



Title	内耳蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察
Author(s)	檜山, 繁樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第4686号
Issue Date	1999-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3151369
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51586
Type	doctoral thesis
File Information	000000336558.pdf

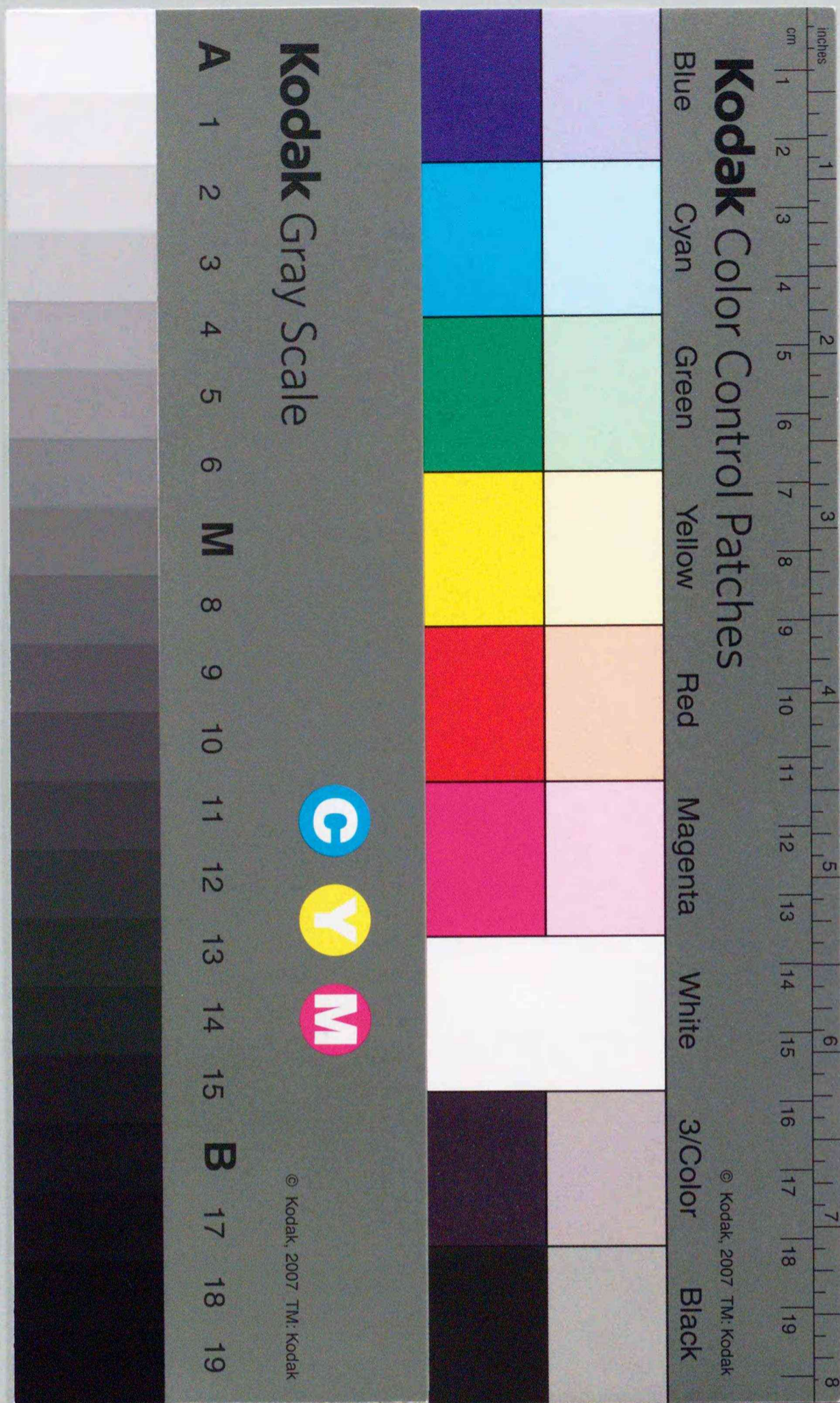


①
内耳蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察

Ultrastructures of the Tectorial Membrane in the Inner Ear
-An Atomic Force Microscopic Examination

檜山繁樹*

*北海道大学医学部耳鼻咽喉科学講座
(主任：犬山征夫教授)



①

内耳蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察

Ultrastructures of the Tectorial Membrane in the Inner Ear
-An Atomic Force Microscopic Examination

檜 山 繁 樹 *

*北海道大学医学部耳鼻咽喉科学講座
(主任：犬山征夫教授)

まえがき

本稿の研究は、北海道大学大学院医学研究科生体機能構造学講座において、1996年から1998年までの4年間に行われた。

研究成果はすでに誌上を含めて以下の形で公表されている。

Shigeki Hiyama, Kazuhiro Abe, Hisashi Mikuni, Satoshi Fukuda and Yukio Inuyama: Type A fibril of the mouse tectorial membrane shows D-periodicity: an atomic force microscopic examination. *Hear. Res.* 124: 118-123 (1998)

Shigeki Hiyama, Kazuhiro Abe, Hisashi Mikuni, Satoshi Fukuda and Yukio Inuyama: Imprints of outer hair cell stereocilia on the mouse tectorial membrane: an atomic force microscopic study. *Proc. Sendai Ear Symposium* 7: 87-89 (1997)

檜山繁樹、阿部和厚：原子間力顕微鏡の医学・生物学への応用-内耳研究への応用-。細胞（印刷中）

檜山繁樹、阿部和厚：マウス内耳における蝸牛蓋膜の観察。医学生物学の原子間力顕微鏡。西村書店 新潟（印刷中）

まえがき

本稿の研究は，北海道大学大学院医学研究科生体機能構造学講座において，1996年から1998年までの4年間に行われた。

研究成果はすでに誌上を含めて以下の形で公表されている。

Shigeki Hiyama, Kazuhiro Abe, Hisashi Mikuni, Satoshi Fukuda and Yukio Inuyama: Type A fibril of the mouse tectorial membrane shows D-periodicity: an atomic force microscopic examination. *Hear. Res.* 124: 118-123 (1998)

Shigeki Hiyama, Kazuhiro Abe, Hisashi Mikuni, Satoshi Fukuda and Yukio Inuyama: Imprints of outer hair cell stereocilia on the mouse tectorial membrane: an atomic force microscopic study. *Proc. Sendai Ear Symposium* 7: 87-89 (1997)

檜山繁樹，阿部和厚：原子間力顕微鏡の医学・生物学への応用-内耳研究への応用-。細胞（印刷中）

檜山繁樹，阿部和厚：マウス内耳における蝸牛蓋膜の観察。医学生物学の原子間力顕微鏡。西村書店 新潟（印刷中）

本稿では、これらの研究成果を示すとともに、蝸牛形態学への原子間力顕微鏡の導入を含めて考察をすすめる。

本稿をまとめるにあたり—

まず、研究の機会を与えていただいた犬山征夫北海道大学医学部耳鼻咽喉科学講座教授に感謝する。そして、この研究期間中、終始直接指導をいただいた阿部和厚北海道大学大学院医学研究科生体機能構造学講座教授に深謝する。

指導と助言をいただいた生体機能構造学講座渡邊 智，耳鼻咽喉科学講座三國 尚志の両氏，および協力をいただいた生体機能構造学講座および耳鼻咽喉科学講座の諸氏に感謝する。

この研究の一部は、平成6・7・8年度科学研究費基盤研究(A)(1)からの研究費による援助を受けた。

目次

まえがき 1

要約 5

緒言 7

I. 測定条件の設定および試料作成方法の開発

 1. 背景 10

 2. 測定モードの選択 12

 3. 走査速度の設定 14

 4. 試料作成方法の開発 15

 5. 小括 18

II. 蓋膜の表面微細構造

-とくに蓋膜下面の外有毛細胞による圧痕の微細構造について

 1. 背景 19

 2. 材料と方法 22

 3. 結果 24

 4. 考察 29

III. 蓋膜タイプA線維の微細構造

 1. 背景 32

 2. 材料と方法 34

 3. 結果 35

 4. 考察 39

結論 42

文献 43

要約

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、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、超微形態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。

AFMでは、試料はなるべく固く、平らで、なおかつ、基板に固着している必要がある。化学固定した蝸牛から蓋膜を単離し、化学処理した

硝子に液中で貼り付け、臨界点乾燥した。これにより、蓋膜は、固さを増し、さらに、微細構造が保存された状態で基板と強固に接着し、AFMでの観察が可能となった。

蓋膜下面の圧痕は、粒子像から構成されていて、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していると考えられた。圧痕の立体的構造は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していた。このことは、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。圧痕の深さは蝸牛の回転による差を示さず、一方、幅は差を示した。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。

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した。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。さらに、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。

緒言

内耳の蝸牛は、別名、迷路と呼ばれるように、解剖学的構築が複雑であり、高度に特殊化された聴覚器官である(図1)。空気の振動である音は鼓膜、耳小骨を経て、蝸牛のコルチ器で電気的信号に変換された後、聴神経を通じて中枢に伝えられる¹⁾。コルチ器の上を覆う蓋膜は、基板とともに電気的信号に変換する過程において重要な役割を担うと同時に、蓋膜下腔のコルチ器のイオン環境の制御にも関与しているとされている²⁾。蓋膜は、膜様の細胞外組織であり、部位によって異なった構造からなる機能的構築を示す。この膜は、生理機能とともに超微細構造の面からも近年盛んに研究されている^{3, 4, 5, 6, 7)}。

聴覚機構を理解するためには、蝸牛の機械的立体超微構築を知ることが不可欠である。蝸牛の微細構造を光学顕微鏡で研究した時代を経て⁸⁾、1950年代に透過型電子顕微鏡が応用されると、光学顕微鏡では確認できなかった感覚細胞の神経終末や細胞内小器官の超微細構造が観察されるようになり、蝸牛の微細形態学は飛躍的に発展した^{9, 10, 11)}。さらに1960年代後半に走査型電子顕微鏡が導入されると、透過電顕の薄切された切片上の二次元的な観察とはまた違った視点で三次元的な超微細構造を観察することが可能となり、蝸牛の微細形態学に新たな知見が加えられてきた^{12, 13, 14)}。これらの電子顕微鏡は現在、聴覚研究に欠かせない研究手法となっている。

一方、1986年にBinnigらにより従来の顕微鏡とは全く異なった原理をもつ原子間力顕微鏡(atomic force microscope, 以下AFM)が開発され

た¹⁵⁾。簡単にその原理を説明すると、AFMは従来の顕微鏡と異なり、レンズを持たず、代わりにカンチレバーの端に取り付けられた探針先端と試料原子との間に生じる原子間力を一定に制御しながら試料表面を走査して微細な表面構造を調べることができる。原子間力はあらゆる原子と原子の間に生じるので、試料の導電性を必要としない。電子顕微鏡では金属コーティングや電子染色で修飾された試料を観察するが、AFMでは試料表面を直接に画像化することができる。さらに、電子顕微鏡は電子線を飛ばすために試料が真空状態でないと観察できないが、AFMは大気中や、条件によっては液中でも観察することが可能である。従来の走査電顕と比べて、三次元的解像度が高いこと、さらに立体計測が可能であることも特徴である。実際に、導電性のない雲母など鉱物の三次元的原子像は、大気中でも観察可能である。

新しい研究手法が導入されることで、研究は大きく発展する。電子顕微鏡が聴覚研究に新たな局面を展開したように、AFMを蝸牛の微細形態学に応用することで、聴覚研究をさらに発展させることができると考える。

これまで、蝸牛をAFMで研究した報告はない。そこで、本研究では、まず蝸牛の微細形態学にAFMを応用するために、測定条件の設定および試料作成方法を開発した。ついで、AFMで蝸牛蓋膜の表面構造、とくに下面にある外有毛細胞感覚毛による圧痕の微細構造を、さらに蓋膜を構成する主要な線維であるタイプA線維の微細構造を観察した。

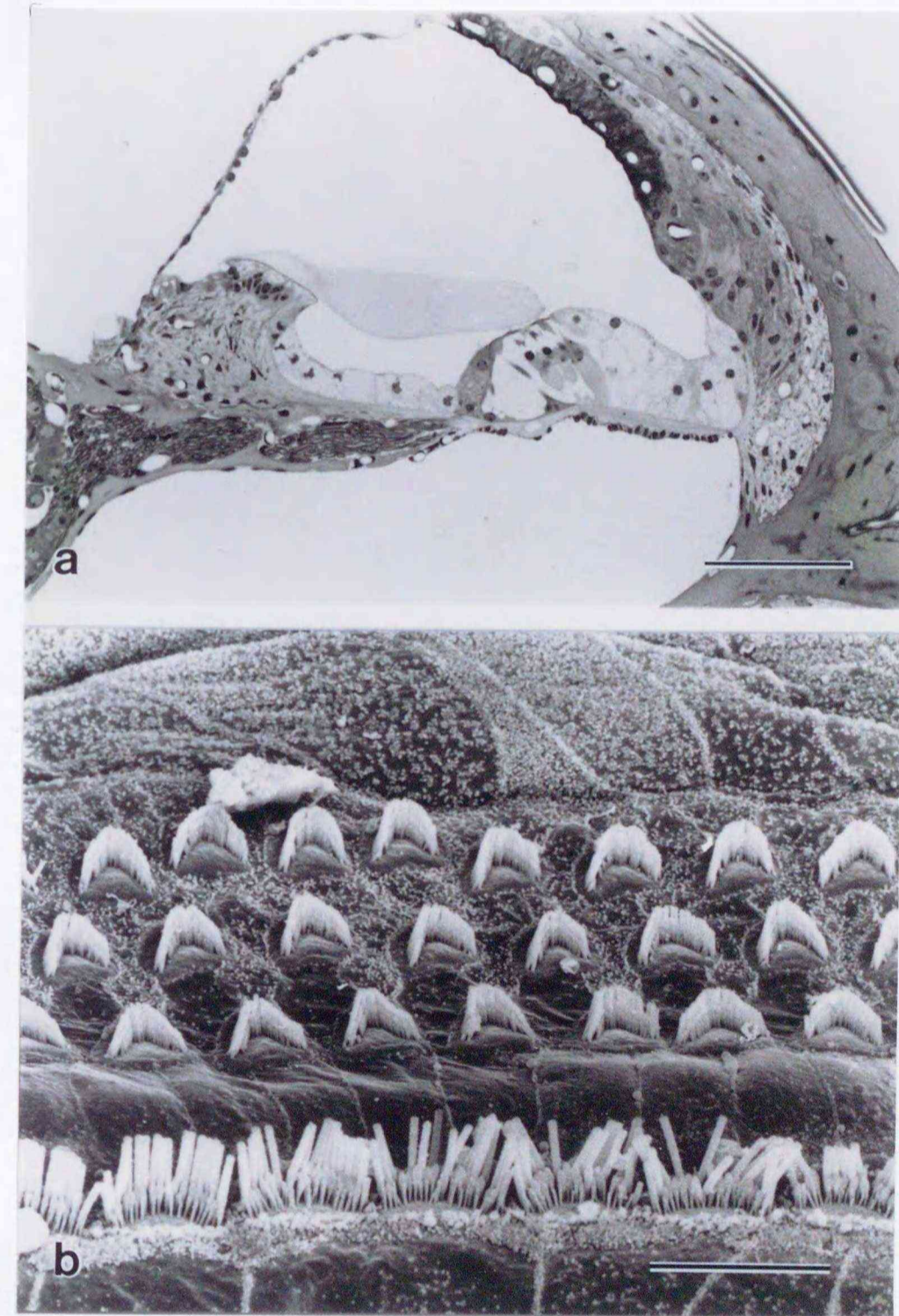


図1 マウス蝸牛

a：光顕像。蓋膜はコルチ器の上を覆っている。b：コルチ器の走査電顕像。コルチ器を覆っている蓋膜は取り除かれている。一列に配列する内毛細胞の感覚毛と、三列に配列するW字型の外毛細胞の感覚毛が認められる。スケールバーは(a) 50 μ m, (b) 10 μ m.

測定条件の設定および試料作成方法の開発

背景

生物学領域に電子顕微鏡が応用されて以来、様々な固定方法、包埋方法、薄切方法、乾燥方法などの試料作成方法が開発、改良され、やがて方法論として確立されてきた。それら確立された試料作成方法と電子顕微鏡自体の改良が相補的に互いの進歩を促し、電子顕微鏡は、生物学領域における欠くことの出来ない研究手段となっている。

AFMが電子顕微鏡のような研究手段となるためには、この顕微鏡が従来の顕微鏡とは全く異なる測定原理を持つことから、それに適した新しい試料作成方法の開発が必要である。とくに生物試料に関しては、電子顕微鏡のような確立された試料作成方法がまだない。そこで最初に、蝸牛の微細構造をAFMで観察するために、これに適した測定条件の設定と試料作成方法の開発をする必要があった。

AFMの測定に適した試料作成方法は、AFMの測定とカンチレバー探針の測定に伴う機械的動きとも関連する。そこで、はじめにAFMの測定原理を説明する¹⁶⁾。図2にAFMの基本的構成と測定原理のシェーマを示す。AFMはレンズの代わりに、カンチレバーの端に取り付けられた先端の鋭い探針を持つ。試料は、電圧をかけることで精巧に伸び縮みする圧電素子の上に載せられる。カンチレバーを試料に近づけていくとカンチレバー探針先端の原子と試料表面の原子との間に原子間力が生じる。原子間力が生じている状態で探針が試料表面を走査すると、表面の凹凸に従いカンチレバーが変位する。この変位量をカンチレバー背面に

反射させたレーザーの動きで検出し、圧電素子に適切な電圧を加えることで、圧電素子が伸び縮みして、試料とカンチレバー探針先端の原子間力が一定の状態に制御される。この圧電素子の変位量を、コンピュータが試料の高さ情報として取り込み、試料の表面構造を三次元的に画像化する。なお本研究では、顕微鏡としてSPA 300プローブユニット（セイコー電子工業）を、顕微鏡のコントローラユニットとしてSPI 3800プローブステーション（同）を用いた。

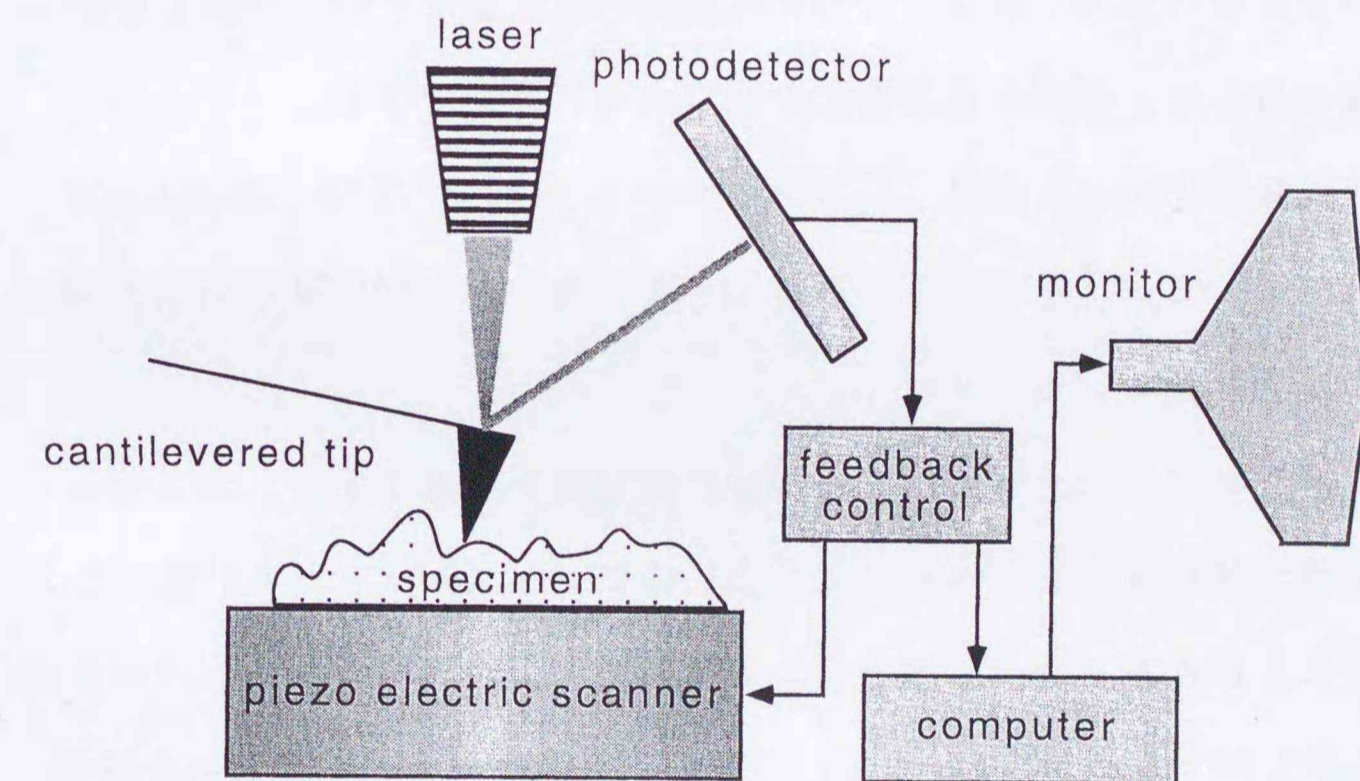


図2. AFMの測定原理のシェーマ。

測定中のカンチレバーの動きは、レーザー検出器で感知される。フィードバック回路を介して、圧電素子が伸び縮みすることで、カンチレバーと試料間の距離は一定に保たれる。

測定モードの選択

AFMには大きく分けて2種類の測定モードがある。カンチレバーが試料表面に接しながら測定する「コンタクトモード」と、柔らかい試料を観察するために開発された「サイクリックコンタクトモード」である(図3)¹⁷⁾。

「サイクリックコンタクトモード」ではカンチレバー探針を試料表面に周期的に接触させて測定する。カンチレバーを共振周波数で振動させながら試料表面に接するくらいに近づけていくと、原子間力によりカンチレバーの共振振幅が変化する。原子間距離が近づくに連れて、共振振幅の変位量は大きくなる。この共振振幅の変位量を一定に制御しながら走査することで試料の表面構造を測定することができる。

試料表面にかかる力は、「コンタクトモード」では50～数100 nNなのに対して、「サイクリックコンタクトモード」では0.1～1 nN程度と推測されている。

「コンタクトモード」で柔らかい生物試料を観察すると、カンチレバー先端が試料表面を引っかいてしまい像にノイズが生じたり、像にならないことが多かった。この場合、原子間力を斥力圏(カンチレバーを試料に押しつけた状態、図3-A)でなく、引力圏(カンチレバーを試料から表面から少し引き上げた状態、図3-B)で走査すると試料へのダメージは軽減したが、試料の凹凸が大きいと、走査中にカンチレバーが試料からはずれてしまうことが多かった。

そこで、カンチレバーが試料表面に与えるダメージが少ない「サイク

リックコンタクトモード」を選択した。このモードは柔らかい生物試料の観察には適していたが、カンチレバーの共振特性(Q値)が一定でないことと、試料により表面の物理特性が異なるため、最適な試料カンチレバー間の距離、共振振幅変位量などの計測条件を測定毎に設定し、測定した。

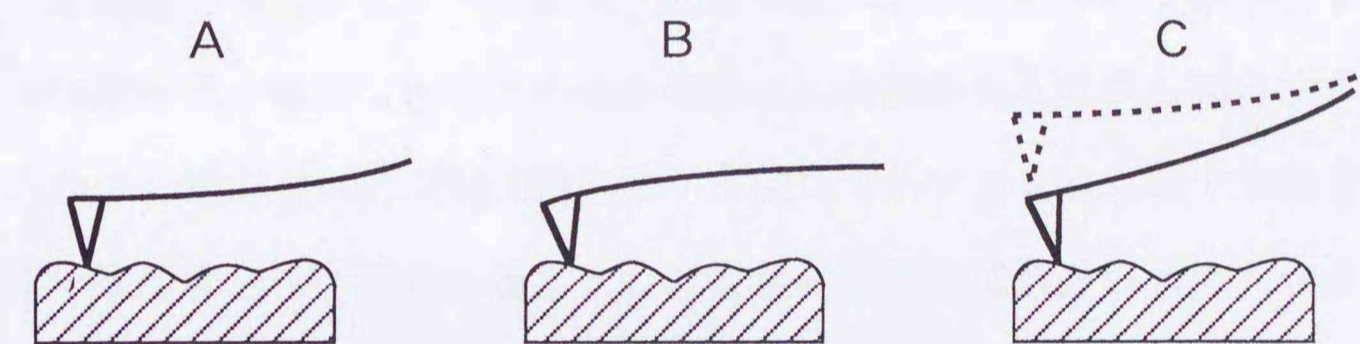


図3. 測定モードの概略図。

A, B: コンタクトモード. C: サイクリックコンタクトモード.

走査速度の設定

AFM画像は走査線と計測点（ピクセル）から構成される。それらが多いほど画像は精細になるが、一方で測定時間も長くなる。一般的には精細な画像を得るのに、500走査線×500ピクセルが目安である。最適な走査速度は測定する面積、試料の形状、固さなどに依存している。走査速度が速すぎると、カンチレバー探針が試料表面を正確に追従できない。時には試料と衝突して探針の先端の一部が破損することもある。

そこで、蓋膜表面を測定するのに最適な走査速度を、多くの試行をかさねたうえ、10マイクロ四方の画面なら1走査で4秒、1マイクロ四方なら1走査1秒に設定した。500×500（走査線×ピクセル）の画像を得るために、それぞれ約30分、10分かかった。一方、単離した蓋膜の線維を測定するには、1マイクロ四方で1走査0.5秒、約4分に設定した。

また、探針の先端が破損した場合には、画像に先端の形状を反映する人工的な偽の像が生じた。そこで、測定中は画像から探針先端の形状を常にモニターする必要がある。また像の解釈にも注意が必要で、カンチレバーを変えて再現性を確かめる必要がある。

試料作成方法の開発

AFMでは原子レベルの凹凸を識別できる。そのため、大きな凹凸は、ときに、探針が追従できないほどとなる。また、走査中に探針が試料の突出部に接触して、試料を動かすことになる。したがって、生物試料を観察するには、できるかぎり平坦で、固く、さらに基板にしっかりと固着している試料を作る工夫が必要である。すなわち、圧電素子は最大でも10マイクロメートル程度しか上下できないため、ある程度平坦な表面しか観察できない。また柔らかすぎる試料では、カンチレバーが試料表面を引っかいて、像にならない。基板にしっかりと固着していない試料は、走査中にカンチレバーにより、揺らされたり、はぎ取られてしまう。

ところで、蝸牛は各構成組織が複雑に組み合わせられている器官なので、そのままではAFMの観察に適さない。そのため、組織を単離して、基板に固着する必要がある。蓋膜は蝸牛の全回転にわたって、ラセン縁上からコルチ器の上を覆う形で帯状に存在している。実体顕微鏡下に蝸牛の骨壁を壊して、ライスネル膜を除くと、蓋膜が明視下に観察できた。蓋膜の一端を摘んでラセン縁から慎重に外していくと、全回転にわたって単離することが可能であった。蓋膜は比較的平坦な構造を示す点でAFMに適していたが、柔らかいため、カンチレバーにより表面が傷ついてしまい、像にならなかった。

そこで、蓋膜をグルタルアルデヒドで化学固定した。この処理により試料表面が硬くなり、カンチレバーによるダメージが減少した。

また、微細構造を保った状態で、強固に基板に貼り付ける工夫をする

必要もあった。蓋膜は生理条件下ではリンパ液中に存在する。そのため、液中で基板に貼り付けることにした。

AFMで生物試料を観察する際に問題となるのが、試料の固着性であり、様々な固着法が考案されている。IIIらはIgGを観察するためにニッケル処理した基板を用いて安定した像を得ることに成功している¹⁸⁾。彼らはIgGのCOOH末端とニッケルがキレート結合することで、安定した固着力を得たと考察している。またHorberらは単離した細胞をピペットで吸引して固定させて、細胞表面を高分解能で観察することに成功している¹⁹⁾。

試料の貼り付けに、シランやポリ-L-リジンのような化学的物質も用いられている²⁰⁾。シランでスライドガラス表面を化学処理するとシランの持つ2種類の官能基がそれぞれスライドガラス表面、生物試料と化学結合するため結果として試料をスライドガラスに貼り付けることができる。ポリ-L-リジンでスライドガラス表面を化学処理すると、スライドガラス表面はプラスに荷電される。生物試料はマイナスに荷電しているため、荷電されたスライドガラス表面と結合する。

スライドガラスを化学処理する際に、シランやポリ-L-リジンの濃度を上げると、接着力はある程度増したが、シランでは4%、ポリ-L-リジンでは1%以上に濃度を上げてても接着力は変化しなかった。そこで、乾燥して、接着力を強める必要があった。

試料の乾燥法には、大きく分けて、大気中で自然乾燥する方法と乾燥の際に試料表面に表面張力が生じない様にする方法の二つがある。自然

乾燥法は手技が簡単な反面、乾燥の過程で試料が変形しやすい。単離した蛋白分子²¹⁾やDNA^{22, 23)}をAFMで観察した報告の多くは、試料を自然乾燥している。これは、微小な試料では乾燥による変形がそれほど目立たないためと考えられる。蓋膜のような柔らかい組織を自然乾燥すると、乾燥の過程で生じる表面張力により、表面微細構造は変形する。

臨界点乾燥法は乾燥の過程で表面張力が生じないように乾燥する方法で、走査電顕の試料作成方法として汎用されている²⁴⁾。蓋膜は、臨界点乾燥を用いることで、微細構造がよく保存され、基板との固着力が高まった。

そこで、今回の試料を、4%シラン溶液または1%ポリ-L-リジン溶液で化学処理したスライドガラスに液中で蓋膜を貼り付け、臨界点乾燥することにした。

小括

1. 測定モードは「サイクリックコンタクトモード」を用いることで、カンチレバーによる試料へのダメージを減らすことが可能であった。しかしながら、測定毎に最適な試料カンチレバー間の距離、共振振幅変位量などの計測条件を設定する必要があった。

2. 蓋膜表面を測定するのに最適な走査速度は10マイクロ四方の画面なら1走査で4秒、1マイクロ四方なら1走査1秒に設定した。500×500（走査線×ピクセル）の画像を得るために、それぞれ約30分、10分かかった。一方、単離した蓋膜の線維を測定するには、1マイクロ四方で1走査0.5秒に設定し、約4分かかった。

3. AFMで蝸牛組織を観察するには、各構成組織を単離し、基板に貼り付ける必要があった。蓋膜は単離が可能であり、また比較的平坦な構造を持つという点で、AFMでの観察に適していた。

4. 化学固定した蓋膜を、表面を化学処理したスライドガラスに液中で貼り付け、臨界点乾燥することで、蓋膜に硬さが生じ、また基板とも強固に固着して、AFMでの蓋膜微細構造の観察が可能になった。

蓋膜の表面微細構造

-とくに蓋膜下面の外有毛細胞による圧痕の微細構造について-

背景

コルチ器を構成する有毛細胞の頂部には感覚毛がある。感覚毛は階段状に整然と配列し、外側に向かうに連れて次第に背が高くなる。外有毛細胞の感覚毛群はVないしW字型の配列をし、底面が外側を向いている（図4）。その上を蓋膜が覆う。基底板に乗るコルチ器とその上を覆う蓋膜の位置関係がずれることで、有毛細胞の感覚毛は屈曲し、それを契機として有毛細胞は興奮する²⁵⁾。効率よくコルチ器と蓋膜の変位が感覚毛に伝わるためには、蓋膜下面と感覚毛が結合している必要がある。蓋膜下面を走査電顕で観察すると、Hardestyの膜(Hardesty's membrane)と呼ばれる外有毛細胞の上方に位置する無構造な膜様組織に、外有毛細胞感覚毛の配列と同じW字型の圧痕が常に観察される^{26, 27)}。このことは、外有毛細胞感覚毛群の最も背の高い、外側の感覚毛の先端が蓋膜下面に刺入していることを間接的に証明し、その結合が聴覚機構に重要な役割を担うことを示唆している。

ところで、蝸牛では、低い周波数の音には頂回転のコルチ器が反応し、高い周波数の音には基底回転のコルチ器が反応する。これを蝸牛の周波数選択性という。蝸牛には回転による解剖学的構造の差があり、これが周波数選択性に関与していると考えられている^{28, 29)}。すなわち基底回転から頂回転に向かうに連れて、基底板は広く薄くなり、蓋膜は大きくなり、外有毛細胞も大きくなる（図5）。しかしながら、蓋膜と外有

S.HIYAMA

毛細胞の結合様式に蝸牛の回転による差があるのかは未だ不明である。それは試料作成の過程で蓋膜がしばしば収縮するため、有毛細胞と蓋膜の本来の位置関係が確認できないことも一因である。そこで、蓋膜の表面微細構造、特に蓋膜下面の外有毛細胞感覚毛による圧痕の微細構造をAFMで観察し、その三次元的構造および立体計測から外有毛細胞感覚毛と蓋膜の機能的結合様式を検討した。

内耳蓋膜微細構造の原子間力顕微鏡による観察

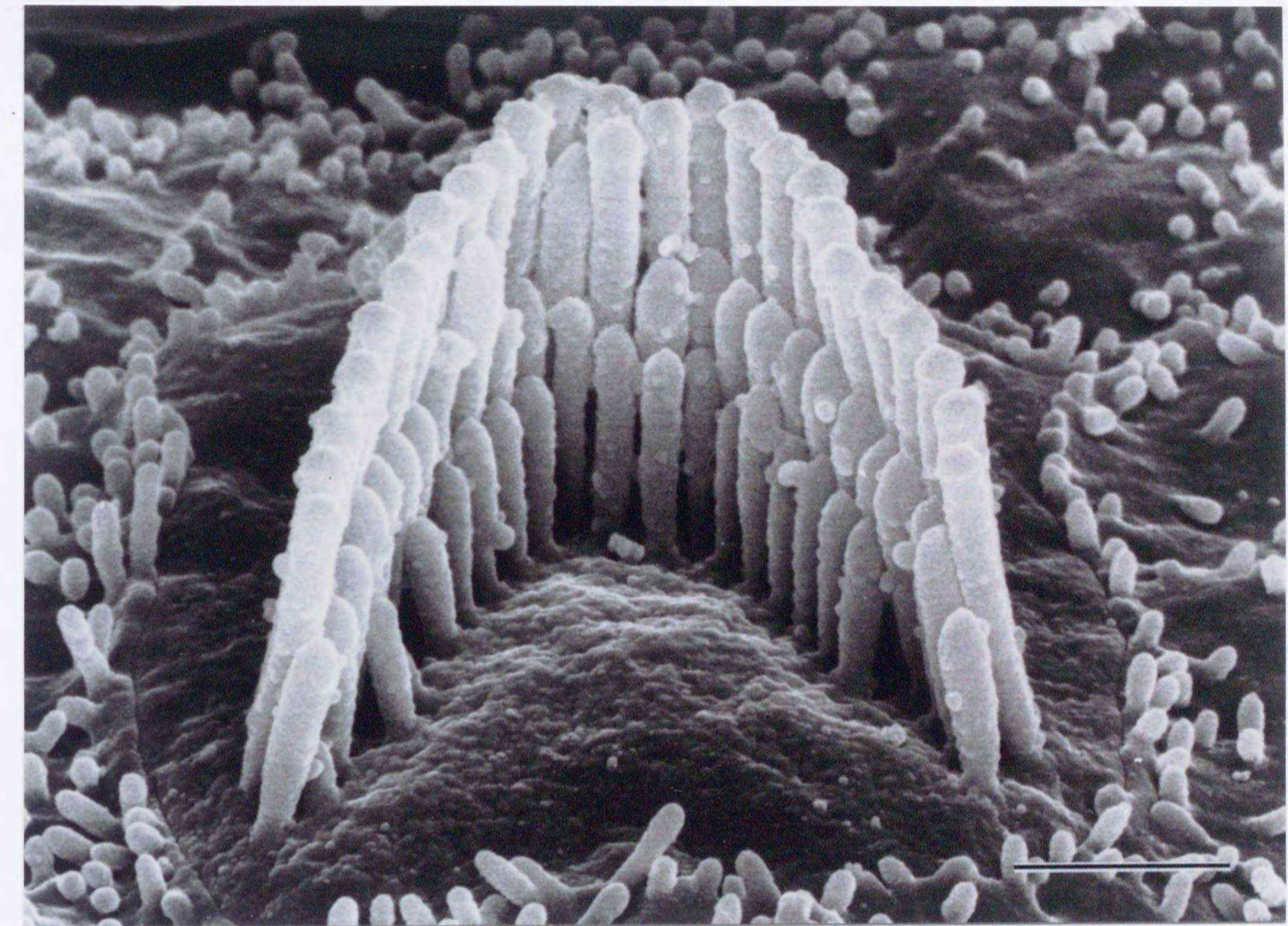


図4. 外有毛細胞感覚毛の走査電顕像。
外有毛細胞頂部の感覚毛は階段状に3列に並んで、W字型に配列する。スケールバーは1 μm 。

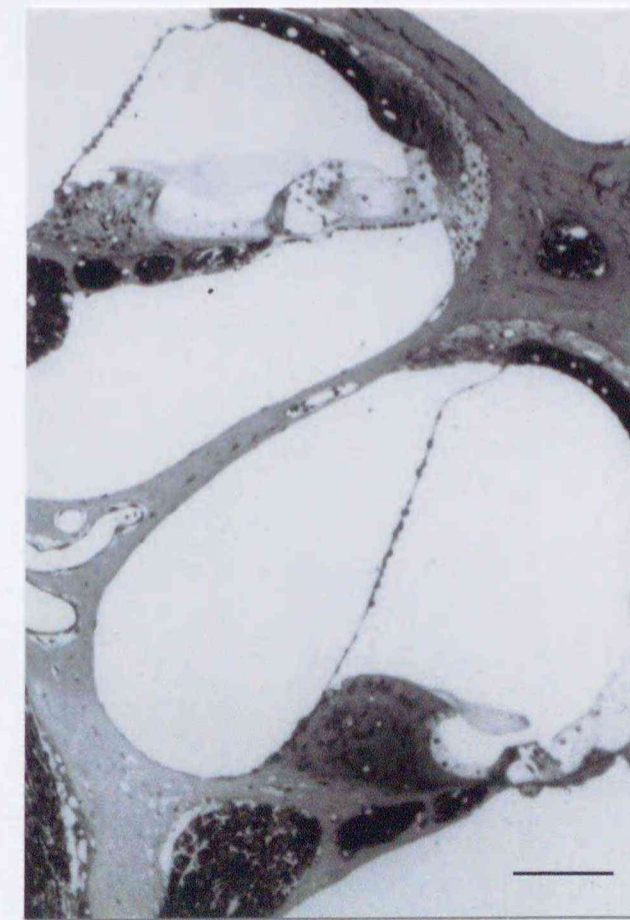


図5. マウス蝸牛断面の光顕像。
基底回転と頂回転。蝸牛は回転による解剖学的構造の差を示す。スケールバーは50 μm 。

材料と方法

成熟dd-マウス (n=5) を用いた。ジエチルエーテルにて深麻酔後、2.5% グルタルアルデヒド-0.1 M リン酸緩衝液で左心室より灌流固定した。実体顕微鏡下に蝸牛を摘出し、前庭窓、および蝸牛窓から蝸牛内に同固定液を灌流固定した。さらに同固定液中で6時間固定後、蓋膜を蝸牛から慎重に摘出した。ポリ-L-リシン処理したスライドガラスに貼り付け、エタノール系列による脱水後、酢酸イソアミルに置換したのち、臨界点乾燥し大気中で観察した。

測定モードには「サイクリックコンタクトモード」を用いた。

圧痕の幅、深さの計測および統計学的解析は以下の方法で行った。マウスの蓋膜は下方回転から頂回転に向かうに連れて、フック部分と1.5回転する部分で構成される(図6)。そこで1.5回転の部分で6区画に分け、下方から第1、第3、第5区画の三区画をそれぞれ基底回転、中回転、頂回転と定義して、各区間で第一列外有毛細胞に相当する30個の圧痕を測定した。圧痕の幅と深さの計測は、AFM画像をSPI 3800内蔵ソフトで処理して得られた各圧痕の断面像からそれぞれ計測した。

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。

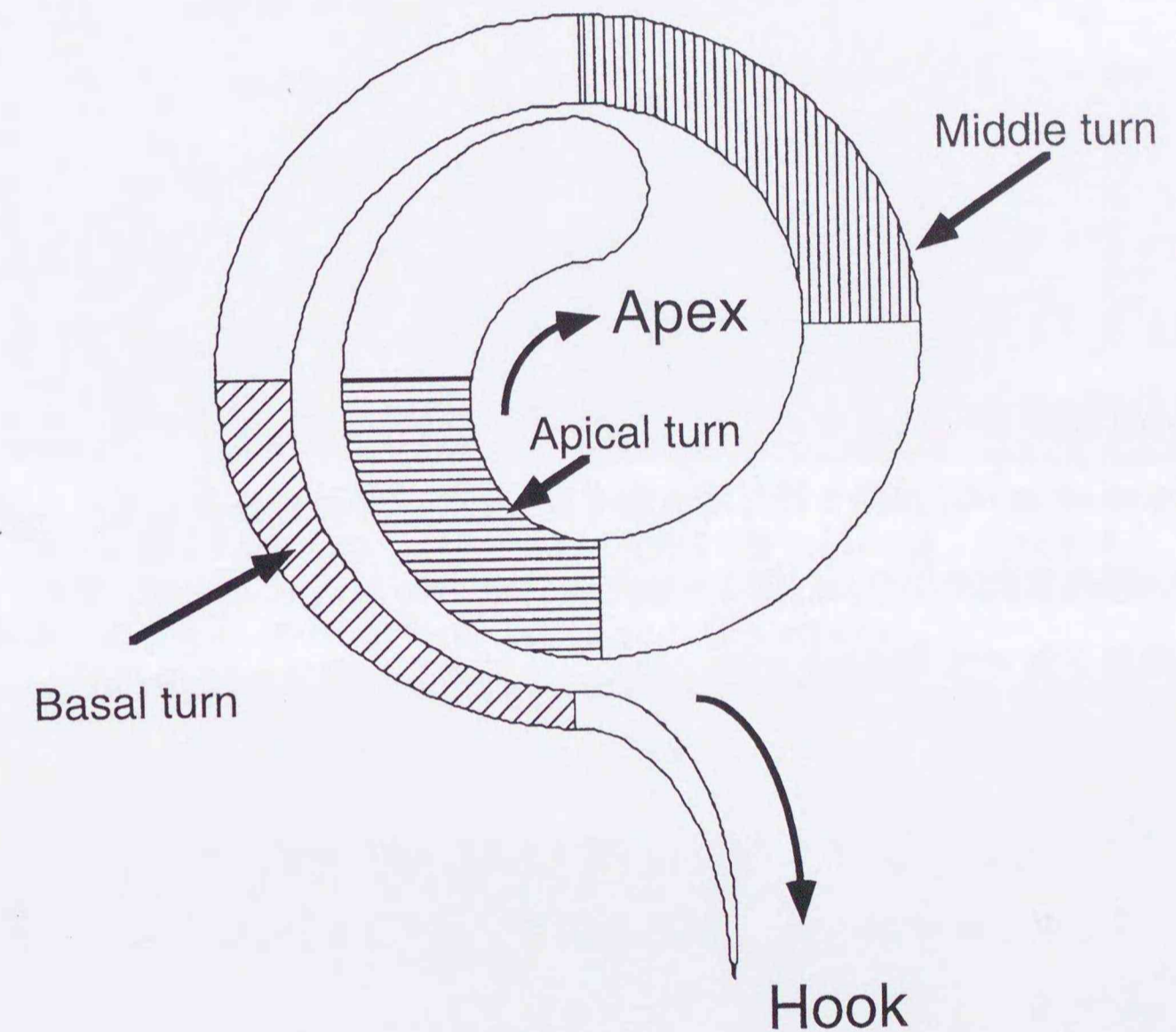


図6. マウス蓋膜のシェーマ。
マウス蓋膜はフック部分と1.5回転する部分から構成される。基底回転から、頂回転に向かうに連れて蓋膜の幅は広くなる。

結果

蓋膜の上面をAFMで測定すると、線維層 (fibrous layer) の、主に放射状に走行する線維構造と、その上を網様に覆う被覆網 (covering net) が明瞭に画像化された (図7)。Covering netは主に太さ1から2 μm の太い線維からなり、途中、200から400nmの細い線維を分枝し、それらの分枝した線維は、太い線維を連結する形で、fibrous layerの表面に複雑な格子を形成していた。拡大して観察すると、この線維はさらに微細な太さ約50nmの線維の束からなり、これら細線維は、格子の下のfibrous layerの細線維と移行する像もみられた。その線維表面には不規則は凹凸が認められた (図7)。

蓋膜下面には内側から外側に順に、上面でも観察された fibrous layer が露出した部分、内有毛細胞の上部に位置する帯状に隆起したHensen条、外有毛細胞の上部に位置するHardesty's membraneが観察された。

Hardesty's membraneは微細な線維から構成されていた。線維の走行は一定の方向を示さず、ときに線維同士が錯綜して走行していた (図8)。これらの線維を詳細に観察すると、線維にそって、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。さらに、その数珠つなぎの粒子の周囲に、同じ大きさの粒子が散在するのを認めた (図8)。

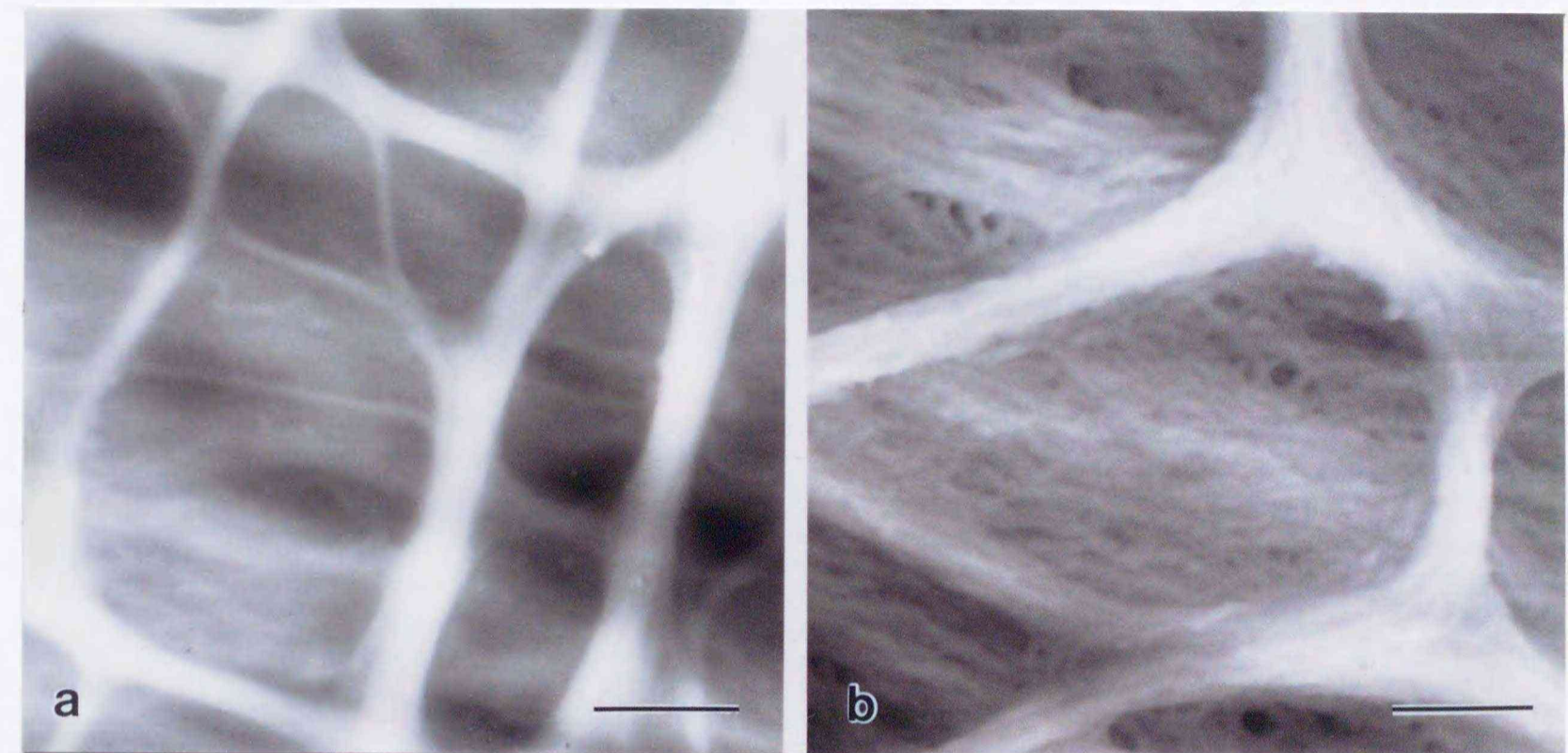


図7. 蓋膜上面のAFM像。

a:放射状に走行するfibrous layerとその上を網様に覆うcovering netを認める。
b:拡大像. fibrous layerとcovering netは微細な線維からなり、その線維表面は不規則な凹凸を示す。スケールバーは (a) 2 μm , (b) 100 nm.

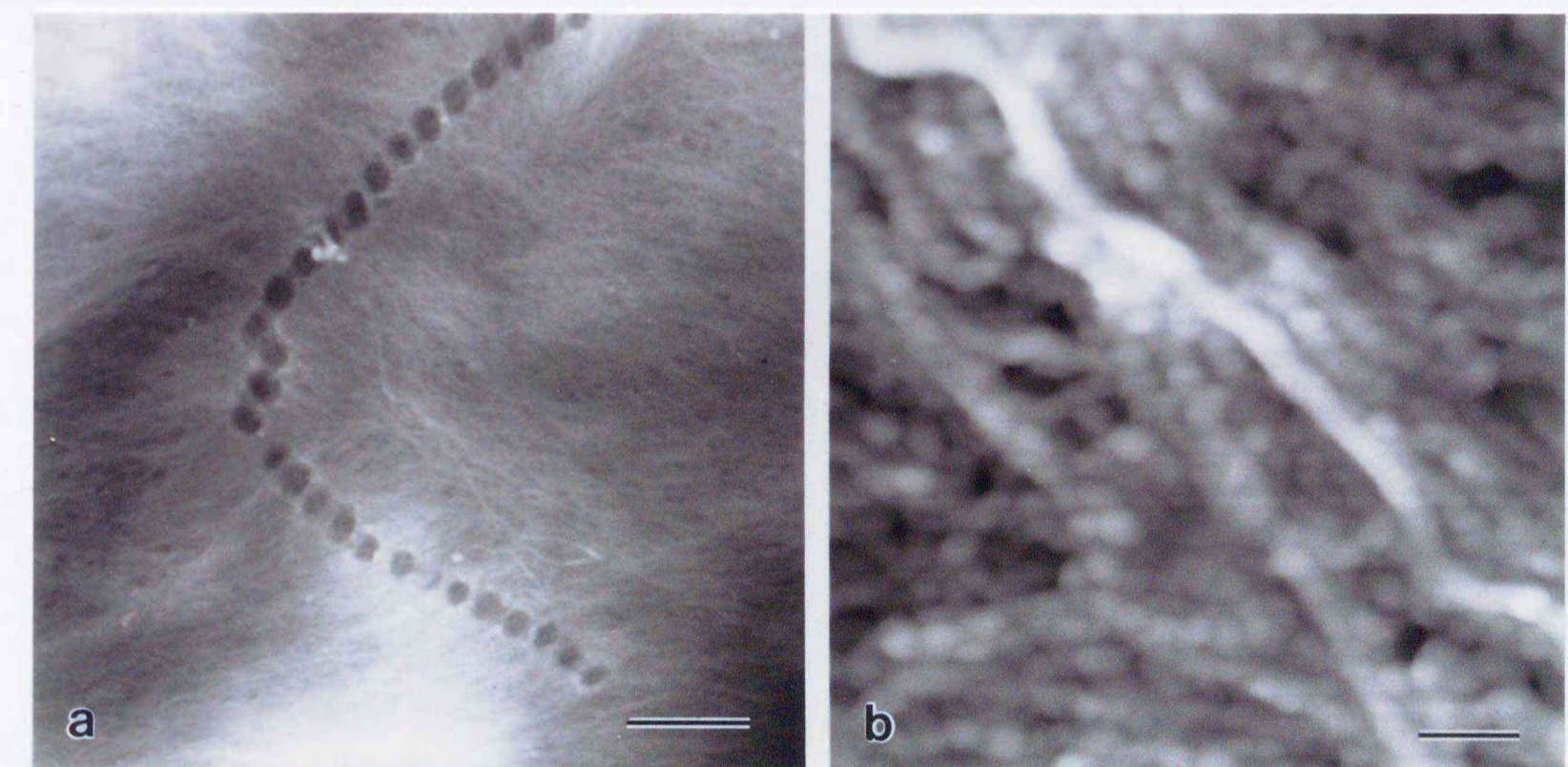


図8. 蓋膜下面のAFM像。

a:Hardesty's membraneは、微細な線維構造を示す。外有毛細胞感覚毛と同じ配列を示すW字型の圧痕が明瞭に観察される。b:aの拡大像。Hardesty's membraneは粒子像で構成され、主に数珠つなぎの配列を示す。スケールバーは (a) 1 μm , (b) 100 nm.

内毛細胞感覚毛による圧痕は、Hensen 条周囲には観察されなかった。Hardesty's membraneには常に外毛細胞感覚毛群の最外側の感覚毛と同じ配列を示すW字型の圧痕が認められた(図9)。各圧痕は深さ、大きさともに均一でないように観察された。基底回転から頂回転に向かうに連れて、圧痕の配列はW字の底辺の角度が鋭角になり、頂回転ではV字型の配列を示すこともあった。この配列の変化は外毛細胞感覚毛の配列の回転による変化と一致した。

圧痕をさらに高倍率で観察すると、圧痕の周囲や内側壁は径 20 から 50 nmの粒子像からなるのが観察された。前述した数珠状の粒子像と比べて、圧痕を構成する粒子像は規則的な配列を認めず、また、密に存在していた。圧痕は周縁がやや突出するクレーター様の構造をしていた(図9)。

圧痕の断面像は辺縁が盛り上がり、底面はでこぼこした状態だった(図10)。

断面像から得た圧痕の幅と深さは以下のとおりだった。

幅は基底回転、中回転、頂回転においてそれぞれ、 267.3 ± 18.9 、 329.9 ± 27.1 、 351.9 ± 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(図11)。

一方、深さは各回転でばらつきがあり、基底回転、中回転、頂回転においてそれぞれ、 42.5 ± 14.7 、 47.6 ± 13.1 、 52.3 ± 12.6 (平均±標準偏差) nmであり、各回転で統計学的に有意差を示さなかった(図12)。

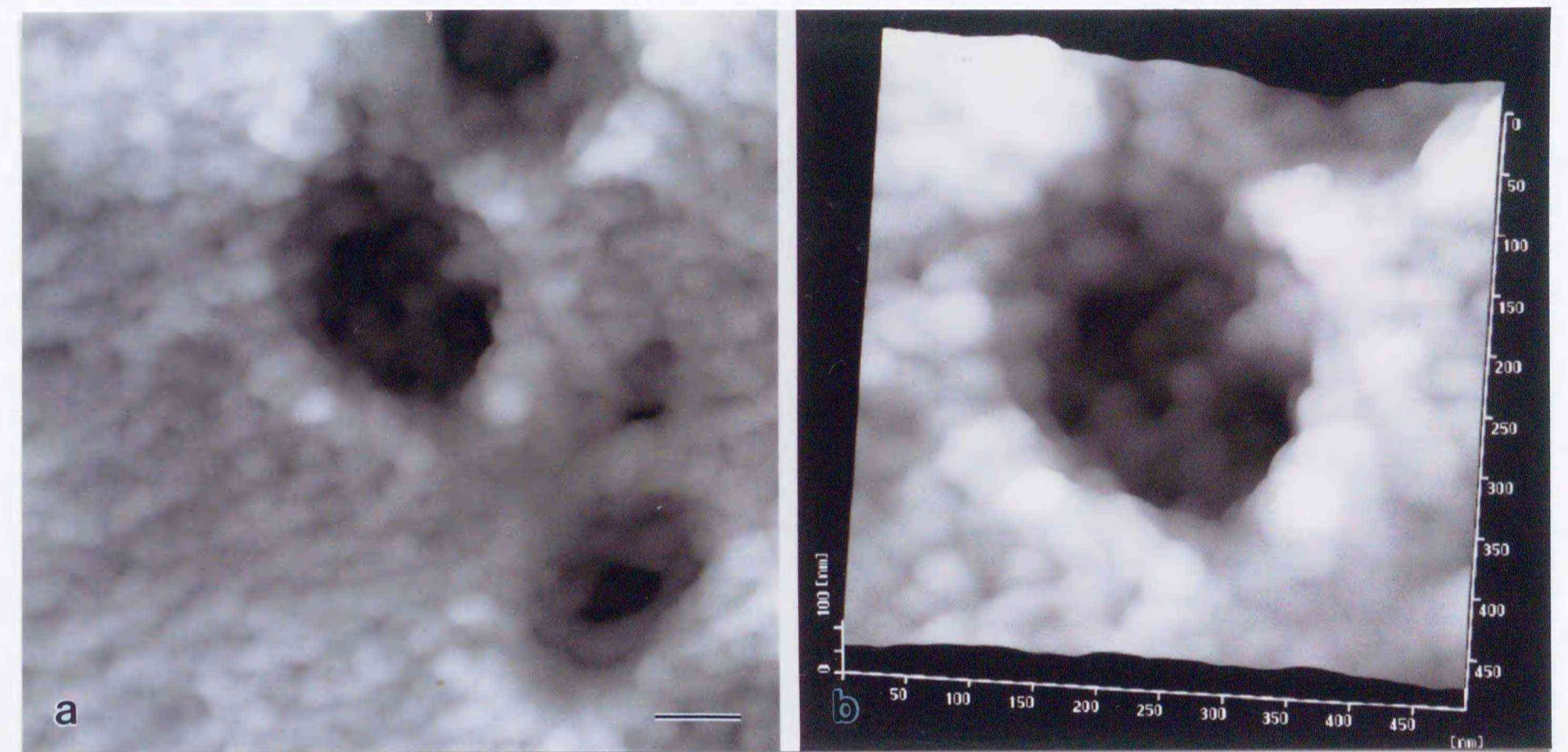


図9. 圧痕のAFM像。

a: 圧痕の周囲および内側壁は粒子像から構成される。粒子像は規則的な配列を示さない。b: aの拡大像。三次元画像。圧痕はクレーター様の構造を示す。スケールバーは(a) 100 nm。

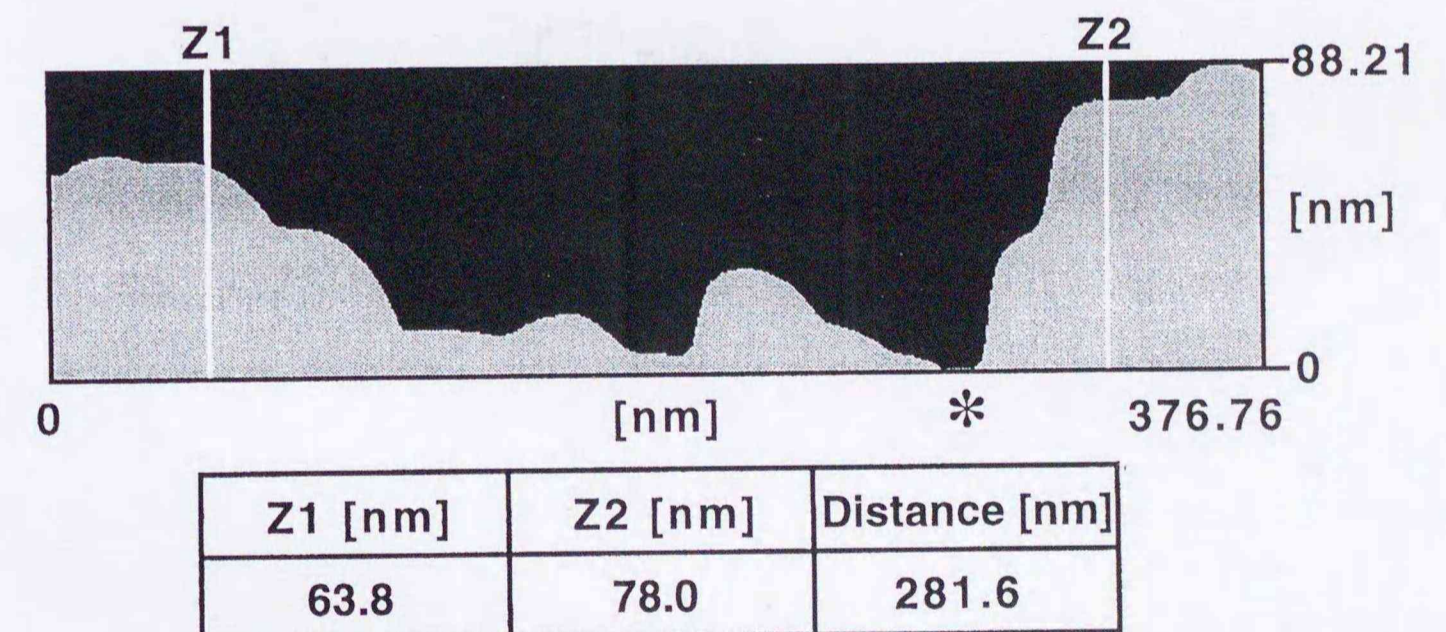


図10. 圧痕の断面像。

圧痕の縁をz1, z2として圧痕の底*との高低差の平均をこの圧痕の深さとし、z1, z2間の距離を圧痕の幅とした。この図では63.8 nmと78.0 nmの平均70.9 nmが深さ、281.6 nmが幅となる。

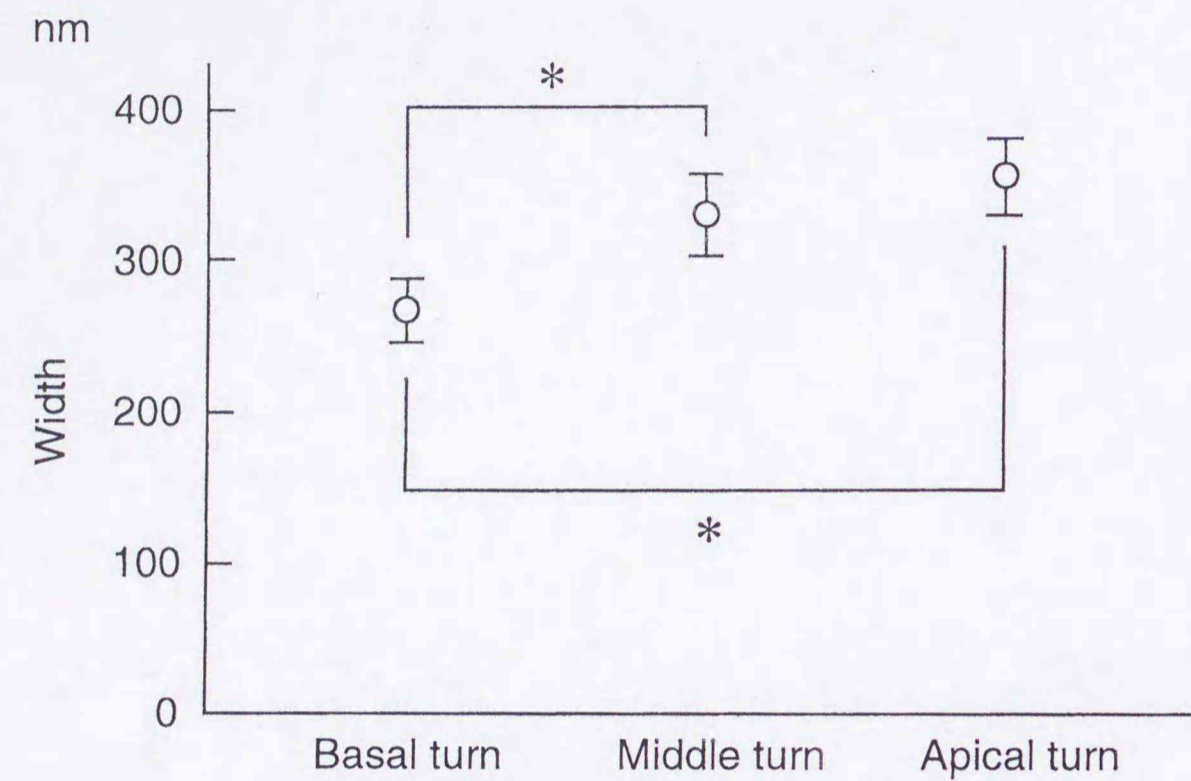


図11. 圧痕の幅.
各回転で統計学的に有意差を示す (* : $p < 0.01$).

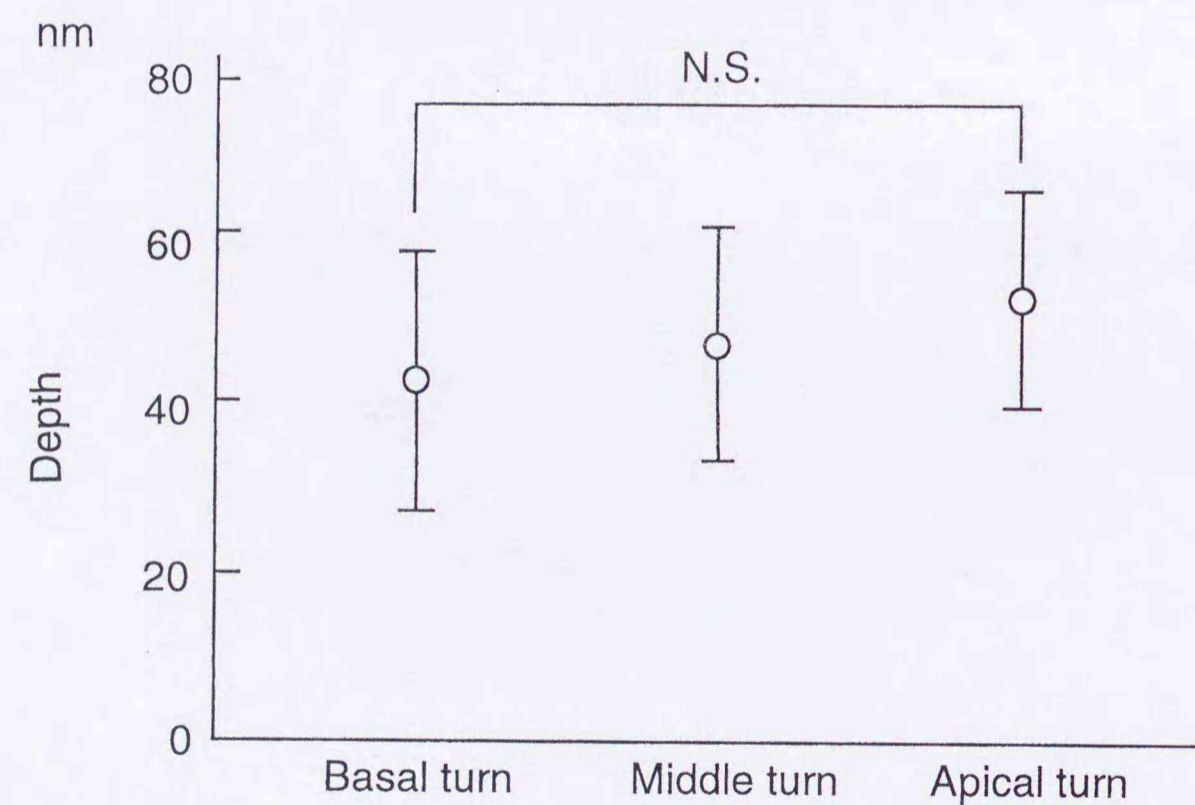


図12. 圧痕の深さ.
各回転で統計学的に有意差を示さない.

考察

外有毛細胞感覚毛と蓋膜が常に結合していることから、この結合は、蝸牛の周波数選択性において重要な役割を担っていると考えられている²⁹⁾。しかしながら、その結合の詳細に関しては未だ充分には明らかにされていない³⁰⁾。

本研究ではその機能的結合様式を、蓋膜下面の圧痕のAFMによる三次元的観察と立体計測から検討した。AFMは試料に金属コーティングを施す必要がないため、走査電顕とくらべて、試料表面を直接観察することができる。とくに金属コーティングによる試料の厚みがないので、AFMで得られた深さに関する計測値は信頼性が高い³¹⁾。

従来、走査電顕で観察されたように、蓋膜下面には外有毛細胞感覚毛と同じ配列を示す圧痕が観察された。圧痕の幅は基底回転から頂回転に向かうに連れて、広くなり、統計学的にも有意差を認めた。この結果は外有毛細胞感覚毛が基底回転から頂回転に向かうに連れ太くなる傾向を示すことに一致する。その一方で、圧痕の深さは、幅と異なり、各回転で統計学的有意差を示さなかった。以上の結果は、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。また、蓋膜下面に刺さる外有毛細胞感覚毛の幅の変化は、周波数選択性に寄与しているが、その刺さる深さに関しては関与していないことを示唆する。

蓋膜と外有毛細胞感覚毛の結合の強さがその接合の面積に依存すると仮定すると、基底回転における蓋膜と外有毛細胞感覚毛の結合は頂回転

に比べ、緩やかであるといえ、このことは加齢による難聴が高周波数領域から始まることを一面で説明するのかもしれない³²⁾。従来、蝸牛の加齢による形態変化としては、外有毛細胞が基底回転においてまず消失し、その変化は時間と共に頂回転に進んでいき、遅れて内毛細胞も同様の経過をたどるとされている³³⁾。ラセン神経節も基底回転から頂回転に加齢による変化が進行するとされている³⁴⁾。一方で蓋膜の加齢による形態的变化は、有毛細胞やラセン神経節に比べてそれ程著明でないとされている³⁵⁾。しかしながら、前述したとおり、試料作成の過程で蓋膜と外有毛細胞との結合状態が保存しにくいことから、この結合に関しての加齢の変化に関して検討した報告はなく、今後の検討を要する。

川端らは、走査電顕の反射電子から試料を立体計測する装置を用いて、モルモット蓋膜の圧痕の深さを計測している³⁶⁾。彼らは本研究のように蝸牛の回転による差を検討しないで、第2回転の圧痕の計測値のみを報告している。それによると、第2回転の圧痕の深さは平均25 nm程度だったと報告されている。私たちがマウスで得た値と比べて浅く、マウスより大きなモルモットの圧痕が浅く計測されたのは、試料の金属コーティングにより、実際の深さよりも浅くなったためと考えられる。

走査電顕を用いたLimの報告などから、蓋膜下面のHardesty's membraneは無構造な膜様物とされていた²⁶⁾。しかし、今回AFMで詳細に観察した結果、Hardesty's membraneは圧痕が20から50 nmの粒子像が密に存在し、それ以外の部位は粒子が数珠つなぎになっているのが認められた。組織化学的研究からHardesty's membraneは糖蛋白やプロ

テオグライカンなどの糖関連物質からなることが知られており、感覚毛と蓋膜の結合やコルチ器のイオン環境に関与していると考えられている^{37, 38, 39)}。今回認めた粒子像はこれら糖関連物質の立体構造と分布を表していると考えられる。AFMを用いることで、Hardesty's membraneを構成する糖関連物質の配列や形態の特徴を余計な修飾なしに観察することができたと考える。さらに圧痕を三次元的に詳細に観察すると周囲が盛り上がったクレーター状の構造を示した。以上の結果は、感覚毛と蓋膜との機能的結合形態を示している。すなわち、感覚毛の刺さる部位は、糖関連物質が多く、さらに盛り上がって分布していて、しっかりと感覚毛を固着させる機能的構築を示している。

内毛細胞の感覚毛と蓋膜下面の接着状態に関しては、いまだ一致した結論が得られていない。仔猫⁴⁰⁾、ラット⁴¹⁾に関しては圧痕として観察されたとする報告がある一方で、マウス、モルモットなどでは認めないと報告されている²⁶⁾。いずれにしても、外有毛細胞感覚毛と蓋膜の結合よりはゆるやかであると考えられている⁴²⁾。今回AFMを用いた観察においても、内毛細胞の上に位置するHensen条周囲に圧痕は認められなかった。種差があるのか、それとも試料作成方法に問題があるのか今後の課題と考える。

蓋膜タイプA線維の微細構造

背景

蓋膜は、分枝しないで直線的に走行する微細な線維と、それを埋める糖蛋白などの糖関連物質から構成される⁴³⁾。径 10 nmの微細線維はタイプA線維と呼ばれ、その本態は、生化学的研究^{44, 45)}、免疫組織学的研究⁴⁶⁾から主に2型コラーゲンであるとされているが、形態学的にはいまだ十分には確認されていない。

コラーゲン分子は縦にずれながら重合して線維を形成する。コラーゲン分子の密度が低いところと、密度が高いところが周期的に並ぶため、結果として、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70 nmでD周期と呼ばれる(図13)⁴⁷⁾。2型コラーゲンは、1型、3型コラーゲンと共にD周期を示す。超微形態学的にD周期をもつ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⁴⁸⁾。

電子顕微鏡を用いたタイプA線維に関する形態学的研究は、その太さに関しては10から20 nmでほぼ一致するものの、その周期性に関しては、電子染色の時間を1時間から12時間に延長することで7 nm周期の縞模様を認めたとする報告(図14)⁴³⁾、ネガティブ染色で12 nmの周期的な縞模様を認めたとする報告⁴⁹⁾、フリーズエッチングレプリカ法で軟骨の2型コラーゲンに太さや外観が似ていたが、縞構造は認めなかったとする報告⁵⁰⁾など、コラーゲンのD周期に一致しない。これは電子顕微鏡の複雑な試料作成方法、染色方法、および解像度が影響していると思われる。そこで本研究では、ネガティブ染色、レプリカ、電子染

色などで修飾されていない蓋膜タイプA線維の表面微細構造をAFMで観察し、超微形態学的解析からその本態を検討した。

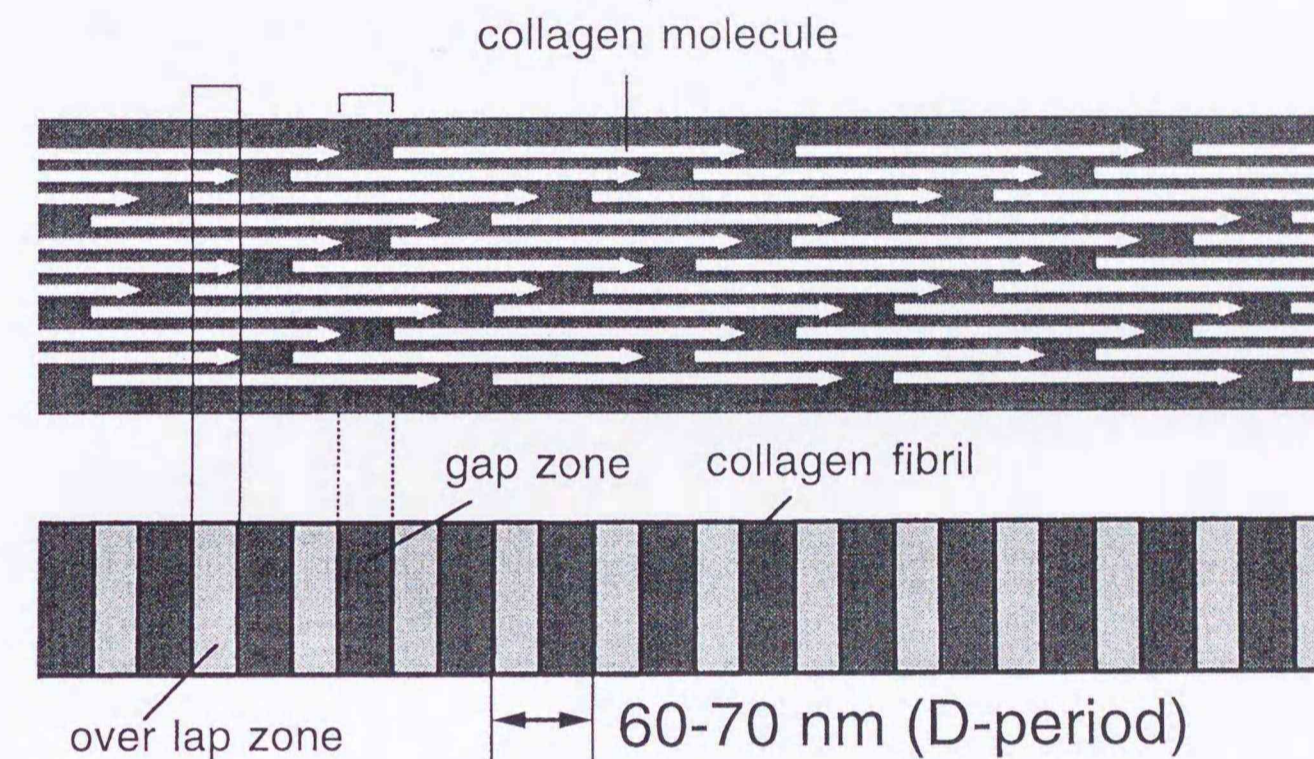


図13. コラーゲン線維の分子構造のシェーマ。

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。分子の密度が高いところと低いところが交互に並ぶため結果として、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70 nmでD周期と呼ばれる。

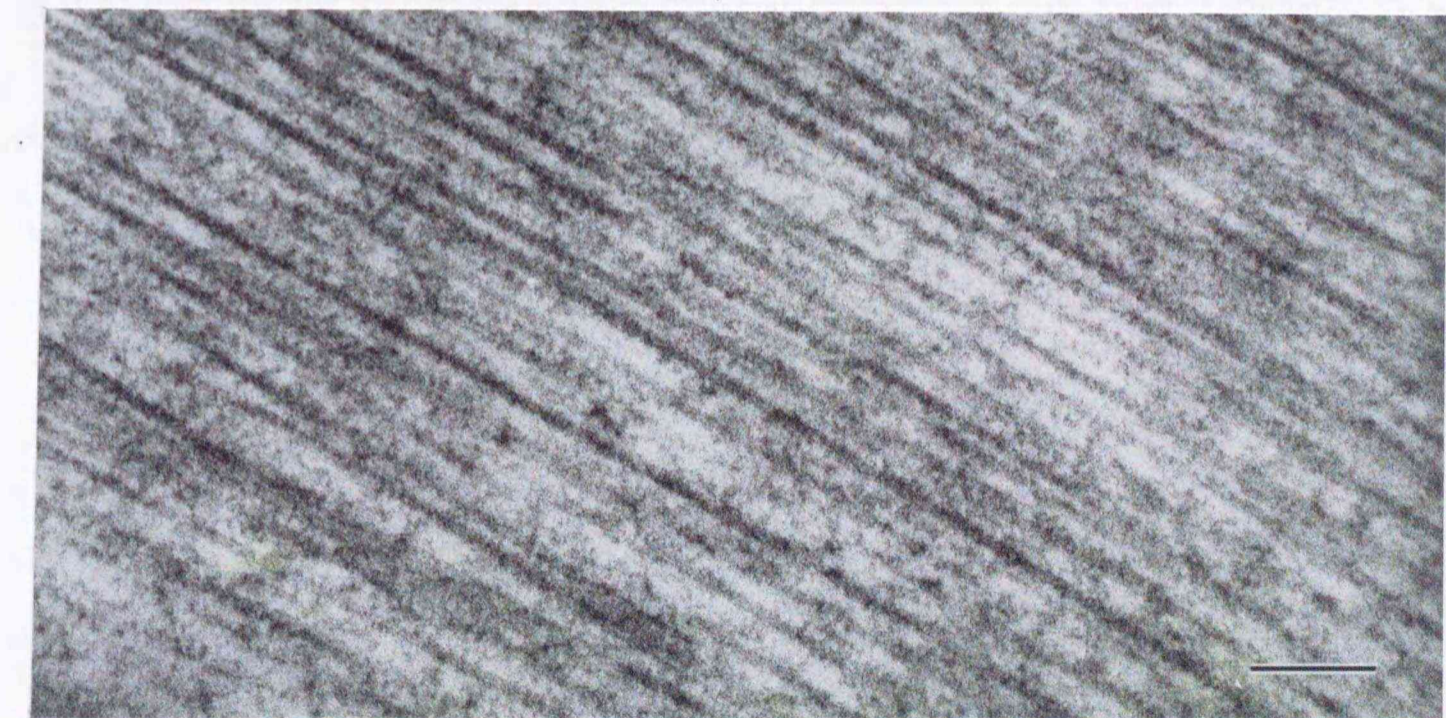


図14. 蓋膜タイプA線維の透過電顕像。

ほぼ平行に走行するタイプA線維は、かすかに縞構造を示す。スケールバーは100 nm。

材料と方法

材料として 10 匹の成熟 dd マウスを用いた。ジエチルエーテルにて深麻酔後、2.5% グルタルアルデヒド-0.1 M カコディレート緩衝液で左心室より灌流固定した後、実体顕微鏡下に蝸牛を摘出し、前庭窓、および蝸牛窓から蝸牛内に同固定液を灌流固定、同固定液中でさらに 2 時間固定後、蓋膜を蝸牛から摘出した。機械的に蓋膜を小片化したあと、シラン処理したスライドガラスに貼り付け、1% トライトン X-100 で 10 分間フラッシング。アルコール系列で脱水後、臨界点乾燥、大気中で観察した。

測定モードとしては、「サイクリックコンタクトモード」を用いた。

画像モードとしては共振させたカンチレバーの走査中の振幅の変化を画像化する高さモードと走査中の振動数の変化を画像化する変位モードを用いた。高さモードでは試料の正確な高さ情報が得られ、変位モードでは高さモードでは明瞭でなかったり、示されない試料表面の微細な凹凸の変化が示される⁵¹⁾。

線維の太さ、高さなどの各計測値は、AFM 画像を S P I 3800 内蔵ソフトで処理して得られた線維の断面像を用いて計測した。

結果

高さモードの観察

小片化された蓋膜の表面は、ほぼ均一な太さを持つ線維で構成されていた。線維は分枝することなく、ほぼ平行に走行していた。拡大をあげて観察すると、線維間および線維表面には径 20 から 50 nm の粒子構造を認め、その線維表面には不規則な凹凸が認められた (図 15)。

小片化された蓋膜の辺縁では、線維の密度は疎となり、その線維の末梢はスライドガラス上に単離された形で観察された。この単離された線維を拡大を上げて観察すると、表面はほぼ平滑で、上述の粒子構造は認められなかった。そして、周期的な明るい部分と暗い部分からなり、その境界は不明瞭であった (図 16)。

表面の輪郭が強調されるように三次元画像化すると、線維の表面構造は規則的な凹凸を示した (図 16)。

断面像による解析では、凹凸からなる周期性を示し、その周期は $69.1 \pm 0.6 \text{ nm}$ ($n=50$, 平均 \pm 標準偏差) だった。凹凸の高低差は $1.6 \pm 0.3 \text{ nm}$ だった (図 16)。線維の太さは $38.2 \pm 4.2 \text{ nm}$, 高さは $10.8 \pm 0.5 \text{ nm}$ だった。

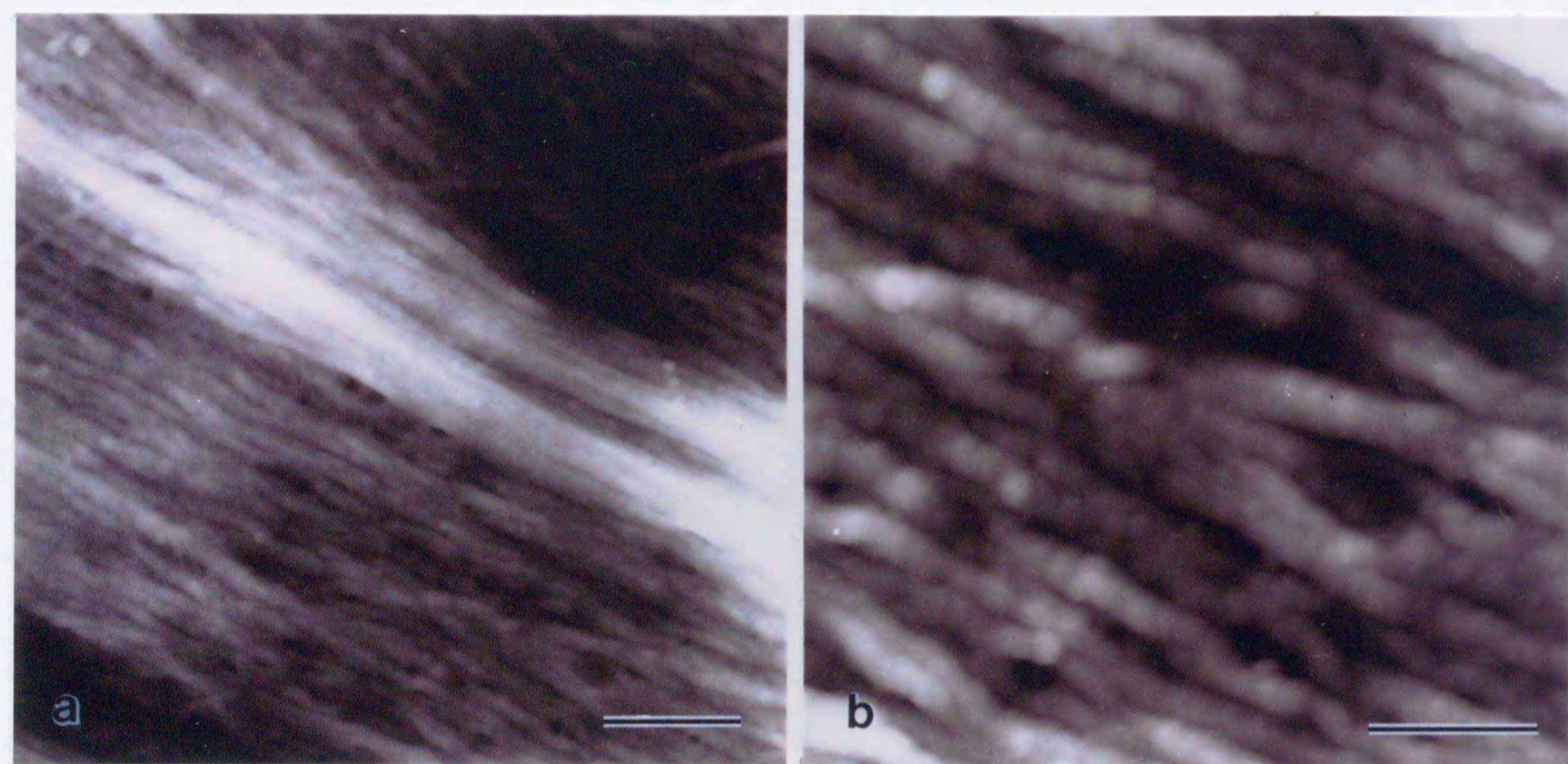


図15. 小片化された蓋膜表面のAFM像。
 a : 蓋膜表面は、ほぼ平行に走行する線維構造を示す。 b : a の拡大像。線維表面および線維間に粒子像を認める。スケールバーは (a) 500 nm, (b) 100 nm.

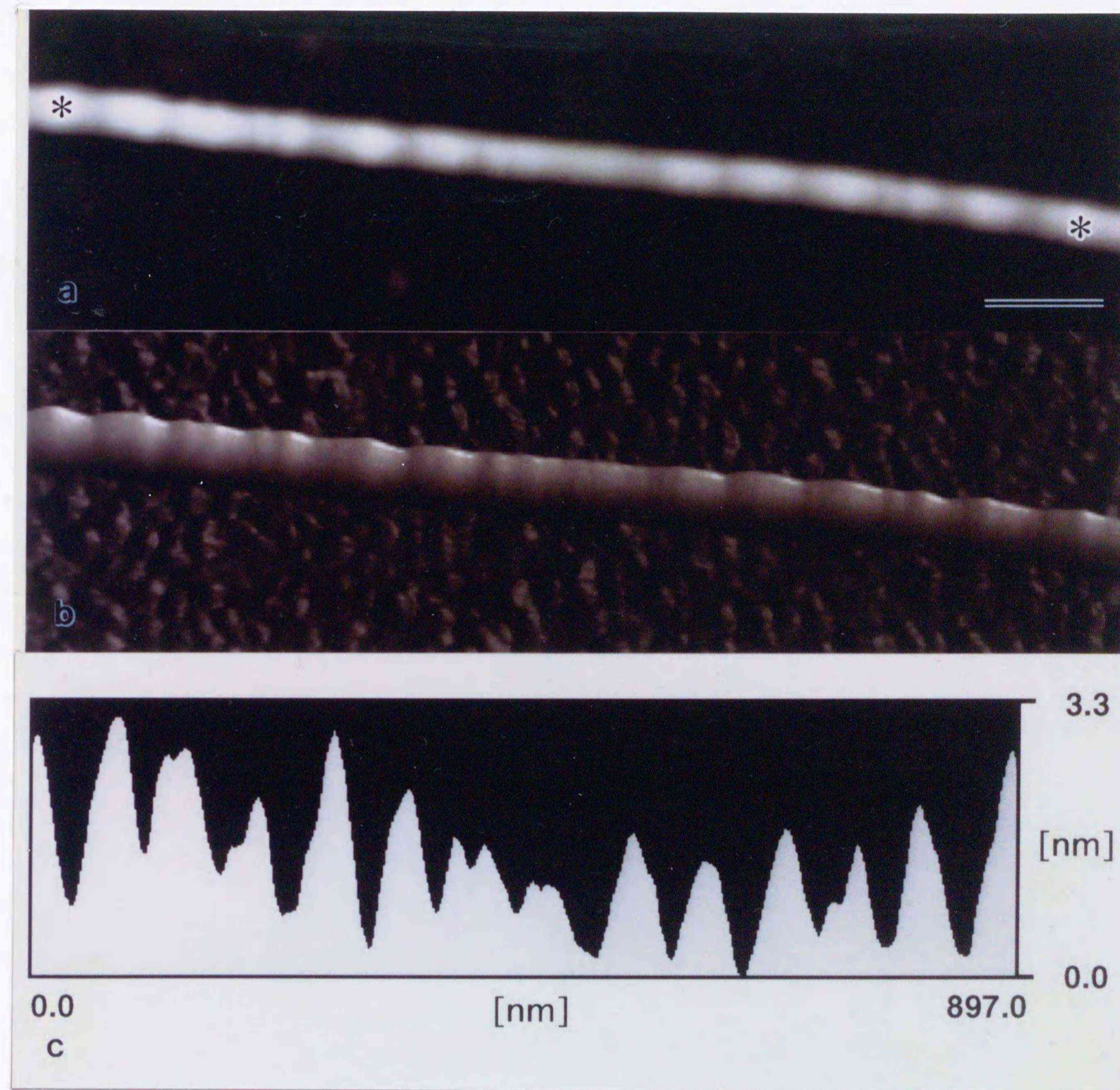


図16. 単離したタイプA線維のAFM像。
 a : 高さモードで観察したタイプA線維。 b : a の三次元画像。輪郭を強調するために右上から光りを当てたように見せている。 c : a の*間の断面像。周期的な凹凸を示す。スケールバーは (a), (b) 100 nm.

変位モードの観察

単離されたタイプA線維は明るい縞と暗い縞を交互に繰り返す周期的な縞構造を示した。明るい縞と暗い縞は明瞭に区分されていた。明るい縞と暗い縞の比率はほぼ同等であった。さらに明るい縞の中には1本の細い暗い縞が、暗い縞の中には1本の明るい細い縞が認められた(図17)。

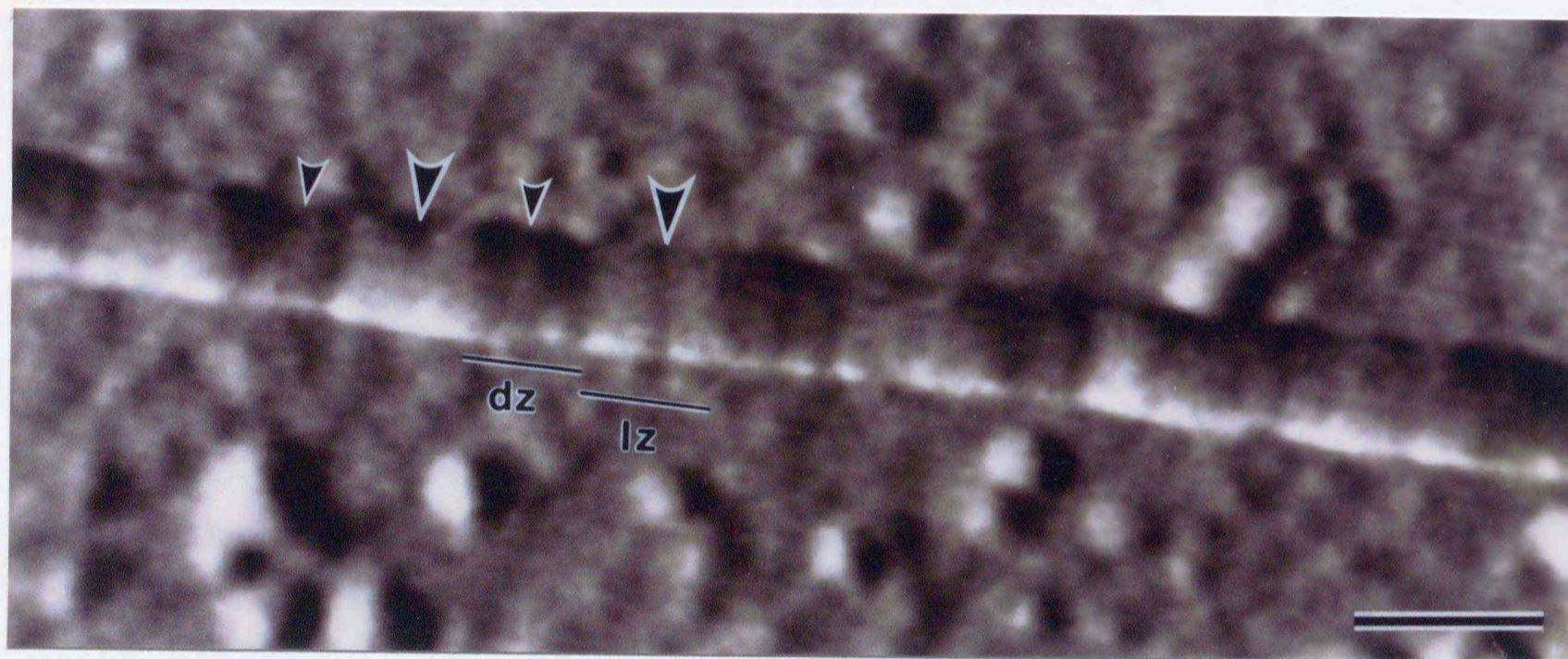


図17. 変位モードで観察したタイプA線維。

タイプA線維は、明るい縞と暗い縞を交互に繰り返し、さらに、明るい縞の中に細い暗い縞(大矢頭)、暗い縞の中に細い明るい縞(小矢頭)からなる周期的な構造を示す。スケールバーは100nm。

考察

本研究ではAFMを用いて蓋膜タイプA線維を観察し、その周期性が、コラーゲン線維に特徴的なD周期と一致することを示し、超微形態学的にタイプA線維がコラーゲン線維であることを証明した。

AFMで観察すると、タイプA線維の幅は30から40nmで、電子顕微鏡により報告されているタイプA線維の直径、10から20nmよりも太く観察された。これは、小さくかつ高い勾配をもつ試料をAFMで測定すると、カンチレバー探針の先端より先に側面が試料の端に接触して、実際の値よりも太く測定されるコンボリューション効果による⁵¹⁾。一方でAFMで得られた垂直方向の計測値は信頼性が高いとされている³¹⁾。AFMにおけるタイプA線維の高さは約10nmで、従来より報告されているタイプA線維の太さに一致した。

従来、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いとされている。それはプロテオグリカンや糖蛋白などの線維間物質が豊富なため線維の表面構造が観察しにくいからと考えられている⁴⁸⁾。AFMでも、蓋膜表面においては、糖関連物質と考えられる粒子構造が線維間および線維表面に認められ、周期的な表面構造を観察出来なかった。一方、単離された線維では周期的な縞構造を示す表面構造が観察出来た。これは、フラッシングにより線維を覆っていた糖関連物質が物理的に取り除かれたためと考えられる。

さらにAFMでは、試料が基板に強固に貼り付いていると、高い解像度を得ることができる。すなわち、試料の貼り付きが強いと、カンチレ

バーの走査による試料表面の構造の揺れが軽減する⁵²⁾。実際、蓋膜表面の線維が重なった状態と比べて、蓋膜周辺から単離された線維は、シラン処理したスライドガラスと強く接着した状態にあるため、微細構造を明瞭に示した。これらの試料作成方法の結果として、タイプA線維の微細構造がAFMにより明らかになったと考える。

Baseltらは、牛の皮膚とマウスの腱の1型コラーゲンをAFMで観察し、その表面構造は60から70 nmの周期性をもつ凹凸からなり、凹凸の高低差は5から15 nmだったと報告している⁵³⁾。彼らの結果と比べて、今回測定したタイプA線維の凹凸の高低差は、約1.5 nmと浅かった。このことも周期的な構造が2型コラーゲンで認めづらい一因と考えられた。弾性軟骨⁵⁴⁾、あるいは蓋膜^{49, 50)}の2型コラーゲンをレプリカ法で観察すると、周期的な縞構造は認めなかったと報告されている。通常のレプリカ法では、2 nm以上のプラチナ粒子で作った試料表面の鋳型を、透過電顕で観察する⁵⁵⁾。プラチナ粒子の粒状性により、2型コラーゲンの凹凸が隠れて観察出来ない可能性がある。

透過電顕のフリーズエッチング法を用いて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る。ネガティブ染色との比較から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⁵⁶⁾。

変位モードで認められ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し、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。また、従来報告されていた蓋膜タイプA線維の周期の値(7 nm⁴³⁾、12 nm⁴⁹⁾)は、これらの細かい縞から誤って計測されたと考えることが可能である。

タイプA線維は、コルチ器を覆う蓋膜の中を、放射状に走行している。外有毛細胞の脱分極は、その頂部にある感覚毛が蓋膜によって屈曲することで始まる。コルチ器を上から観察すると、W字型に配列する外有毛細胞感覚毛群が屈曲する方向と、その上を覆う蓋膜のタイプA線維の走行する方向はほぼ一致している²⁶⁾。すなわち、ストレスのかかる方向に線維が走行することで、蓋膜による外有毛細胞感覚毛の屈曲が効率よく行われると推測される。

軟骨において2型コラーゲンは主要な線維として、プロテオグライカンと共に、機械的な圧力に対する強度を軟骨に与えていると考えられている⁴⁸⁾。蓋膜のタイプAコラーゲン線維も糖蛋白などの糖関連物質とともに、上述の外有毛細胞感覚毛が屈曲する過程において、蓋膜の立体構築や機械的強度を保持する働きをしていることが予想される。

結論

マウス蝸牛蓋膜の表面構造および蓋膜タイプA線維を原子間力顕微鏡で詳細に観察し、以下の結論を得た。

1. 蓋膜下面の外有毛細胞感覚毛による圧痕の微細構造は従来走査電顕で報告されていた無構造な膜様組織でなく、径20から50 nmの粒子像から構成されている。これら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、圧痕の幅は差を示す。このことは、外有毛細胞感覚毛と蓋膜と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. 蓋膜を構成する主要な線維であるタイプ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、タイプA線維内のコラーゲン分子密度の差が、表面構造にも現れていることを示唆する。

文献

1. von Békésy, G. Experiments in Hearing. New York, McGraw-Hill, 1952.
2. Steel, K. P. The tectorial membrane of mammals. A review. *Hear. Res.* 1983; 9: 327-359.
3. Zwislocki, J.J., Chamberlain, S.C. and Slepecky, N.B. Tectorial membrane I: Static mechanical properties in vivo. *Hear. Res.* 1988; 33: 207-222.
4. Weaver, S.P. and Schweitzer, L. A radial gradient of fibril density in the gerbil tectorial membrane. *Hear. Res.* 1994; 76: 1-6.
5. Legan, P.K., Rau, A., Keen, J.N. and Richardson, G.P. The mouse tectorins. Modular matrix proteins of the inner ear homologous to components of the sperm-egg adhesion system. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 8791-8801.
6. Killick, R., Legan, P.K., Malenczak, C. and Richardson, G.P. Molecular cloning of Chick β -tectorin, an extracellular matrix molecule of the inner ear. *J. Cell Biol.* 1995; 129: 535-547.
7. Shah, D.M., Freeman, D.M. and Weiss, T.F. The osmotic response of the isolated, unfixed mouse tectorial membrane to isosmotic solutions: effect of Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} concentration. *Hear. Res.* 1995; 87: 187-207.
8. Retzius, G. Das Gehörorgan der Wirbeltiere: II. Das Gehörorgan der Reptilien, der Vögel und der Säugetiere. Stockholm, Samson and Wallin, 1884.
9. Engström, H., Sjöstrand, F.S. and Wersäll, J. The fine structure of the tone receptors of the guinea pig cochlea as revealed by the electron microscope. In *Proceedings of the Fifth International Congress of Oto-Rhino-Laryngology*, Eds. P.G. Gerlings and W.H. Struben, Assen, Van Gorcum, 1953: 563-568.
10. Flock, Å. and Wersäll, J. Morphological polarization and orientation of the hair cells in the labyrinth and the lateral line organ. *J. Ultra. Res.* 1963; 8: 193-194.
11. Iurato, S. Submicroscopic structure of the inner ear. Oxford, Pergamon Press, 1967.
12. Lim, D.J. Three dimensional observation of the inner ear with the scanning electron microscope. *Acta Otolaryngol. (Stockh.) Suppl.* 1969; 255: 1-38.
13. Lim, D.J. and Lane, W.C. Vestibular sensory epithelia. *Arch. Otolaryngol.* 1969; 90: 283-292.

14. Bredberg, G., Lindeman, H.H., Ades, H. and West, R. Scanning electron microscopy of the organ of Corti. *Science* 1970; 170: 861-863.
15. Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986; 56: 930-933.
16. Meyer, E. and Heinzelmann, H. Scanning force microscopy (SFM). In: R. Wiesendanger and H.J. Güntherodt: Scanning tunneling microscopy II. Further applications and related scanning techniques. 2nd ed., Berlin, Springer, 1995 (99-149).
17. Martin, Y., Williams, C.C. and Wickramasinghe, H.K. Atomic force microscope-force mapping and profiling on a sub 100 Å scale. *J. Appl. Phys.* 1987; 61: 4723-4729.
18. Ill, C.R., Keivens, V.M., Hale, J.E., Nakamura, K.K., Jue, R.A., Cheng, S., Melcher, E.D., Drake, B. and Smith M.C. A cooh-terminal peptide confers regiospecific orientation and facilitates atomic force microscopy of an IgG1. *Biophys. J.* 1993; 64: 919-924.
19. Horber, J.K.H., Haberle, W., Ohnesorge, F., Binnig, G., Liebich, H.G., Czerny, C.Z., Mahnel, H. and Mayr, A. Investigation of living cells in the nanometer regime with the scanning force microscope. *Scanning Microsc.* 1992; 6: 919-930.
20. Ohnishi, S., Hara, M., Furuno, T. and Sasabe, H. Imaging the ordered arrays of water-soluble protein ferritin with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 1992; 63: 1425-1431.
21. Hallett, P., Offer, G. and Miles, M.J. Atomic force microscopy of the myosin molecule. *Biophys. J.* 1995; 68: 1604-1606.
22. Yang, J.J., Takeyasu, K. and Shao, Z. Atomic force microscopy of DNA molecules. *FEBS Lett.* 1992; 301: 173-176.
23. Mou, J., Czajkowsky, D.M., Zhang, Y. and Shao, Z. High-resolution atomic force microscopy of DNA: the pitch of the double helix. *FEBS Lett.* 1995; 371: 279-282.
24. Tanaka, K. A simple type of apparatus for critical point drying method. *J. Electron Microsc.* 1972; 21: 153-154.
25. Pickles, J.O. The physiology of the ear. In: Scott-Brown's Otolaryngology 5 th ed. Vol. 1. Basic Sciences (ed. D. Wright), London, Butterworths Scientific, 1987, 47-80.
26. Lim, D.J. Fine morphology of the tectorial membrane.: Its relationship to the organ of Corti. *Arch. Otolaryngol.* 1972; 96: 199-215.

27. Hoshino, T. Relationship of the tectorial membrane to the organ of Corti. A scanning electron microscope study of the cats and guinea pigs. *Arch. Histol. Jap.* 1974; 37: 25-39.
28. Lim, D.J. Cochlear anatomy related to cochlea micromechanics. A review. *J. Acoust. Soc. Am.* 1980; 67, 1686-1695.
29. Lim, D.J. Functional structure of the organ of Corti: a review. *Hear. Res.* 1986; 22: 117-146.
30. Weiss, T.F., Peake, W.T., Lind, A.Jr. and Holton, T. Which structures determine frequency selectivity and tonotopic organization of vertebrate cochlear nerve fibers? Evidence from the alligator lizard. In: *Evoked Electrical Activity in the Auditory Nervous System*, edited by R. F. Naunton and C. Fernández. New York, Academic Press, 1978, p. 91-112.
31. Meller, D., Peters, K. and Meller, K. Human cornea and sclera studied by atomic force microscopy. *Cell Tissue Res.* 1997; 288: 111-118.
32. Henry, K.R. Aging and audition. In: Willot J.F., ed. *The auditory psychobiology of the mouse*. Thomas, Springfield Ill, 1983 (470-498).
33. Henry, K.R., McGinn, M.D. and Chol, R.A. Age-related auditory loss in the Mongolian gerbil. *Arch. Otorhinolaryngol.* 1980; 228: 233-238.
34. 稲福 繁, 犬塚一男, 滝本 勲: 正常マウスにおけるマウス内耳毛細胞の加齢変化. *Ear Res. Jpn.* 1978; 9: 98-100.
35. 高坂知節: 蝸牛の微細構造と音受容機構. *Otology Japan (Suppl)* 1991.
36. 川端五十鈴, 八木昌人, 多持隆一郎: 蓋膜 imprint の深さの測定- 3次元形状解析装置による観察-. *耳鼻臨床* 1994; 87: 123-129.
37. Santi, P.A., Lease, K.M., Harrison, R.G. and Wicker, E.M. Ultrastructure of proteoglycans in the tectorial membrane. *J. Electron Microsc. Tech.* 1990; 15: 293-300.
38. Prieto, J.J., Rubio, M.E. and Merchan, J.A. Localization of anionic sulfate groups in tectorial membrane. *Hear. Res.* 1990; 45: 283-294.
39. Munyer, P.D. and Schulte, B.A. Immunohistochemical localization of keratan sulfate and chondroitin 4-and 6-sulfate proteoglycans in subregions of the tectorial membrane and basilar membrane. *Hear. Res.* 1994; 79: 83-93.

40. Hoshino, T. Attachment of the inner sensory cell hairs to the tectorial membrane. A scanning electron microscopic study. *O. R. L.* 1976; 38: 11-18.
41. Lenoir, M., Puel, J.L. and Pujol, R. Stereocilia and tectorial membrane development in the rat cochlea. A SEM study. *Anat. Embryol.* 1987; 175: 477-487.
42. Dallos, P., Billone, M.C., Durrant, J.D., Wang, C. and Raynor, S. Cochlear inner and outer hair cells.: Functional differences. *Science* 1972; 177 (46): 356-358.
43. Kronster-Frei. Ultrastructure of different zones of the tectorial membrane. *Cell Tissue Res.* 1978; 193: 11-23.
44. Hasko, J.A. and Richardson, G.P. The ultrastructural organization and properties of the mouse tectorial membrane matrix. *Hear. Res.* 1988; 35: 21-38.
45. Richardson, G.P., Russel, I.J., Duance, V.C. and Bailey, A.J. Polypeptide composition of the mammalian tectorial membrane. *Hear. Res.* 1987; 25: 45-60.
46. Slepecky, N.B., Savage, J.E., Cefaratti, L.K. and Yoo, T.J. Electron-microscopic localization of type 2, 9 and 5 collagen in the organ of Corti of the gerbil. *Cell Tissue Res.* 1992; 267: 413-418.
47. Chapman, J.A. and Hulmes, D.J.S. Electron microscopy of the collagen fibril. In: Ruggeri A, Motta P M, ed. *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984: 1-33.
48. Montes, G.S., Bezerra, M.S.F. and Junqueira, L.C.U. Collagen distribution in tissues. In: Ruggeri, A. and Motta, P.M. ed. *Ultrastructure of the Connective Tissue Matrix*. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984: 65-88.
49. Arima, T., Lim, D.J., Kawaguchi, H., Shibata, Y. and Uemura, T. An ultrastructural study of guinea pig tectorial membrane 'type A' protofibril. *Hear. Res.* 1990; 46: 289-292.
50. Thalmann, I., Thallinger, G., Crouch, E.C., Comegys, T.H., Barrett, N. and Thalmann, R. Composition and supramolecular organization of the tectorial membrane. *Laryngoscope* 1987; 97: 357-366.
51. Ushiki, T., Hitomi, J., Ogura, S., Umemoto, T. and Shigeno, M. Atomic force microscopy in histology and cytology. *Arch. Histol. Cytol.* 1996; 59: 421-431.
52. Lal, R. and John, S.A. Biological applications of atomic force microscopy. *Am. J. Physiol.* 1994; 266: C1-C21.

53. Baselt, D.R., Revel, J.P. and Baldeschwieler, J.D. Subfibrillar structure of type 1 collagen observed by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 1993; 65: 2644-2655.
54. Mecham, R.P. and Heuser, J. Three-dimensional organization of extracellular matrix in elastic cartilage as viewed by quick freeze, deep etch electron microscopy. *Connect. Tissue Res.* 1990; 24: 83-93.
55. Fujimoto, K. SDS-digested freeze-fracture replica labeling electron microscopy to study the two-dimensional distribution of integral membrane proteins and phospholipids in biomembranes. *Histochem. Cell Biol.* 1997; 107: 87-96.
56. Marchini, M., Morocutti, M., Castellani, P.P., Leonardi, L. and Ruggeri, A. The banding pattern of rat tail tendon freeze-etched collagen fibrils. *Connect. Tissue Res.* 1983; 11: 175-184.

平成11年1月6日

札幌市北区北14条西7丁目
北海道大学医学部
耳鼻咽喉科学講座

檜山繁樹

