ラセン器の直流電位と CM の分布

鶴見大学歯学部生理学教室

田中康夫*, 浅沼 厚, 柳沢慧二, 勝木保次**

(* 京府医大・耳, ** 東京医歯大)

緒 言

モルモットなどの動物において経正円窓ラセン器刺入時に、「コルチ器負電位」と呼ばれる負性の直流電位と蝸牛マイクロホン電位 (CM) が記録されることは Békésy¹⁾ や田崎ら¹⁰⁾ の報告以来よく知られている。蝸牛中央階に約 80 mV の正電位 (EP) があり、ラセン器と中央階の境で CM の位相が 180 度転換することから、ラセン器表面を被う網状膜に CM の発生源があると想定され、variable resistance microphone theory が成立している。この説では、CM は網状膜部の可変抵抗が音刺激により増減するために起る電圧降下の変動であると説明されている。

ラセン器刺入時に得られる電位のうち、いわゆる「コルチ器負電位」は発見当初¹⁾、ラセン器の細胞要素に由来するものと考えられたが、比較的太い先端 (経 25 μ 以上) の電極でも記録されるので細胞外のものである見解²⁾ もあり、電位の起源については疑問もたれてきた。Lawrence⁶⁾ は実験結果をラセン器の形態学的計測値から推測して、「コルチ器負電位」はラセン器の細胞を含む全体のものとし、また蓋膜には不安定な零近辺の電位があることから CM の発生源を蓋膜に求めている。一方、水生動物の側線器において感覚毛の屈曲によって起る受容器電位が記録されており、マイクロホン電位はそれらの細胞外集合電位であることがわかりつつある。以前よりマイクロホン電位は単なる随伴現象ではないかという意見がしばしばあったが、水生動物の場合、求心神経終末の興奮をひき起す前段階としての生理学的な電気現象である。哺乳類では、いまだ毛細胞内の電位は十分明らかにされていない。

このように、CM の成因についてはラセン器における変換機序を理解する上に、なお未解決の問題が多く残されている。本実験ではラセン器刺入時に得られる電位について、電位分布を再検討し、マーキング法¹¹⁾を用いて直流負電位の細胞同定を行い、さらに蓋膜およ

び蓋膜下腔の電位についても追求した。それらの結果について述べる。

実験方法

実験動物には 200~450 g のモルモットを用いた。ペントバルビタールソーダ 30 mg/kg の腹腔内注射による麻酔下、気管切開を施しポリエチレンチューブを気管に挿入した。動物の頭部を Hess 型改良固定器に保持した。ガラミントリエチオダイドにより筋弛緩を行い、気管断端のポリエチレンチューブを人工呼吸器 (成茂, AR-2) に接続した。下顎骨内縁から耳介後部に向って切開をおき下顎骨角および茎状突起を骨膜下に剝離除去し、中耳骨胞を下面より後部にわたって大きく開放し、蝸牛を露呈した。正円窓刺入時の照明には特殊なガラス製のライトガイドを試用した。直径 1 mm、長さ 35 mm のガラス照明素子 (オリンパス光学特製) の幹部を開放した中耳骨胞縁に歯科用セメントで固定し、先端を蝸牛骨壁にあてガラスファイバー照明器 (成茂, MEI-12) からの光源を蝸牛内に導いた。この照明方法により、視野が従来よりもはるかに明るくなり顕微鏡倍率 40 倍またはそれ以上で正円窓刺入を行うことができた。

記録および細胞マーキング用の電極には先端径 1 μ 以下のガラス毛细管に色素を充填し、電極抵抗 20~100 M Ω のものを用いた。中央階灌流兼用の電極には先端径 2~10 μ のガラス管を作製使用した。不閉電極には銀板を用い、それを頸部の筋肉においた。直流電位は電極より前置増幅器 (日本光電, Mz-4) を経てペン書き記録器 (東亜電波, EPR-3T) に導いた。CM は前置増幅器 Mz-4 よりブラウン管オシロスコープ (Taktronix 565) 上にモニターし平均加算機 (日本光電, ATAC-201) に記憶させた後、X-Y レコーダ (横河電機 3077) で記録した。音刺激は 200~4000 Hz の純音のトーンバーストを用いた。刺激音圧には CM が入力に対し直線関係を保つ範囲内の最大音圧を動物ご

とに選んだ。

細胞マーキング用の色素にはナイアガラスカイクルー6Bを用い、4%溶液を電極に充填した。電位の記録後ただちに電極を記録系より通電系に切り換え、 $5 \times 10^{-7} \text{A}$ の陰極電流を1秒ごとに500ミリ秒の矩形波として10~15分間通じ色素を泳動させた。染色された細胞の検索は、断頭後摘出した蝸牛を5%グルタルアルデヒド溶液で固定し作製した surface preparation 上で行った。細胞外の部位同定は色素が拡散してしまい困難であるので、蓋膜部には神経線維の走行や分岐をみるため行われているコバルト沈着法⁹⁾を試みた。本来これはCoイオンを電気泳動的に流出させ硫化による黒色沈着物を検出する方法であるが、細胞外に対してはイオン数が十分でなく本実験では中央階灌流による排出を蝸牛頂に作り、カコディレート緩衝液加200mM塩化コバルト溶液約1mm³を正円窓刺入により中央階に注入した。摘出した蝸牛を2%硫化アンモン溶液に浸し発色させた後、5%グルタルアルデヒド溶液で12~24時間固定した。2.5%グルタルアルデヒド溶液で生体固定を行った動物の場合も蝸牛摘出後、同様に発色させ再固定した。組織学的な検索は surface preparation および radial section の両標本により行った。

実験成績

正円窓を経て基底膜をできる限り垂直に刺入し中央階に向けて電極を進める際の直流記録について、電極先端が正円窓膜に接した時の直流レベルを零電位とすると、鼓室階では通常零電位、時に正円窓膜の圧迫に

図1 経正円窓ラセン器刺入時のCMおよびDC記録。図左は3,000Hzの純音刺激に対するCM, 図右はDC記録。RW: 正円窓, ST: 鼓室階, I: 細胞内, TM: 蓋膜, SM: 中央階, Ext: 細胞外。Pは電極刺入開始, Wは抜去開始。

より数mV正または負の電位が示される。電極先端が基底膜を貫通すると2~3回大きい負電位が観察された後、中央階の正電位EPが得られた(図1, 右)。CMはそれらの負電位の部位で、鼓室階のものと較べ同様な大きさの場合と増大する場合があった。CMの位相は電極先端が中央階に入りEPが認められるまでは同位相であり、中央階では180度転換した。負電位とEPの間には不安定な零電位が記録されることがあり、その際にはCMは著明に縮少した(図1, 左)。基底膜の外側端を血管条に向けて刺入するとEPが得られるまでに5~8回負電位が記録されることがあった。

直流記録で負電位が示される部位ではマーキングを行うと surface preparation においてラセン器の単一の細胞が染色されていた。負電位と共にCMの増大する例では一つの毛細胞にマーキングスポットが検出された(図2)。細胞外にマーキングを試みてもスポットは検出できず細胞内刺入時にのみ認められるので、負電位はラセン器細胞群の細胞内静止電位であり、したがって毛細胞刺入時のCMは音刺激に対する毛細胞内の電気的な反応である。

細胞内静止電位の大きさは細胞により異なり、10mVから110mVにわたる広範囲にあった。175回の刺入時の負電位の大きさについて分布を調べてみると、2つのピークが認められ10~20mVと70~80mVのものが多かった(図3)。ラセン器の細胞内刺入時にみられるCMの大きさについて分布をみると、正円窓上のCMの振幅に対し、1~1.5倍のものが最も多かったが、2~4.5倍に増大する群もあった(図4)。細胞内CMの大きくなる例ではマーキングによって毛細胞に染色スポットが認められた。刺入直後の毛細胞内CMの振幅は0.5mV以下であった。しかし、刺入後静止

図2 surface preparation 上における単一の染色された細胞。矢印は外毛細胞第3列における染色点(実際には青色に染っている)を示す。

電位が縮少するような時、また電極先端の経が 2μ あるいはそれ以上に太い時にさらに大きい振幅の CM が認められた。CM の増大しない群はマーキングでは支持細胞であった。支持細胞内 CM は静止電位が縮少しても変化することはなかった。

支持細胞と毛細胞刺入時の電位記録を比較すると次のようである(図5)。図5において電極先端が鼓室階を経て基底膜に達すると、まず小さい負電位が認められる。これらの負電位の大きさは $10\sim 20\text{ mV}$ であって、ラセン器の鼓室階側の細胞の静止電位と考えられる。

図3 ラセン器刺入時に記録された細胞内静止電位の大きさによる分布。

図4 ラセン器の細胞内マイクロホン電位の大きさによる分布。細胞内CMの大きさは刺入ごとの正円窓上CMの大きさとの比で示されている。

この電位の部位でCMの大きさは鼓室階のものと較べ変らない。さらに電極を進めると $60\sim 90\text{ mV}$ の大きい負電位が得られる。大きい静止電位を示す細胞群ではCMが増大することがある。細胞マーキングの結果から、CMが増大する場合は毛細胞を刺入しているのであり、CMが増大しない場合は支持細胞である。

細胞内静止電位と共にCMが増大するような刺入において、電極をさらに中央階に向けて進めると、直流記録ではEPが得られる直前に不安定な零電位が記録され、その部位でCMは著明に縮少した(図1)。この部位は形態学的な関係から蓋膜または蓋膜下腔と考えられる。CMの位相については、この不安定な零電位が得られた15例のうち14例がこの電位とEPの間で180度転換し、1例のみが正電位に傾き中央階のものと同位相であった(表1)。蓋膜部のものと考えられる電位を同定するためにCo沈着法を試みたが、電気泳動的にCoイオンを流出させただけでは沈着物を検出することが困難であったので、正円窓よりクラディウス細胞部を経た刺入により塩化コバルト溶液の中央階灌流を行った。約 1 mm^3 の 200 mM 塩化コバルト溶

図5 ラセン器刺入時にみられる電位記録の二つの形。1: 鼓室階, 2: 鼓室階寄りの細胞, 3: ラセン器の細胞, 図上は支持細胞刺入時の記録, 図下は毛細胞の刺入時記録(3のところでCMが増大している)。

表1 不安定な零電位の部位におけるCMの位相。

phase of CM	d.c. level	No. of cases
same to ST	near zero	14
same to SM	positive	1

図6 経正円窓刺入により中央階へコバルトイオンを注入した際の第3回転における蓋膜所見。蓋膜をおおう全表層にコバルト沈着が認められる。

液注入により, CMは15分で死後CMの大きさに縮少し, EPは半減した。蝸牛は摘出後, 硫化アンモン溶液に浸し発色させた。surface preparationではライスネル膜および蓋膜部に沿って黒色のCo沈着物が観察され, radial sectionではライスネル膜の内リンパ側, 蓋膜の表層(図6), ラセン器ならびに内ラセン溝表面の一部にCo沈着が検出された。蓋膜ではCoイオンの沈着は外側辺縁部および基部に最も強く, 次いで蓋膜の上下面とも全域にわたって様な発色が認められた。

考 按

ラセン器刺入時に記録されるところのいわゆる「コルチ器負電位」がintracellularのものかあるいはinter-cellularのものかという問題に対し, 細胞マーキングの成績はこの電位がラセン器の細胞群の細胞内静止電位であることを示しており, 負電位が細胞由来の電位であろうとする発見当初の考え^{1), 10)}や電極先端の軌跡を組織学的に検討している推測^{7), 9)}を実証するものである。しかしながら, Butler²⁾が負電位を細胞外のものであろうと結論した根拠は先端径が 25μ の電極でも記録し得たということであるが, 比較的太い先端の電極でも瞬時記録できることは事実である。この点では疑問がいささか残っている。

毛細胞内CMは鼓室階またはラセン器細胞外のものより大きいけれども, 振幅の大きさは 0.5mV 以下であった。水生動物の側線器においても, 毛細胞内のマイクロホン電位の大きさは 1mV 以下と報告されており^{4), 5)}, これらの電位は聴側線系における受容器電位と一応は考えられるものであるけれども, 毛細胞下端

において化学伝達物質の放出を駆動させるためのものとしては十分な大きさではない。毛細胞内CMは細胞内静止電位が減少する時増大する傾向があること, また比較的太い先端の電極で大きく記録できることなどは毛細胞膜の歪みに関係したことがらかも知れない。

電極の先端がラセン器を貫通して中央階に入る際に細胞内静止電位とEPの間に不安定な零近辺の電位が存在することは, 以前にLawrence⁹⁾が報告している通りであって, 蓋膜または蓋膜下腔の電位と考えられる。この部位で直流レベルが極めて不安定なこと, 毛細胞部の貫通時にのみ記録できることから蓋膜部の電位であることが推測される。蓋膜の上下面を被うすべての表層がCoイオンを捕捉し易い性質を持っていることは高Kイオン濃度の内リンパとの関連において重要である。蓋膜下腔の電位は現時点ではいまだ明確にはされていないけれども, 蓋膜の上下面が共にCoイオンに対し同じ性質を有していることやCMの位相の転換が蓋膜と中央階の境で行われることなどは, CMの発生が蓋膜を被う表層に関係していることを示唆している。前述のように毛細胞内CMは変換過程の一段階と考えるためには不十分な大きさのものであって, 蓋膜表層をも含めた毛細胞感覚毛側の陽イオンに対する特異な性質が受容機序の初期過程に重要な役割を果たしているものと考えられる。

本研究の一部はNHK委託研究費によった。

Microphonic and DC Potentials in the Organ of Corti and the Tectorial Membrane

by

Yasuo Tanaka*, Atsushi Asanuma,
Keiji Yanagisawa, and Yasuji Katsuki**

Department of Physiology, School of
Dentistry, Tsurumi University

* from Kyoto Prefectural University of Medicine

** from Tokyo Medical and Dental University

Microphonic responses and dc potentials recorded within the organ of Corti in guinea pigs were re-examined by means of the marking technique. Marked spots were detected in single cells on surface preparations of the organ of Corti. The result of cell markings substantiates that the negative potential of the organ of Corti is an intracellular potential. The microphonic potential within hair cells was 2 to 4.5 fold larger than

that of the extracellular space of the organ of Corti or that of the scala tympani. However, the intracellular microphonics were less than 0.5 mV in size of their amplitude.

As a microelectrode advanced through hair cells, into the scala media unstable near zero potentials were recorded between the intracellular potential and the endocochlear potential. A phase reversal of microphonics took place in the boundary between the unstable zero potential and the endocochlear potential. All surfaces of the tectorial membrane and a partial surface of the organ of Corti had an affinity for cobalt ions which were injected into the scala media. It is deducible that the unstable zero potential is inside the tectorial membrane. The cover surfaces of the tectorial membrane and the organ of Corti may be related to generation of cochlear microphonics.

文 献

- 1) Békésy, G. von: DC resting potentials inside the cochlear partition. *J. Acoust. Soc. Am.*, 24; 72-76, 1952.
- 2) Butler, R. A.: Some experimental observations on the dc resting potentials in the guinea pig-cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.*, 37; 429-433, 1965.
- 3) Davis, H.: A mechano-electrical theory of cochlear action. *Ann. Otol.*, 67; 789-802, 1958.
- 4) Flock, Å., M. Jørgensen, and I. Russell: The physiology of individual hair cells and their synapses. In *basic mechanisms in hearing*. (ed.) A.R. Møller, Academic Press, New York and London, 1973.
- 5) Harris, G.G., L.S. Frishkopf, and A. Flock: Receptor potentials from hair cells of the lateral line. *Science*, 167; 76-79, 1970.
- 6) Lawrence, M.: Electric polarization of the tectorial membrane. *Ann. Otol.*, 76; 287-312, 1967.
- 7) Lawrence, M., A.L. Nuttall, and M.P. Clapper: Electrical potentials and fluid boundaries within the organ of Corti. *J. Acoust. Soc. Am.*, 55; 122-138, 1974.
- 8) Pitman, R.M., C.D. Tweedle, and M.J. Cohen: Branching of central neurons: Intracellular cobalt injection for light and electron microscopy. *Science*, 176; 412-414, 1972.
- 9) Sohmer, H.S., W.T. Peak, and T.F. Weiss: Intracochlear potential recorded with micro-pipets. I. Correlations with micropipet location. *J. Acoust. Soc. Am.*, 50; 572-586, 1971.
- 10) Tasaki, I., H. Davis, and D.H. Eldredge: Exploration of cochlear potentials in guinea pig with a microelectrode. *J. Acoust. Soc. Am.*, 26; 765-773, 1954.
- 11) 田中康夫, 井上靖二, 中村文雄: マーキング法によるコルチ器負電位の細胞同定. *Audiology Japan*, 11; 319-320, 1968.

(受付 50.4.1)