EP と CM の相関性について

大阪鉄道病院耳鼻咽喉科

朝隈真一郎, 志多 享, 鈴木政昭, 阿部 登

緒 言

1930年 Weber & Bray¹⁾ によって cochlear microphonics (CM) が記録されて以来、聴覚の電気生理学的研究は著しく進歩した。特に Békésy²⁾ によって基底膜振動の解析が行われ、さらに電子顕微鏡によって内耳の微細構造が明らかにされるようになり、それらの知見をもとにして内耳の刺激変換機構に関して数多くのモデルが発表されるようになった³⁾。

内耳には cuticular plate をはさんで endocochlear DC potential (EP) とコルチ内負電位とによって構成される 160~180 mV の直流電位勾配が存在する。1958年および1968年に Davis⁴⁾⁵⁾ は mechanoelectrical theory を提唱し、この直流電位勾配が CM 発生のための電源電圧であることを主張したが、これを裏書きするものとして種々の条件を負荷した場合の EP と CM の変動を比較すると、両者がきわめてよく一致した変動を示すことはすでによく知られた事実である。一方 anoxia 負荷、内リンパ液置換実験などの際コルチ内負電位の変動は極めて少いことが報告されているが、コルチ内負電位が一定であると仮定すると EP の変化はそのまま直流電位勾配の変化と考えられ、CM が EP と一致した変動を示すことはよく理解できる。しかしある特殊な条件下では CM と EP が異った変動経過を示す場合もあることが知られており、EP と CM の相関性についてはなお疑問点が多い。

今回われわれは CM と EP を同時記録し、また適時コルチ内負電位および SP をも測定し、種々の条件下での EP と CM の異った変動経過をとらえ、EP と CM さらにコルチ内負電位をも考慮した直流電位勾配と CM の相関性について検討を加えた。

実 験 方 法

実験動物には、プライエル反射良好、体重約 300 gr のモルモットを用い、sodium pentobarbital 35 mg/kg の腹腔内投与により全身麻酔した。本実験では電位の

誘導に微小電極としてのガラス毛细管電極を使用するために実験中は動物を不動化する必要があり、そのため succinylcholine chloride 15 mg/kg を筋注し完全に筋弛緩させた後人工呼吸器により呼吸を維持した。

誘導電極は 1 MKCl を充填した尖端直径約 1 μ のガラス毛细管電極を使用し、不関電極は頸部筋肉に置いた。測定は左側蝸牛より行い、EP と CM は第 1 および第 3 回転において血管条經由にて行った。動物を背臥位に固定した後、伝音機構を破壊せぬように注意しつつ中耳骨胞を開き、蝸牛骨壁の血管条に相当する部位を削り極めて菲薄とし、特殊な尖刀で微小な孔を作成した。蝸牛骨壁上の操作は双眼実体顕微鏡下にておこない、内リンパ液の流出、血管条の損傷などのないように細心の注意をはらった。コルチ内負電位の記録は動物を側臥位に固定した後、双眼実体顕微鏡下に基礎回転基底膜を明視しながら微小電極を正円窓膜經由でコルチ器内に挿入することによって行った。記録装置は図 1 ブロックダイアグラムに示すごとくで、電位はガラス毛细管電極に挿入した銀塩化銀導出電極によって高入力インピーダンス前置増幅器 (日本光電製 MZ-3A) に導いた。EP は高感度直流増幅器 (日本光電製 ADH-2) にて増幅し galvanometer で直読し、ペン書きオシログラフにて記録した。CM はブラウン管オシロスコープ (日本光電製 VC-7) にて波形を観察し autoranging AC volt meter (NF 回路デザインブロック製) にて出力を直読した。さらに経時的出力の変化を EP のそれと比較するために、生体電気用前置増幅器 (日本光電製 AVB-8) および高感度直流増幅器 (ADH-2) にて増幅した後、半波整流してペン書きオシログラフにて記録した。CM を得るための刺激音としては 500 Hz, 4 KHz の純音を CM の maximum output を得る音圧よりも 20 dB 低い一定音圧で使用した。持続音は SY-118 型発振器 (NF 回路デザインブロック製) にて、また断続音はオージオメータ (小林理研製) と電子スイッチにて作製し増幅器および attenuator を介して dynamic receiver に導き、closed

Block Diagram

Tone Burst Continuous Tone

図 1

sound system で外耳道に導入した。

今回、EP と CM の相対関係追跡のための負荷条件としてとり上げたものは (1) general anoxia (2) local anoxia (3) furosemide 静脈内投与である。general anoxia は人工呼吸器停止により、local anoxia は前下小脳動脈圧迫による。furosemide は 30 mg/kg を右側頸静脈より one-shot で静注した。

実験結果

(1) general anoxia

基底回転からの EP と CM の同時記録を図 2 に示

図 2

す。音圧は 32 dB SPL である。anoxia 負荷後約 60 秒、同時点より EP と CM は共に低下しはじめ、anoxia 負荷前の値を 100 % とした場合約 40 % まででは両者はほぼ一致した変動を示すが、この後 CM の低下はほとんど停止し、ほぼ一定レベルにとどまる。一方 EP は CM に比してさらに比較的急激な低下を続け極性逆転をおこし約 -30 % にまで低下を示した。5 分間の anoxia 期間中の EP と CM の変化をそれぞれ負荷前の値に対する百分率で表示すると、図 3 のごとくであり anoxia 負荷時に EP と CM が一定時点から後は異なる変動経過をとることが明瞭に示されて

図 3

いる。なおこのような EP と CM の変動の不一致は 5 分間の anoxia 負荷後の回復期においてもみられ、図 2 に示すごとく EP が overshoot をおこしている時に CM が一過性の低下をおこすことが観察された。

第 3 回転における EP と CM の変動を図 4 に示す。anoxia 負荷期間中の EP と CM の変動は基底回転でのそれとほぼ同様の傾向がみられるが、回復期における CM の一過性の低下は基底回転において観察される

図 4

ほど著明ではなかった。

(2) local anoxia

脳底部で前下小脳動脈を露出、occlusion probe にてこれを圧迫し蝸牛への血行を杜絶することにより、local anoxia を惹起した場合の EP と CM との相対的変動は図 5 に示すごとくである。EP と CM は共に閉塞直後より低下しはじめ、低下勾配は general anoxia の場合に比べてより急峻ではあるが、EP と CM の相対的変動経過については general anoxia の場合とほぼ同様のパターンがみられた。

(3) furosemide 静脈内投与

図 5

図 6

furoseimide 静注後数秒にして図 6 のごとく、E P と C M は急激な低下をおこす。これは anoxia による低下に比べてはるかに急激であり、E P は 60~90 秒後にもっとも低値に達し、その後は緩慢に回復する。一方 C M は E P が低下する時期ではそれと一致した変動を示すのであるが、回復期においては全く異なる経過をとった。すなわち E P が回復傾向を示しているが、その値がなお negative である時期に C M は急激に回復し、E P が 0 mV の時に C M はすでに furoseimide 注射前のコントロールの出力にまでほぼ完全な回復をきたすのが証明された。C M はその後もさらに出力が増して著明な overshoot をおこすのが観察される(図 6)。図 7 は C M の変化をブラウン管上の波形で示したものであり furoseimide 注射後の低下期と回復期では同じ E P の値での C M の amplitude に著明な差のあることが分かる。次に C M と同時に S P の変化をみると図 8 のごとくである。注射前のコントロールでは S P は一であるにもかかわらず、E P の低下とともに C M が低下しはじめるとすぐに + に転じるが、+0.4 mV 以上とはならず、E P の negativity が更に大となっても S P の positivity は逆に小さくなり再び 0 側へと向う傾向がみられた。回復期では E P 値の増大と共にふたたび - S P にもどり C M の増加に一致して overshoot を示すが、その割合は C M のそれに比して遥かに著明である。なお E P と共に直流電位勾配を維持しているコルチ内負電位の変動について検討する意味で furoseimide 投与後 E P が低下しているおのおのの時期にコルチ内負電位を記録したが、全く変

図 7

動していないことが確認できた(図 9)。

考 按

1952 年 Békésy⁶⁾ は、内リンパ腔およびコルチ器にそれぞれ +50 mV, -40 mV の静止電位が存在することを発見した。前者は当初 endolymphatic DC

図 8

図 9

potential と呼ばれたのであるが、前庭半規管には存在しないことがあきらかにされ、Davis⁷⁾ はこれを endocochlear DC potential と名付けた。Tasaki⁸⁾ によって血管条がこの電位を維持していることが証明され、また EP の大きさについては、安野⁹⁾、今井¹⁰⁾、菅¹¹⁾らの研究により基底回転から第 4 回転まで $+80 \sim +90$ mV にほぼ一定であることが認められるようになった。一方コルチ内負電位については先端の太い電極でも記録できることからコルチ器自体に存在する電位と考えられていたのであるが、最近ではやはり細胞内負電位とする考えが信じられている。1968 年後藤¹³⁾ はマーキング法を用いてコルチ内負電位を詳細に検討し、外有毛細胞、内有毛細胞、支持細胞からの 3 種の電位を分類した。これによって従来コルチ内負電位と呼ばれていたものの本体についてより理解が深まったといえる。

このようにして蝸牛内には cuticular plate を壊にして 160 mV にもおよぶ直流電位勾配が存在することが明らかになった。すでに 1952 年 Békésy⁶⁾ はこれを蝸牛内のエネルギープールとして解釈している。1958 年 Davis⁴⁾ は mechanoelectrical theory を提唱した。これは cuticular plate に variable resistor をもった回路を想定し、EP を電源電圧と考え、その IR 効果により CM が発生すると考えたモデルである(図 10)。彼ははじめ、CM 発生の電源電圧として EP のみを考えたのであるが、1968 年にはコルチ内負

図 10 Davis, H: 1968 の論文より

電位を考慮した直流電位勾配に改正した。このようにして cuticular plate を壊にして存在する 160 mV の直流電位勾配が CM 発生のための電源電圧として存在することは今日では広く認められるようになった。anoxia 負荷により EP、CM が低下することは、この電位が発見された当初より知られていた。anoxia により EP が低下しつづける時期に CM の低下が緩慢になることはすでによく知られており、この CM は CM₂ として正常時の CM₁ と区別されている。1968 年後藤¹³⁾ は内外有毛細胞内負電位をそれぞれ $60 \sim 80$, 70 mV であると報告した。また、この電位は 5 分間の anoxia で全く変動しないという。従って 5 分間の anoxia による直流電位勾配の大きさは EP の変化に

よって決定される。そこで本実験で得られた EP の変化を直流電位勾配の変化に換算して示すと 図 11 のようである。なお有毛細胞内負電位は Dallos¹⁴⁾ の報告に従って -80 mV とした。このようにして求めた直流電位勾配の変化と CM の変化を比較すると 図 12 に示すごとく両者の変化は極めてよく一致している。すなわち anoxia 負荷時の EP, CM の変動の不一致は直流電位勾配と CM の相関として考えると完全に説明できる。

1968 年菅野⁵⁾ らは anoxia を 3 分間負荷した後の回

図 11

復期において EP が overshoot をおこすのに対し、CM が一過性に低下することを報告した。今回の実験でも同様の現象が観察された。電源電圧が正常に存在する時にこのような CM の低下がおこるのは、おそらく anoxia からの回復途中での一過性の有毛細胞の機能低下を示すものであろう。今回の観察では、第 3 回転ではこの CM の一過性の低下は基底回転の記録ほど著明でないように思われた。斎藤¹⁶⁾による蝸牛回転別血液動態の研究、また山下¹⁷⁾のコハク酸脱水素酵素活性による研究などから蝸牛の代謝は回転別によりかなり差があることが推測され、好氣的代謝への依存度は第 3 回転よりも第 1 回転の方が大きいと考えられる。これらの報告をもとに考えれば、第 3 回転は基底回転よりも anoxia に対して耐久性があり、anoxia 後の有毛細胞の一過性の機能低下が少いのであろうと解釈することが可能である。

furosemide 投与による EP, CM の変化については、すでに平島¹⁸⁾、伊達¹⁹⁾らの報告があるが、回復期においては EP と CM は平行して回復するとのみ記されており、必ずしも詳しい検索がなされているとはいえない。今回われわれは回復期において EP がまだ 0 mV にまでしか回復しない時に CM はすでに 100% 近い回復を示すことを確認した。しかもこの時、コルチ内負電位には何らの変動もないことが明ら

図 12

かにされた。この時期の有毛細胞の SDH 活性は写真 1 に示すごとく全く正常であり、このことから有毛細胞には何ら変化のないことが推測される。したがって 図 13 に示すごとく、直流電位勾配と CM の関係よりこの現象を分析しても低下期と回復期では両者が全く異った変動経過をとることが分かる。

このような furosemide 投与後の回復期における EP, CM の相対関係については anoxia の場合と異なり, CM の電源電圧としての直流電位勾配と CM との相関という観点からだけでは説明できない。この現象を解析するにはなお多くの研究がなされねばならないのはもちろんであるが、われわれはここに二つの問題を提起したい。一つは内リンパ液中の K^+ イオンの問題、他の一つは cuticular plate に存在すると想定される variable resistor の問題である。

1954 年 C. Smith²⁰⁾ によって内リンパ液は外リンパ液や組織液と異なり K^+ イオン濃度がきわめて高く、

写真 1

図 13

あたかも細胞内液のようなイオン組成であることが報告された。1972年渡部²¹⁾は比較解剖学的見地から種々の動物の内リンパ液イオン濃度を調べ、 K^+ イオンが聴覚に重要な意味をもつことを報告した。また、田中²²⁾は種々のイオン組成の溶液で内リンパ液を置換し各種電位への影響を調べた。その中で内リンパ液を無 K^+ イオン溶液で置換すると CM が急激に低下することを観察し、正常な CM の感度を維持するには内リンパ液が高 K^+ イオン濃度であることが不可欠であると結論している。これらの研究から内リンパ液中の K^+ イオンが聴覚において重要な意味をもつことは今日では疑う余地はないといえる。しかし逆に内リンパ液の K^+ イオン濃度が正常より高くなった時に CM がどのような影響をうけるかという問題についての報告はない。1969年勝木²³⁾はサメの pitorgan をつかって実験し、その感度が K^+ イオン濃度に比例して高まることを証明した。内リンパ液の特殊なイオン組成は血管条によって維持されていることは明らかであり、伊達¹⁹⁾、平島¹⁸⁾ はここにポンプの存在を推定し、furosemide はこのポンプの働きを止めることで内リンパ液のイオン組成を変化させると推測している。furosemide 投与後の回復期において、内リンパ K^+ イオンの急激な増加があったとすればそれによって有毛細胞の感度が上がり CM の急激な回復があったものと説明できる。

summating potential (SP) については今井¹⁰⁾によって詳しく検討されているが一般に音圧をあげ CM が飽和するころから +SP が -SP に転じ、音圧がさらにあがるにつれて -SP は大きくなるという。今回の観察では、回復期において CM の overshoot につれて -SP も著明な overshoot をおこしており、音圧の変化によって観察される CM, SP の変動経過と同様であった。+SP, -SP はそれぞれ外、内毛細胞から発生するといわれ、SP は両者の和であると考えられる。 -SP は、furosemide 投与後の全経過を通じて CM と一致した変化を示しているようである。一方、直流電位勾配の低下によって -SP から +SP に転ずる現象は、 -SP と異なり +SP が直流電位勾配に依存しない性質の電位であるとも考えられるが、SP の問題は今後さらに検討すべき課題である。

Davis の mechanoelectrical theory は直流電位勾配と cuticular plate に存在すると想定された variable resistor による回路を考えたものである。黒川²⁴⁾、Misrahy²⁵⁾ はこの抵抗値を測定した。黒川はこの抵抗

の大きさを $4400 \pm 900 \Omega$ と報告し、基底膜の変位によりこの抵抗値が変わることを観察している。furosemide 投与後の回復期に何らかの原因でこの抵抗値が大きくなったとすると流れる電流量は小さくとも大きな IR 効果、すなわち CM の増大がおこることになる。以上の仮説は、今後内リンパ液のイオン濃度の変動および cuticular plate の抵抗の測定を行い検討をすすめてゆく予定である。それらを追求してゆくなから、EP と Na^+ ポンプの関連性、内リンパ液の K^+ イオンの意義、また K^+ イオンと variable resistor との関係といった問題に新しい知見の得られることを期待したい。

結 論

anoxia 負荷、furosemide 30 mg/kg 静脈内投与を行い、EP と CM の相関性、さらにコルチ内負電位をも考慮した直流電位勾配と CM の相関性について検討し、以下のごとき結論を得た。

- (1) anoxia 負荷で EP と CM が異なる変動経過をとる現象は見かけ上のもので、これを直流電位勾配と CM の相関性として考えると完全に説明しうる。
- (2) local anoxia と general anoxia では、EP と CM の相対的変動に差はみられなかった。
- (3) anoxia 負荷後の回復期において観察される EP と CM の異なる変動経過は、anoxia による有毛細胞の一時的機能低下によっておこるものと思われる。この現象は第 3 回転では第 1 回転ほど著明でない。これは anoxia に対する易傷性が回転別で異なるためと解釈した。
- (4) furosemide 投与後の回復期において CM は EP の回復する以前に完全回復しさらに著明な overshoot を示す。
- (5) furosemide 投与によってコルチ内負電位は全く変化しない。
- (6) furosemide 投与後の回復期にみられる EP と CM が異なる変動経過をとる現象は、直流電位勾配と CM の相関という概念だけでは説明できない。さらに内リンパ液のイオン変動、cuticular plate の抵抗値の変動などについて検討をすすめる必要がある。

Experimental Study on the Mutual Relation between Endocochlear DC potential and Cochlear Microphonics

Shinichiro Asakuma, Susumu Shida.

Masaaki Suzuki and Noboru Abe

From the Division of Otolaryngology,

Osaka Hospital of Japanese National

Railways, Osaka, Japan

Since the mechanoelectrical hypothesis on the production of cochlear microphonics (CM) was advocated by Davis in 1958 and 1968, it has been agreed that the DC potential gradient of 160 mV which consists of endocochlear DC potential (EP) and negative DC potential in the organ of Corti across the cuticular plate is the electrical source to produce CM. In order to investigate the minute relation between the DC potential gradient and CM, the effects of general anoxia, local anoxia and the injection of furosemide (30 mg/kg) were studied on EP and CM in this paper.

During anoxia CM declined expectedly parallel with the magnitude of the DC potential gradient. After the injection of furosemide both EP and CM declined rapidly and reached to the lowest level within 1 minute. Subsequently, the potentials showed the tendency of immediate recovery. At the stage of this recovery, CM recovered more rapidly than EP and the remarkable overshoot of the amplitude of CM has already been observed even when EP still stayed at the lower level. This is the important finding to neglect the general consideration about the relation between CM and the DC potential gradient. In other words the experimental fact suggests that it does not always need the high voltage of EP to produce CM.

To clarify the relation between the complete recovery of CM amplitude and the lower voltage of EP, the further investigations should be necessary by changing ionic concentration in endolymph and the resistance change at the cuticular plate.

参 考 文 献

- 1) Weber, G. & Bray, C.: The nature of acoustic response. J. Exp. Physiol., 13; 373, 1930.

- 2) von Békésy, G.: Direct observation of the cochlear partition under microscope. *Acta Otolaryng.*, 42; 197, 1952.
- 3) 安野友博, 他: 内耳の電気現象。日本音響学会誌, 30; 193, 1974.
- 4) Davis, H.: A mechanoelectrical theory of cochlear action. *Ann. Otol.*, 67; 789, 1958.
- 5) Davis, H.: Mechanism of the inner ear. *Ann. Otol.*, 77; 644, 1968.
- 6) von Békésy, G.: DC resting potentials inside the cochlear partition. *J. Acoust. Soc. Am.*, 24; 72, 1952.
- 7) Davis, H.: Biophysics and physiology of the inner ear. *Physiol. Rev.*, 37; 1, 1957.
- 8) Tasaki, I. and Spyropoulos, C.S.: Stria vascularis as source of endocochlear potential. *J. Neurophysiol.*, 22; 149, 1959.
- 9) 安野友博: モルモットにおける Endocochlear Potential に関する実験的研究。日耳鼻, 65; 194, 1965.
- 10) 今井 準: 内耳における電気現象の相互関係に関する実験的研究。日耳鼻, 71; 100, 1968.
- 11) F. Suga, et al.: Endocochlear DC potential. *Ann. Otol.*, 73; 924, 1964.
- 12) Butler, R. A.: Some experimental observation on the DC resting potential in the guinea pig cochlea. *J. Acoust. Soc. Am.*, 37; 429, 1965.
- 13) 後藤 健: 各種条件下におけるコルチ器細胞内負電位に関する実験的研究。日耳鼻, 76; 82, 1973.
- 14) P. Dallos: Auditory periphery, biophysics and physiology. Academic Press, New York. 1973.
- 15) 菅野 享, 他: CM. Overshoot の基礎的検討。Audiology Japan, 11; 309, 1968.
- 16) 斎藤 等, 他: 蝸牛の回転別血流動態。Audiology Japan, 11; 1, 1968.
- 17) 山下敏夫: 酸素欠乏の蝸牛有毛細胞に及ぼす影響に関する酵素化学的研究。耳鼻臨床, 65; 591, 1972.
- 18) 平島直子: Furosemide および ethacrynic acid のモルモット Cochlear Microphonics に及ぼす影響。耳鼻, 20; 139, 1974.
- 19) 伊達敬一, 他: 利尿剤による内耳障害の研究。Audiology Japan, 14; 429, 1971.
- 20) Smith, C., Lowry, O.H. and Wu. M-L: The electrolytes of the labyrinthine fluids. *Laryngoscope*, 64; 141, 1954.
- 21) 渡部泰夫, 他: 膜迷路の系統発生と内リンパ電解質。Equilibrium Research, 31; 1, 1972.
- 22) 田中康夫: 内リンパ完全置換の蝸牛電気現象に及ぼす影響。日耳鼻, 66; 999, 1963.
- 23) Katsuki, Y. and Hashimoto, T.: Shark pit organs enhancement of mechanosensitivity by potassium ions.
- 24) 黒川貞夫: モルモット蝸牛の基底膜電気抵抗についての実験的研究。日耳鼻, 68; 1178, 1965.
- 25) Misrahy, G. A. et al.: Electrical properties of wall of endolymphatic space of the cochlea (Guinea pig). *Am. J. Physiol.*, 194; 396, 1958.

(受付 50.5.20)