Fig. 2 ジャービル新生仔生後2日目。a) 外有毛細胞 (OHC1, 2, 3) と Deiters 前駆細胞 (DC) の細胞分化は明瞭。Pillar cell (PC) の核上部はグリコーゲンの脱落により空洞化 (\*) している。Inset: コルチ器は lesser epithelial ridge を形成し、蓋膜(TM)が表面を覆っている。Habenula perforata (矢印) は内側寄りに位置する。b) 外有毛細胞 (OHC) には kinocilium (K) が認められるが、感覚毛の分化はまだ見られない (矢印)。Deiters 細胞指状突起 (PP) と有毛細胞の細胞質には微小管、微小空胞、リボソーム、ミトコンドリアが認められる。Deiters 細胞指状突起の表面も微絨毛 (mv) で覆われる。

束の発達が認められ (Fig. 5c), ほぼコルチ器形態は完成した。生後12日から16日にかけての顕著な変化は支持細胞での蛋白合成と分泌に関わる細胞小器官の発達に加えて (Fig. 4b, 5a), pillar cell の細胞上極・下極と、Deiters 細胞の核上部に tubulocisternal reticulum (TCR) の形成が顕著に認められるようになることである (Figs. 5a, b)。この時期は外有毛細胞での subsurface cistern の形成期とも一致していた。生後15~16日目までに支持細胞の形態は成熟に達し、コルチトンネルに面した pillar cell の細胞質には、多数の lysosome が認められた (Fig. 6a)。また、

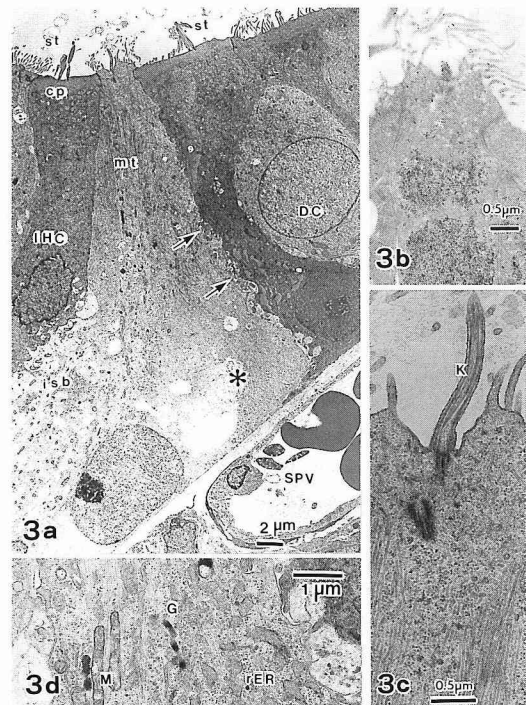


Fig. 3 ジャービル新生仔生後4日目。a) 内有毛細胞 (IHC) と外有毛細胞には感覚毛 (st) の分化と cuticular plate (cp) の形成が認められる。三角形の inner pillar cell には頂部から微小管束 (mt) が伸長し、核周囲にはグリコーゲン (\*) が豊富で、outer pillar cell との境界には微絨毛を伴った細胞間乖離が始まる (矢印)。isb: inner spiral bundle, spv: vas spirale. b) Inner pillar cell の kinocilium と細胞頂部に免疫細胞化学的に  $\beta$ -tubulin の陽性像が見られる。Immunogold (15nm gold particles) method. c) Inner pillar cell の細胞上部の拡大像。d) Inner pillar cell の細胞中層にはミトコンドリア (M), 粗面小胞体 (rER), Golgi 装置 (G) が出現。

Deiters 細胞の核上部には微小管束と TCR が密に分布していた (Fig. 6b)。これら一連の分化成熟のパターンはラットのそれとほぼ時相的に一致する<sup>47)50)</sup>。

微小管蛋白である  $\beta$ -tubulin の免疫組織化学的染色では、生後2日目から pillar cell の頂部に微小管重合が始まり、コルチ器形成に伴い Deiters 細胞にも上極から下極に進行する微小管束の形成が確認された (Fig. 7)。蝸牛神経のミエリン形成も聴覚発達と密接に関係しており、ミエリン蛋白である myelin basic protein<sup>60)</sup> の染色性は生後9日前後から確認され、12日目までに完全に成熟動物のパターンになった (Fig.

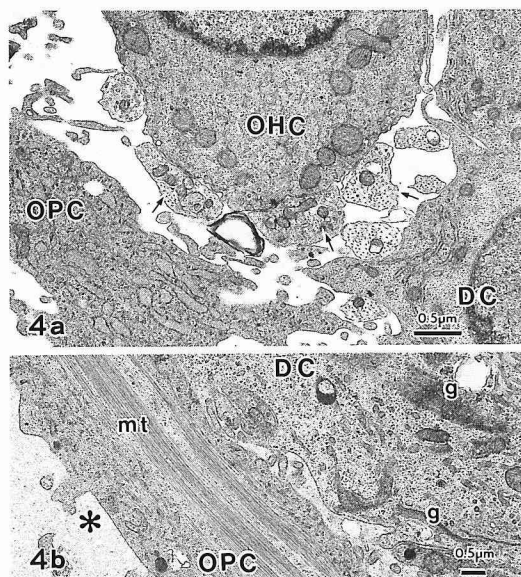


Fig. 4 a) ジャービル生後8日目。外有毛細胞(OHC)とDeiters細胞(DC)の間にNuel spaceが出現。この時期, efferent synaptogenesisが明瞭になる(矢印)。Outer pillar cell (OPC) にも粗面小胞体が豊富で, 微絨毛の発達も認められる。b) 生後14日目のOPCとDCの関係。OPCには微細管束(mt)が形成され, コルチンネル(\*)は開放し, DCにはGolgi装置(g)や滑面小胞体が豊富。

8)。

Mongolian gerbil については, 生理学的にも多くの聴覚発達のデータが得られている<sup>61)–65)</sup>。伝音系である中耳の発達と成熟も聴覚の発達には重要で<sup>61)63)66)</sup>, Mongolian gerbil では生後14–16日の間に, 耳小骨骨化, 耳小骨連鎖の完成, 中耳間葉組織の吸収が起こり, 蝸牛マイクロホン電位で25dBの聴覚閾値の利得がある<sup>63)</sup>。Tonotopic organization がどの時期に完成するかについては謎であったが, Echteler ら<sup>64)</sup>は生後14–21日の間に特性周波数でのチューニング特性が1.5 octave ほど上昇することから, コルチ器形態が完成してから active process の発達が生ずることを示唆している。

このように, コルチ器形成の初期には細胞分化に関わる小器官の発達が先行し, 個々の細胞の成熟に伴って粗面小胞体やゴルジ装置を主体とする蛋白合成系が出現する。これに伴い細胞上極から下極にかけて急速に発達する微細管束の形成は支持細胞に極性を与える。蛋白の合成に関係する小器官は支持細胞の lateral membrane に沿って密に分布し, 細胞間に分泌された

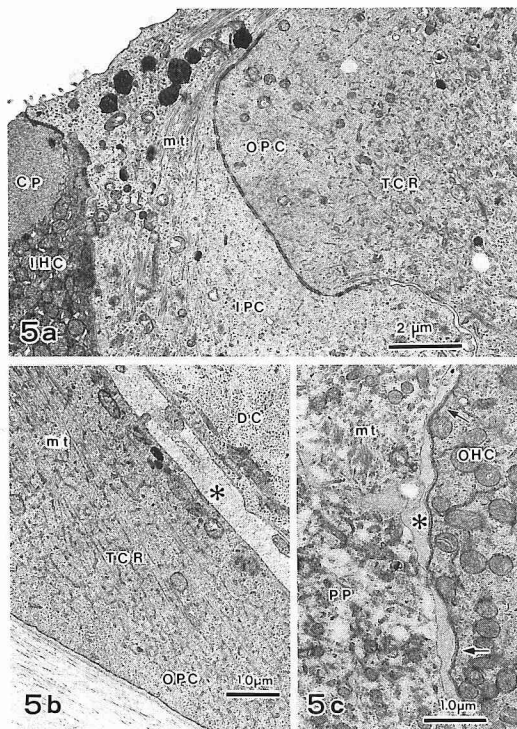


Fig. 5 a) ジャービル生後14日目。Inner pillar cell (IPC) と outer pillar cell (OPC) の間は密に接合し, IPCには微細管束(mt)やミトコンドリア, ライソゾームが豊富。一方, OPCにはtubulocisternal reticulum (TCR)が発達。b) OPCの基底部にもTCRが見られる。Nuel space (\*)はflocculent fluidで満たされている。c) 生後10日目のDeiters細胞指状突起(PP)と外有毛細胞(OHC)の間のNuel space (\*)にもb)と同様な像が認められた。OHCのsubsurface cisterna (矢印)はまだ単層性である。

蛋白濃度の高い組織液はCorti tunnel や Nuel space の開大を促進し, 神経線維を誘導するための微小環境を提供している。また, Deiters 細胞については蓋膜形成に関わっておりプロテオグリカンやII型膠原線維, 糖蛋白の分泌を行っていると考えられる<sup>13)67)68)</sup>。コルチ器形態が完成した後も, 細胞の成熟は進行し, 支持細胞は主としてコルチリンパの循環や電解質組成の安定化に関与するTCRが発達して, solute transport cell に特有な小器官構成に目的的に変貌することが形態的に明らかにされた。

## V 血管条機能と聴覚発達

蝸牛が周波数分析と増幅器として機能を発揮するた



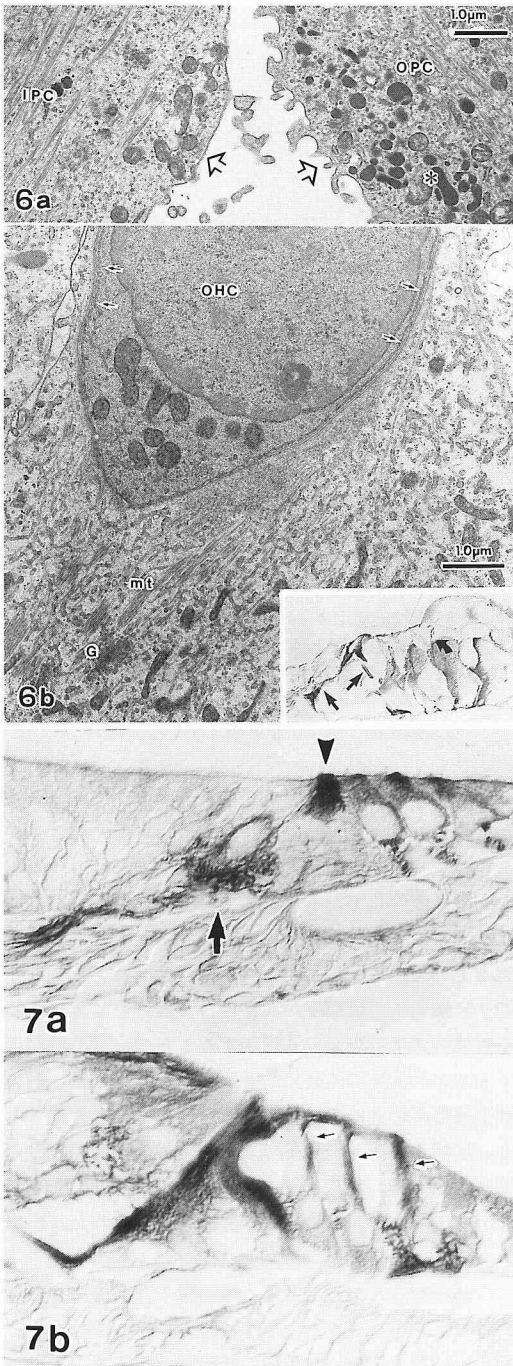


Fig. 7 ジャービル蝸牛の  $\beta$ -tubulin の免疫組織化学的発現。a) 生後第 0 日。Pillar cell の頂部 (矢頭) と蝸牛神経, inner spiral bundle (矢印), 外有毛細胞に陽性。b) 第 8 日目。内外の pillar cell の全長と Deiters 細胞の phalangeal process (小矢印) に沿って陽性。×535

Fig. 6 a) ジャービル生後16日目。コルチトンネルを挟んで対峙する inner pillar cell (IPC) と outer pillar cell (OPC)。コルチリンパは矢印方向に吸収される。OPC にはライソゾームが豊富 (\*). b) 生後15日目。Deiters 細胞核上部には Golgi 装置 (G) が多く分布し, TCR が微小管束間に発達している。外有毛細胞 (OHC) の presynaptic zone の単層性の subsurface cistern (矢印)。Inset: 成熟動物コルチ器の  $\beta$ -tubulin 染色。Pillar cell (矢印) と Deiters 細胞内 (曲矢印) に微小管束の形成がある。×178

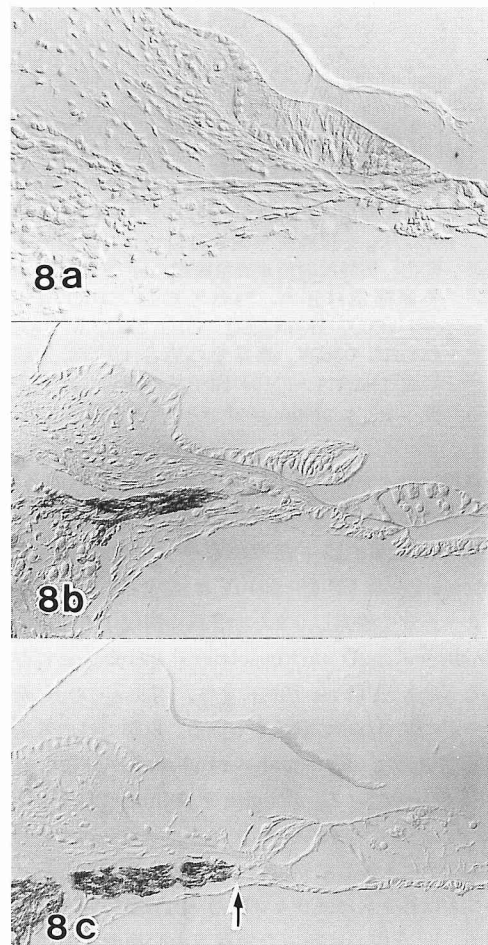


Fig. 8 ジャービル蝸牛の myelin basic protein の免疫組織化学的発現。生後 9 日目よりラセン神経節から末梢へのミエリン形成が進行する。生後第 12 日目で habenula perforata まで到達する (矢印)。a) 生後第 2 日目, b) 生後第 9 日目, c) 生後第 12 日目。×190

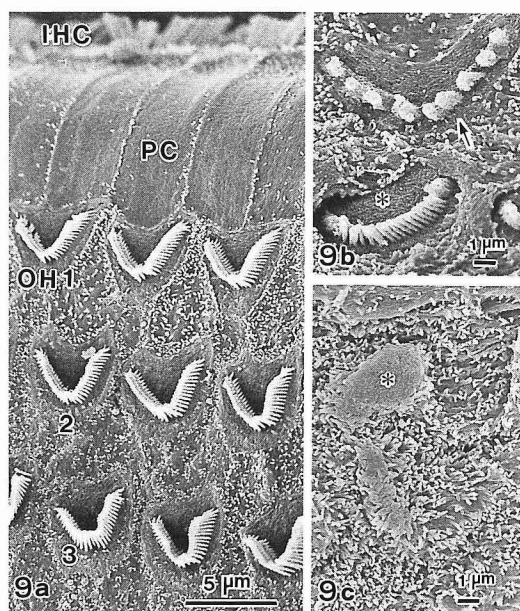


Fig. 9 離乳期 Sprague-Dawley 系ラットに trimethyltin 6mg/kg を腹腔投与後 6 日目のコルチ器表面の変化。電界放射型走査電顕像。a) 中階部のコルチ器構造は正常。内有毛細胞 (IHC), Pillar cell (PC), 外有毛細胞 (OH1, 2, 3)。b) 基底階の OHC の障害。感覚毛の癒合 (矢印) と細胞表面の陥没 (\*). c) 団子状に膨隆した有毛細胞 (\*) と phalangeal scar 表面の微絨毛増生。

めには、コルチ器の周辺環境である内リンパの  $K^+$  濃度と endocochlear potential (EP) が一定に維持される必要がある。蝸牛側壁に存在する血管条 (stria vascularis) は EP を +80 mV に維持するためのバッテリーとして機能し、また血管条を構成する辺縁細胞 (marginal cell) には basolateral membrane に存在する Na,K-ATPase 活性により、内リンパの  $K^+$  濃度を一定に保つために機能している。鳥類では血管条相同器官として tegmentum vasculosum が同様な機能を果たしている。Schulte と Adams<sup>69)</sup> は Na,K-ATPase 活性が血管条のみでなく、ラセン靱帯の II 型線維細胞にも等しく分布していることを発見した。このことは外リンパ→ラセン靱帯→血管条→内リンパの間で、 $K^+$  を中心に巧みな電解質の交換や水の循環が起きている<sup>70)</sup> ことの傍証である。老化に伴う聴力低下 (presbiacusis) の原因のひとつとして血管条機能の低下による難聴が挙げられるが<sup>71)</sup>、このことの実験的証左として、Mongolian gerbil では加齢による EP の低下が生ずると同時に、血管条辺縁細胞での Na,K-

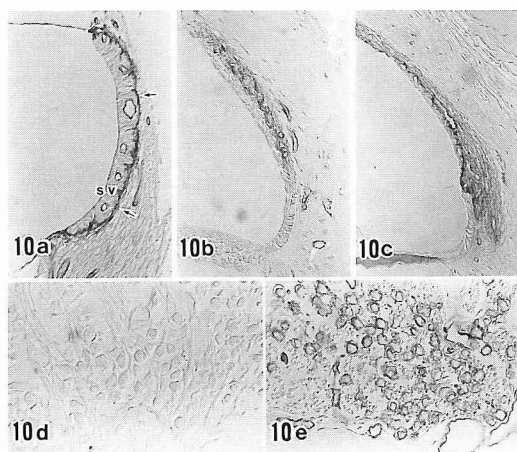


Fig. 10 蝸牛での glucose transporter (GLUT1) の免疫組織化学的発現。a) ラット蝸牛中階。血管条基底細胞層 (矢印) と血管条内皮 (sv) に陽性。×174 b) ジャービル新生仔生後第 2 日。ラセン靱帯と未熟な血管条との境界部の血管内皮に陽性。×134 c) ジャービル生後第 16 日。血管条基底細胞層と血管内皮に陽性。×110 d) ジャービル生後第 12 日。ラセン神経節細胞は陰性。×348 e) ジャービル生後第 16 日。ラセン神経節細胞の satellite cell に陽性。×174

ATPase の免疫組織化学的染色性の低下が生ずることが確認されている<sup>72)</sup>。

辺縁細胞の活動は酸化的リン酸化による ATP 産生に高度に依存しており、短時間の虚血や低酸素負荷により即時に EP の低下や negative EP となり、聴覚閾値の上昇を起こす<sup>73)</sup>。コルチ器有毛細胞はさらに酸化的リン酸化への依存度が大きい。神経毒として知られる有機スズ化合物を少量投与することで、有毛細胞はミトコンドリアでの酸化的リン酸化が阻害され、有毛細胞障害が起きる<sup>74)</sup>。この過程を走査電顕で観察すると、早期から高周波数領域の OHC 選択的な感覚毛の障害と細胞死が起き、やがてコルチ器表面は phalangeal scar により修復される過程が観察された (Fig. 9)。

これらのことから血管条辺縁細胞や有毛細胞の酸素消費率とグルコース利用率はニューロンに匹敵すると考えられる。しかしながら、成熟期のコルチ器内には血管分布がないため、酸素供給とグルコースの供給は血管条とラセン靱帯に密に分布する毛細血管網からの供給に頼らざるを得ない<sup>75)</sup>。グルコースの供給については、glucose transporter (GLUT) が担っている。GLUT は糖のような極性物質を効率よく細胞内に取



り込むための担体として細胞膜に局在し、選択的に glucose を細胞内に取り込む機能を果たしている。GLUT は組織や細胞に広く分布しており、現在までに 5 種類の isoforms が知られ、神経系の血管内皮には GLUT1 が分布している<sup>76)77)</sup>。著者らは免疫組織化学的に内耳の血管内皮細胞にも GLUT1 が存在することを証明するとともに、GLUT1 は血管のみでなく血管条基底細胞にも分布していることを発見した (Fig. 10)<sup>78)</sup>。血管条基底細胞は外リンパ系に属するラセン靱帯組織と内リンパ系である血管条との間の境界を形成している。GLUT1 が蝸牛内に豊富に存在することで血管から外リンパ、外リンパから内リンパへの facilitative glucose uptake が血管条辺縁細胞に対して常に保証される仕組みとなっている<sup>79)</sup>。

Mongolian gerbil では、聴覚の開始の時期に一致して辺縁細胞には Na, K-ATPase の免疫組織化学的な発現が起こり、生後 14~16 日で基底細胞による血管条組織基底部の境界形成が明瞭になり、またラセン神経節細胞周囲の satellite cell にも GLUT1 の発現が見られるようになり (Fig. 10d, e)<sup>78)</sup>、この時期に一致して EP の上昇が生後 30 日まで急激に起こり、蝸牛活動電位の誘導閾値の低下と平行していることが確認された<sup>80)</sup>。

以上より、種を問わずコルチ器と血管条組織は協調的に分化成熟を遂げ<sup>80)81)</sup>、コルチ器形態が完成した後に、EP の上昇、蝸牛マイクロホン電位や活動電位の発現が起こり、同時に active process が確立すると考えられる。

## VI コルチ器の発生分化と再生

この様に高度に組織化され、個々の細胞が機能的に分化した感覚受容体としてのコルチ器形態は、哺乳動物にのみ認められる特徴であり、鳥類や爬虫類、両棲類ではより単純な basilar papilla という重層性感覚神経上皮の形態である。哺乳動物の蝸牛細胞は、高度に分化し、特に IHC と OHC との明確な機能的役割分担を獲得した代わりに、感覚有毛細胞は障害に対して再生能力のない terminal differentiated cell に高度に進化してしまった。このことで得た機能的利得は計り知れないが、一度障害されたら再生の可能性のない器官として永らく認識されてきた。しかし、Corwin<sup>8)</sup> は、ウズラやヒヨコの聴覚器官で、騒音暴露、耳毒性物質により、有毛細胞が脱落しても再び DNA replication が起こり有毛細胞が再生することを実証した。この画

期的な発見を契機に、1990 年代初めから俄に内耳感覚細胞の再生への興味が喚起されてきている。

内耳、網膜、嗅神経上皮は等しく neural ectoderm から分化した組織であり、この点では皮膚と同様な組織発生や再生のパラダイムがあると言われている<sup>82)</sup>。事実、両棲類、爬虫類の平衡聴覚器官を構成する神経上皮は、表皮細胞のごとく生物の一生を通じて感覚有毛細胞の脱落・再生のサイクルが繰り返されることが知られている。しかし、鳥類、哺乳類の内耳には網膜色素上皮のような多分化能を有する幹細胞が存在しないことから、再生有毛細胞の前駆細胞は果たして何かという論争があった。多くの追試と幾多の議論を経て、現在では細胞死の生じた部分に隣接する支持細胞が核分裂し、そこから新たな有毛細胞への分化誘導 (transdifferentiation) が生ずることが明らかにされた<sup>83)84)</sup>。Raphael ら<sup>84)</sup> はこの再生過程の電顕的な特徴から、胎生期の神経発生に類似した interkinetic nuclear migration により再生有毛細胞への分化誘導が起きると主張している。再生有毛細胞の機能回復は、蝸牛活動電位による検討から、形態的再生より数週間遅れるが、高周波数領域での機能回復は起こりにくいことも判明した<sup>85)</sup>。

それでは哺乳類のコルチ器でも、鳥類と同様な post-traumatic な再生が起こり得るであろうか？この疑問に対する直接の回答は得られていないが、Forge ら<sup>9)</sup> のグループは成熟モルモット、ヒトの前庭感覚上皮について gentamicin による有毛細胞死を起こさせ、*in vivo* では 4 週間後に 2 型有毛細胞の再生を、*in vitro* では 4 週間後に支持細胞での DNA replication を確認し<sup>40)</sup>、初めて、哺乳類の内耳でも感覚上皮の再生が有り得ることを証明した。Lefebvre ら<sup>11)</sup> の研究グループは生後 3 日のラット蝸牛コルチ器の器官培養を用いて neomycin による有毛細胞死を起こさせ、これにレチノール酸を添加することで有毛細胞再生が誘導されることを証明した。特殊な条件下での実験ではあるが、哺乳類の内耳細胞の再生への可能性を開く研究成果として、今後の進展が注目される。

## VII 結 語

日本では高齢者の難聴の問題は、視覚障害や痴呆の問題に比較して、臨床的な課題としては軽視される傾向にある。しかし、視覚と同様に聴覚が健全に保たれることは、社会や個人との間の豊かなコミュニケーションを支え、円滑に維持していくために重要であり、

より多くの対策や研究がこの方面にも向けられることが必要と痛感される。

## 文 献

- 1) Hudspeth AJ: How the ear's works work. *Nature* 341: 397-404, 1989
- 2) von Békésy G: Experiments of hearing. Wever EG (ed & trans), McGraw-Hill, New York, 1960
- 3) Davis H: An active process in cochlear mechanics. *Hear Res* 9: 79-90, 1983
- 4) Kim DO: Active and nonlinear cochlear biomechanics and the role of outer-hair-cell subsystem in the mammalian auditory system. *Hear Res* 22: 105-114, 1986
- 5) Khanna SM, Leonard DGB: Basilar membrane tuning in the cat cochlea. *Science* 215: 305-306, 1982
- 6) Sellick PM, Patuzzi R, Johnstone BM: Measurement of basilar membrane motion in the guinea pig using the Mossbauer technique. *J Acoust Soc Am* 72: 131-141, 1982
- 7) Brownell WE, Bader CR, Bertrand D: Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. *Science* 227: 194-196, 1985
- 8) Corwin JT: Regeneration in the auditory system. *Exp Neurol* 115: 7-12, 1992
- 9) Forge A, Li L, Corwin JT, Nevill G: Ultrastructural evidence for hair cell regeneration in the mammalian inner ear. *Science* 259: 1616-1619, 1993
- 10) Warchol ME, Lambert PR, Goldstein BJ, Forge A, Corwin JT: Regenerative proliferation in inner ear sensory epithelia from adult guinea pigs and humans. *Science* 259: 1619-1622, 1993
- 11) Lefebvre PP, Malgrange B, Staecker H, Moonen G, van de Water TR: Retinoid acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells. *Science* 260: 692-695, 1993
- 12) Spoendlin H: Sensory neural organization of the cochlea. *J Laryngol Otol* 93: 853-877, 1979
- 13) Lim DJ: Functional structure of the organ of Corti: A review. *Hear Res* 22: 117-146, 1986
- 14) Lim DJ: Cochlear anatomy related to cochlear microphonics: A review. *J Acoust Soc Am* 67: 1686-1695, 1980
- 15) Hirokawa N: Cytoskeletal architecture of the chicken hair cells revealed with the quick-freeze, deep-etch technique. *Hear Res* 22: 41-54, 1986
- 16) Tilney LG, Tilney MS: Functional organization of the cytoskeleton. *Hear Res* 22: 55-77, 1986
- 17) Slepecky NB, Savage JE: Expression of actin isoforms in the guinea pig organ of Corti: Muscle isoforms are not detected. *Hear Res* 73: 16-26, 1994
- 18) Osborne MP, Comis SD, Pickles JO: Further observations on the fine structure of tip links between stereocilia of the guinea pig cochlea. *Hear Res* 35: 99-108, 1988
- 19) Osborne MP, Comis SD: High resolution scanning electron microscopy of stereocilia in the cochlea of normal, postmortem, and drug-treated guinea pig. *J Electron Microscop Tech* 15: 245-260, 1990
- 20) Ashmore JF, Evans M: Do the ear's links link? *Nature* 356: 111-112, 1993
- 21) Assad JA, Shepherd GMG, Corey DP: Tip-link integrity and mechanical transduction in vertebrate hair cells. *Neuron* 7: 985-994, 1991
- 22) Jaramillo F, Hudspeth AJ: Localization of the hair cell's transduction channels at the hair bundle's top by iontophoretic application of a channel blocker. *Neuron* 7: 409-420, 1991
- 23) Hudspeth AJ: The ionic channels of a vertebrate hair cell. *Hear Res* 22: 21-27, 1986
- 24) Ashmore JF: A fast motile response in guinea-pig outer hair cells: The cellular basis of the cochlear amplifier. *J Physiol (Lond)* 388: 323-347, 1987
- 25) Warr WB: Organization of olivocochlear efferent systems in mammals. In: Webster DB, Popper AN, Fay RR. (ed) *The mammalian auditory pathway: Neuroanatomy*. Springer handbook of auditory research (vol. 1), pp 410-448, Springer-Verlag, New York, 1992

- 26) Issa NP, Hudspeth AJ: Clustering of  $\text{Ca}^{2+}$  channels and  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^{+}$  channels at fluorescently labeled presynaptic active zones of hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 7578-7582, 1994
- 27) Neely ST, Kim DO: An active cochlear model showing sharp tuning and high sensitivity. *Hear Res* 9: 123-130, 1983
- 28) Gaisler CD, Sang C: A cochlear model using feed-forward outer-hair-cell forces. *Hear Res* 86: 132-146, 1995
- 29) Kotecha B, Richardson GP: Ototoxicity in vitro: effects of neomycin, gentamicin, dihydrostreptomycin, amikacin, spectinomycin, neamine, spermine and poly-L-lysine. *Hear Res* 73: 173-184, 1994
- 30) Angelborg C, Engstrom H: Supporting elements in the organ of Corti. I. Fibrillar structures in the supporting cells of the organ of Corti of mammals. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 301: 49-60, 1972
- 31) Saito K, Hama K: Structural diversity of microtubules in the supporting cells of the sensory epithelium of guinea pig organ of Corti. *J Electron Microsc (Tokyo)* 31: 278-281, 1982
- 32) Kikuchi T, Takasaka T, Tonosaki A, Katori Y, Shinkawa H: Microtubules of guinea pig cochlear epithelial cells. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111: 286-290, 1991
- 33) Larsell O, McCrady E, Larsell JF: Development of the organ of Corti in relation to the inception of hearing. *Arch Otolaryngol* 40: 233-248, 1944
- 34) Raphael Y, Altschuler RA: Reorganization of cytoskeletal and junctional proteins during cochlear hair cell degeneration. *Cell Motil Cytoskeleton* 18: 215-227, 1991
- 35) Saunders JC, Dear SP, Schneider ME: The anatomical consequences of acoustic injury: a review and tutorial. *J Acoust Soc Am* 78: 833-860, 1985
- 36) Preston RE, Wright CG: Pinocytosis in the pillar cells of the organ of Corti. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 78: 333-340, 1974
- 37) Leake PA, Snyder RL: Uptake of horseradish peroxidase from perilymph by cochlear hair cells. *Hear Res* 25: 153-171, 1987
- 38) Spicer SS, Schulte BA: Cytologic structure unique to Deiters cells of the cochlea. *Anat Rec* 237: 421-430, 1993
- 39) Ito M, Spicer SS, Schulte BA: Cytological changes related to maturation of the organ of Corti and opening of Corti's tunnel. *Hear Res* 1995 (in press)
- 40) Qvortrup K, Rostgaard J: Three-dimensional organization of a transcellular tubulocisternal endoplasmic reticulum in epithelial cells of Reissner's membrane in the guinea-pig. *Cell Tissue Res* 261: 287-299, 1990
- 41) Gulley RL, Reese TS: Intercellular junctions in the reticular lamina of the organ of Corti. *J Neurocytol* 5: 479-507, 1976
- 42) Santos-Sacchi J, Dallos P: Intercellular communication in the supporting cells of the organ of Corti. *Hear Res* 9: 317-326, 1983
- 43) Oesterle EC, Dallos P: Intracellular recordings from supporting cells in the guinea pig cochlea: DC potentials. *J Neurophysiol* 64: 617-636, 1990
- 44) Oesterle EC, Dallos P: Intracellular recordings from supporting cells in the guinea-pig cochlea: AC potentials. *J Acoust Soc Am* 86: 1013-1032, 1989
- 45) Dulon D:  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in Deiters cells of the guinea-pig cochlea: Active process in supporting cells? In: Flock A, Ottoson D, Ulfendahl M (ed.), *Active hearing (Wenner-Gren international series, vol. 65)*, pp. 195-207, Elsevier Science, Oxford, New York, Tokyo, 1995
- 46) Kikuchi K, Hilding D: The development of the organ of Corti in the mouse. *Acta Otolaryngol (Stockh)*

- 60: 207-222, 1965
- 47) Pujol R, Hilding D: Anatomy and physiology of the onset of auditory function. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 76: 1-10, 1973
- 48) Roth B, Bruns V: Postnatal development of the rat organ of Corti. *Anat Embryol* (Berl) 185: 571-581, 1992
- 49) Kraus H-J, Aulbach-Kraus K: Morphological changes in the cochlea of the mouse after the onset of hearing. *Hear Res* 4: 89-102, 1981
- 50) Pujol R, Lavigne-Rebillard M: Development of neurosensory structures in the human cochlea. *Acta Otolaryngol* (Stockh) 112: 259-264, 1992
- 51) Shnerson A, Pujol R: Age-related changes in the C57BL/6J mouse cochlea. I. Physiological findings. *Dev Brain Res* 2: 65-75, 1982
- 52) Pirvola U, Ylikoski J, Palgi J, Lehtonen E, Arumae U, Saarma M: Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3 mRNAs in the peripheral target fields of developing inner ear ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9915-9919, 1992
- 53) Ylikoski J, Pirvola U, Moshnyakov M, Palgi J, Arumae U, Saarma M: Expression patterns of neurotrophin and their receptor mRNAs in the rat inner ear. *Hear Res* 65: 69-78, 1993
- 54) Schecterson LC, Bothwell M: Neurotrophin and neurotrophin receptor mRNA expression in developing inner ear. *Hear Res* 73: 92-100, 1994
- 55) Wheeler EF, Bothwell M, Schecterson LC, von Bartheld CS: Expression of BDNF and NT-3 mRNA in hair cells of the organ of Corti: quantitative analysis in developing rats. *Hear Res* 73: 46-56, 1994
- 56) Vazquez E, van de Water TR, Del Valle M, Vega JA, Staecker H, Giraldez F, Represa J: Pattern of trkB protein-like immunoreactivity *in vivo* and the *in vitro* effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on developing cochlear and vestibular neurons. *Anat Embryol* (Berl) 189: 157-167, 1994
- 57) Despres G, Romand R: Neurotrophin and the development of cochlear innervation. *Life Sci* 54: 1291-1297, 1994
- 58) Ernfors P, van de Water TR, Loring J, Jaenisch R: Complementary roles of BDNF and NT-3 in vestibular and auditory development. *Neuron* 14: 1153-1164, 1995
- 59) Ito M, Spicer SS, Schulte BA: Histochemical detection of glycogen and glycoconjugates in the inner ear with modified concanavalin A-horseradish peroxidase procedures. *Histochem J* 26: 437-446, 1994
- 60) Dunkley PR, Carnegie PR: Amino acid sequence of the smaller basic protein from rat brain myelin. *Biochem J* 141: 243-255, 1974
- 61) Fink A, Schneck CD, Hartman AF: Development of cochlear function in the neonate Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Comp Physiol Psychol* 78: 375-380, 1972
- 62) Woolf NK, Ryan AF: The development of auditory function in the cochlea of the Mongolian gerbil. *Hear Res* 13: 277-283, 1984
- 63) Woolf NK, Ryan AF: Contributions of the middle ear to the development of function in the cochlea. *Hear Res* 35: 131-142, 1988
- 64) Echteler SM, Arjmand E, Dallos P: Developmental alterations in the frequency map of the mammalian cochlea. *Nature* 341: 147-149, 1989
- 65) Sanes DH, Merickel M, Rubel EW: Evidence for an alteration of the tonotopic map in the gerbil cochlea during development. *J Comp Neurol* 279: 436-444, 1989
- 66) Geal-Dor M, Freeman S, Li G, Sohmer H: Development of hearing in neonatal rats: Air and bone conducted ABR thresholds. *Hear Res* 69: 236-242, 1993

- 67) Remezal M, Gil-Loyzaga P: Incorporation of D<sup>3</sup>H glucosamine to the adult and developing cochlear tectorial membrane of normal and hypothyroid rats. *Hear Res* 66: 23-30, 1993
- 68) Prieto JJ, Rueda J, Sala ML, Merchan JA: Lectin staining of saccharides in the normal and hypothyroid developing organ of Corti. *Dev Brain Res* 52: 141-149, 1990
- 69) Schulte BA, Adams JC: Distribution of immunoreactive Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in gerbil cochlea. *J Histochem Cytochem* 37: 127-134, 1989
- 70) Sterkers O, Saumon G, Tran Ba Huy P, Amiel C: K, Cl, and H<sub>2</sub>O entry in endolymph, perilymph, and cerebrospinal fluid of the rat. *Am J Physiol* 243: F173-F180, 1982
- 71) Schuknecht HF: Disorders of aging. In: *Pathology of the ear* (2nd ed.), pp 415-446, Lea & Febiger, Philadelphia, 1993
- 72) Schulte BA, Schmiedt RA: Lateral wall Na, K-ATPase and endocochlear potentials decline with age in quiet-reared gerbils. *Hear Res* 61: 35-46, 1992
- 73) Kambayashi J, Kobayashi T, Marcus NY, CeMott JE, Thalmann I, Thalmann R: Minimal concentrations of metabolic substrates capable of supporting cochlear potentials. *Hear Res* 7: 105-114, 1982
- 74) Clerici WJ, Chertoff ME, Brownell WE, Fechter LD: *In vitro* organotin administration alters guinea pig cochlear outer hair cell shape and viability. *Toxicol Appl Pharmacol* 120: 193-202, 1993
- 75) Goodwin PC, Ryan AF, Sharp FR, Woolf NK, Davidson TM: Cochlear deoxyglucose uptake: relationship to stimulus intensity. *Hear Res* 15: 215-224, 1984
- 76) Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S: Molecular biology of mammalian glucose transporter. *Diabetes Care* 13: 198-208, 1990
- 77) Fukumoto H, Seino S, Imura H, Seino Y, Bell GI: Characterization and expression of human HepG2/erythrocyte glucose-transporter gene. *Diabetes* 37: 657-661, 1988
- 78) Ito M, Spicer SS, Schulte BA: Immunohistochemical localization of brain type glucose transporter in mammalian inner ears: comparison of developmental and adult stages. *Hear Res* 71: 230-238, 1993
- 79) Ferrary E, Sterkers O, Saumon G, Tran Ba Huy P, Amiel C: Facilitated transfer of glucose from blood into perilymph in the rat cochlea. *Am J Physiol* 253: F59-F65, 1987
- 80) McGuirt JP, Schmiedt RA, Schulte BA: Development of cochlear potentials in the neonatal gerbil. *Hear Res* 84: 52-60, 1995
- 81) Fernandez C, Hinojosa R: Postnatal development of endocochlear potential and stria vascularis in the cat. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 78: 173-186, 1974
- 82) Mahanthappa NK: Regeneration in the auditory system: lessons from other epithelia, and persisting puzzles. *TINS* 17: 357-359, 1994
- 83) Hashino E, Salvi RJ: Changing spatial patterns of DNA replication in the noise-damaged chick cochlea. *J Cell Sci* 105: 23-31, 1993
- 84) Raphael Y, Adler HJ, Wang Y, Finger PA: Cell cycle of transdifferentiating supporting cells in the basilar papilla. *Hear Res* 80: 53-63, 1994
- 85) Chen L, Salvi RJ, Hashino E: Recovery of CAP threshold and amplitude in chickens following kanamycin ototoxicity. *Hear Res* 69: 15-24, 1993

(7. 8. 14 受稿)