カナマイシン投与モルモットの電氣的聴性応答

東京医科歯科大学難治疾患研究所神経生理
谷口 郁雄, 村田 計一, 南 定雄

はじめに

種々の抗生物質による耳中毒に際して、コルチ器の有毛細胞の障害が一般に基底部から蝸牛頂に向かって進行するというパターンが病理組織学的な特徴の一つとして明らかにされている¹⁾²⁾。

この内耳の形態的な障害と平行して起こると思われる機能的な障害の進行過程を電氣的な聴性応答の変化から推定する試みがこれまでも数多く報告されている³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾。しかし残念なことには、それらの研究のほとんどがいわゆる急性実験に属するものであり、上記の目的を満足させるには至っていない。また抗生物質を投与した動物から、長期にわたって蝸牛マイクロホン電位を記録した慢性実験もあるが、電極を直接内耳に埋込んだり⁷⁾⁸⁾、蝸牛神経に挿入する⁹⁾ため、いずれも聴覚系末梢の機械的損傷や感染の可能性を完全に否定し得ない¹⁰⁾。

この実験では、モルモットの頭部に電極を慢性的に埋込んで、連日カナマイシンを投与しつつ、acoustic far-field response (FFR)¹¹⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾を経時的に観察した。この FFR の成分は聴覚系伝導路に沿った末梢から中枢に向かって逐次興奮してゆく各部位の電位から成っている。すなわち、蝸牛マイクロホン電位 (CM)、蝸牛活動電位 (AP)、脳幹反応 (BSR)、さらに大脳皮質誘発電位 (EP) の初期成分等が同時に観察される。これらの聴性応答の同時記録は正常あるいは病的なモルモットの各応答間の相互関係を知るのにも役立つであろう。

われわれが得た電気生理学的な結果とこれまでに得られている病理組織学的知見との相関と、現在もなお未解決の問題である CM の起源について検討した。また、この方法が無麻酔動物の聴覚路の活動性を長期間安定に観察するのに適していることを明らかにした。

実験方法

実験方法の詳細は他の論文¹⁷⁾で報告したので、ここでは概略を述べることにする。

慢性実験のために正常なモルモット 6 匹を用い、nembutal 麻酔下 (体重 kg 当り 30 mg) で電極を頭部に埋込んだ。電極として直径 200 μ のテフロン被覆銀線を用い、左側頭部の頭頂骨下縁の硬膜上に挿入した。不関電極としては直径 300 μ の銀線を前額部皮下に埋込んだ。これら 2 本の電極はソケットに接続して、歯科用セメントで頭頂部に固定した。術後少なくとも 1 週間の一定期間を置いて、聴性応答の検査を行った。5 匹の動物から音に対する安定した応答が観察できたので、これらを実験に用いた。

FFR に対する両耳性の影響を調べるために、別にモルモット 3 匹を急性実験に用いた。電極は両側頭部に埋込んだが、電極及びその挿入方法等は慢性実験の場合と同様にした。

刺激音は 4 kHz の正弦波 2 周期でラウドスピーカを駆動し、発生させた。スピーカは固定した動物の頭部から 1 m 前方に設置した。刺激系は 1 インチのコンデンサ・マイクロホン (Brüel and Kjaer 4145) と周波数分析器 (Brüel and Kjaer 2107) を組合せて較正し、刺激の強さはピーク値が 100 dB SPL の持続音に相当するレベルを 0 dB と規定した。刺激頻度は毎秒 2 回に固定した。

応答は FET 入力の前置増幅器を経て、増幅器 (Tektronix 3A9) に導き、帯域 0.1-10 kHz のフィルタで濾波した。雑音に埋もれている CM を記録するには、さらに増幅を行い、2-6 kHz のバンドパス・フィルタを通す必要があったので、電子計算機 (LINC-8) により、CM とそれより遅れて現われる神経性成分を時間的に分離した。これら二種の応答は 128 回の加算平均により平均波形を求め、LINC のスコープ上で一つのトレースにモニターして表示し、写真撮影を行った。

慢性的に動物に埋込んだ電極が安定してから、表 1 に示したように、硫酸カナマイシン体重 kg 当り 400 mg を毎日皮下に注射した。カナマイシン中毒によって応答が全く消失した場合には投与を中止した。しかし、

表 1 モルモット別カナマイシン全投与量

動物 番号	体 重 (g)	カナマイシン 1日量(mg/kg)	投与日数	全投与量
9	800	400	14	4.5
10	530	400	11	2.3
11	650	400	13	3.4
12	1,100	400	14	6.2
13	1,020	400	15	6.1

その後1週間は記録を採り続け、応答の回復の有無を追跡した。

結 果

1. 両耳刺激の FFR に対する影響

左右両側頭部から記録した FFR を図 1 A に示す。応答波形の中の各成分の名称は Jewett¹¹⁾ に従って、CM, P₁, P₂, P₃, P₄ と表示した。ネコ¹¹⁾¹⁴⁾ に比べてモルモットの場合、CM はかなり大きな振幅で観察できる¹⁸⁾。

慢性実験では応答を左側頭部からのみ誘導したが、刺激はフリー・フィールドで与えたため、両耳刺激の影響が FFR の各成分に現われると思われた。この点に関して明らかにするために、左側蝸牛を破壊することによって両側頭部からの FFR の波形にどのような変化が起こったかを図 1 A 及び 1 B に示した。

左側からの応答のうち初期成分 (CM と P₁) の振幅は著明に減少したが、遅い成分 (P₂ から P₄ まで) の変化は僅かであった。逆に右側からの応答については、P₁ が対照の約 1/2 に減少してはいるが、CM の変化は小さく、遅い成分の振幅の減少が著明であった。

2. カナマイシンによる FFR の変化

図 2 はカナマイシンによって聴性応答が劇的に減少し、消失してゆく過程を示している。各記録はカナマイシンの投与開始時点と、急激な変化が起った 12, 13, 14 日目のものである。刺激の強さは四つのレベルとした。

無麻酔動物では、EP の初期相も観察できる。図 2 A 及び 2 B の右端に長い潜伏期をもって大きく偏位する電位がそれである。CM は 1 日目 (A) -30 dB のレベルでも明らかに認められるが、12 日目 (B) では -20 dB の強さでもはっきりしない。EP のピークの潜伏期もすべての刺激レベルにおいて延長している。13 日目 (C) になって初期成分の劇的な減少が起こった。しかし EP は -20 dB でも観察できる。14 日目 (D) には最高の強さ -10 dB の刺激を与えても、すべての成分の発生をみなかった。この例では、カナマイシンの投与は 14 日目に中止したが、その後、依然として応答は回復しなかった。

図 1 4kHz 2 周期の刺激音に対する FFR。左右両側頭部から記録した FFR に対する両耳性の相互作用を左側蝸牛のみの破壊前 (A) と破壊後 (B) とで比較した。CM とそれより遅れる神経性成分を異なる増幅率とバンドパスによって別々に誘導し、矢印で示した時点で、両者を一つのトレース上にモンタージュした。刺激の強さは -10 dB であった。較正は CM と神経性成分の振幅に関して、それぞれ 5 μ V と 10 μ V を示し、時間軸に関しては 2 ms を示す。

図2 カナマイシン中毒の進行に伴って起った FFR の変化。対照(A)と急激な変化が起った日の前後(B, C, D)の波形である。記録した日は各グラフの右肩に表示した。カナマイシン投与12日目から14日目にかけて急激な変化が起っている。較正は CM と神経性成分の振幅に関してそれぞれ $5\mu\text{V}$ と $10\mu\text{V}$ を示し、時間軸に関しては 2ms を示す。

図3の左右の両グラフは異なる個体についての結果である。 -10dB の刺激に対する CM, P_1 及び P_4 の各振幅を時間に対して定量的に図示した。CMの振幅はピーク値, P_1 と P_4 の振幅は下降脚を測定した。

左方のグラフ (G11) において, CM の振幅は他の成分に比べて早期に減少し始めている。CM の消失は13日目に起こり, P_1 と P_4 の消失は14日目に起こった。CM は消失する前に漸減するような時期がある。同様の現象は右方のグラフ (G13) においても認められ,

CM, P_1 及び P_4 の消失はそれぞれ11日, 15日, 12日目であった。

EP の減少は一般に投与開始後約2週間で始まり, その急激な減少は2日間で 80dB 以上にも達する。EP が完全に消失した後は回復するようなことはなかった。

カナマイシンの1日当り投与量は体重に比例して 400mg/kg としたが表1で明らかなように, 体重の小さい動物ほど EP の消失が早くなる傾向にある。

図3 CM, P₁ および P₄ の振幅の変化。異なる2個体から得た結果である。小さな矢印は S/N の限界に達したことを示す。CM が他の成分に先行して減少, 消失し, すべての応答が 15 日以内に消失した。刺激の強さは -10 dB であった。

考 察

フリー・フィールドで音刺激を与え, モルモットの両側頭部から FFR を記録すると, FFR 中の初期成分と遅い成分とでは, 両耳刺激によって異なる影響を受けることがわかった。一侧の蝸牛を破壊すると, それと同側の側頭部から誘導した初期成分 (CM と P₁) はほとんど消失するが, これらより遅い成分はほとんど同じ振幅を保った。これに対して, 反対側から誘導した FFR の成分については, 逆の関係が認められた。この事実は解剖学的に非交叉性の初期成分に対しては主に同側の電位が寄与し, 交叉性あるいは非交叉性に拘らず, 頭蓋内に起源を持つと思われる遅い成分は両側性に強い影響を受けていることを示す。Buchwald と Huang¹⁶⁾ は各成分の起源を証明するために, ネコの聴覚伝導路に沿って連続的に切断実験を行った。その結果, P₂ から P₆ は交叉性及び非交叉性の投射によって頭蓋内に発生する電位に起因すると主張した。

このような観点からみると, 側頭部に置いた電極は, 聴覚伝導路に沿って多くの部位に起源を持ち, しかも両側性に加算された結果である電界を誘導していることになる。しかし, われわれの結果は FFR の成分によって両側からの影響の受け方が異なることを明らかにした。一方, カナマイシンを注射等により全身的に投与しても, CM の減少に関して左右の蝸牛の間

に差が認められている⁷⁾。従って, 電極を置く位置は目的とする蝸牛と同側の側頭部とするのが望ましいであろう。

すべてのモルモットにおいて, 神経性成分がまだ観察し得ても, CM は既に消失している時点があった。CM が早期に消失する事実は次のように解釈できるであろう。ここで記録された CM に主に寄与すると思われる基底回転¹⁸⁾の有毛細胞に障害を受ける。その時点でまだ残存している上部の回転の有毛細胞は, ここで用いたような幅広いスペクトルを持つ過渡音の低い周波数成分には応じ得るために, 神経性応答の発生が可能であったのであろう。このような解釈は, 抗生物質による耳中毒に際して, 有毛細胞の障害が基底部から蝸牛頂に向って進行するという病理組織学的な知見と矛盾しない。

内毛細胞と外毛細胞のカナマイシンに対する感受性の差は病理組織学的にはよく知られている¹⁾²⁾が, 電気生理学的な相関は十分に証明されていない。Dallos と Wang⁶⁾によると, 内毛細胞が CM の発生に寄与する程度は外毛細胞に比べて 30~40 dB ほど低い。図3で明かなように, CM はその消失に先立って漸減する時期がある。時期的に, これは外毛細胞よりも高い域値を持つといわれている内毛細胞がまだ残存している過程におそらく相当するのであろう。

高度の中毒が生じている動物では EP のみ記録され

る時点がある。この事実は聴覚系の上位と下位の系の間の入出力関係の非線性を示すであろう。この現象の一つの解釈としては、まだ侵されていない蝸牛の上部回転に分布するニューロンの発火の同期性が悪く、経過の短い P_1, P_2 等として観察できないが、正常のままである上位中枢を興奮させることが可能な入力があったためと思われる。しかし、EP もカナマイシン投与後約2週間で消失し、その時点で投与を中止しても、その後の応答の回復は認められなかった。

Davis¹⁹⁾はCMが有毛細胞の出力であることを主張し、現在この仮説が一般に受け入れられている。われわれの結果はカナマイシンによってCMが末梢性及び中枢性の活動電位よりも早期に消失することを示した。サカナやカエルの有毛細胞を持つ器官を用いた研究は耳毒性の抗生物質が作用する場所が有毛細胞の表面の膜であることを明らかにした²⁰⁾²¹⁾²²⁾。モルモットの蝸牛についての病理組織学的な知見とわれわれの電気生理学的な結果との相関は、CMが有毛細胞で発生し、聴覚の初期の生物物理学的な過程で重要な役割を果たすことを示唆する。

動物の頭部からFFRを記録する方法はいくつかの利点を持っている。聴覚伝導路に損傷を与えないために3カ月以上にもわたって長期間安定した電氣的応答を記録することができる。さらに無麻酔下で、伝導路に沿って発生する各部位の電位を同時記録することができるので、各電位の経時的な変化の相互関係の情報も得られる。われわれはこの方法を慢性有機水銀中毒の際の聴覚系の電気生理学的な変化を追求する手段としても応用した²³⁾。

ま と め

モルモットの側頭部硬膜上に銀電極を慢性的に埋込み、カナマイシンの耳毒性を acoustic far-field response (FFR) によって経時的に観察した。FFR に対する両耳性の相互作用は一側の蝸牛を破壊する急性実験によって検討した。FFR の初期成分である蝸牛マイクロホン電位 (CM) と蝸牛活動電位 (AP) の一部に対しては主に同側の蝸牛が寄与し、遅い成分である脳幹反応 (BSR) と大脳皮質誘発電位 (EP) の初期相は複雑に両側性の影響を受ける。カナマイシンは 400 mg/kg を皮下に毎日注射した。CM は他の神経性成分より早期に消失し、EP は最後に消失した。カナマイシン投与後約2週間で、応答の劇的な減少が起こり、2日間で 80 dB 以上にも達した。これらの結果が

ら CM が有毛細胞で発生し、聴覚に関与する初期の過程で重要な役割を果たしていることが推察される。

Auditory Electric Responses in the Kanamycin-Treated Guinea Pig

Ikuro Taniguchi, Keiichi Murata,
and Sadao Minami

Dept. of Neurophysiology, Medical Research
Institute, Tokyo Medical and Dental University

The acoustic far-field response (FFR) was observed in Kanamycin-treated guinea pigs from silvère wire electrodes chronically implanted in the epidural space of the temporal site. Binaural interaction was also checked by unilateral destruction of the anesthetized animal's cochlea. The early components of FFR, i.e., cochlear microphonics (CM) and a part of cochlear action potentials (AP) recorded from the temporal site were mainly contributed by the cochlea homolateral to the recording site. Later components, i.e., the brain stem responses (BSR) and early phase of cortical evoked potentials (EP), were affected bilaterally and showed complex characteristics. Kanamycin was injected subcutaneously (400 mg/kg) daily. CM disappeared primarily while the other neural responses persisted. EP was the last to be recorded. Abrupt decrease in amplitude of the responses of more than 80 dB within 2 days occurred approximately 2 weeks later. The bioelectric correlates may suggest that CM is generated at the hair cells and plays a significant role in the hearing process.

参 考 文 献

- 1) Engström, H. and Kohonen, A.: Cochlear damage from ototoxic antibiotics. *Acta Otolaryngol.*, **59**; 171-178, 1965.
- 2) Kohonen, A.: Effect of some ototoxic drugs upon the pattern and innervation of cochlear sensory cells in the guinea pigs. *Acta Otolaryngol.*, Suppl. **208**; 1-70, 1965.
- 3) Hawkins, J.É.: Cochlear signs of streptomycin intoxication. *J. Pharmacol. and Exper.*

- Therap., **100**; 38-44, 1950.
- 4) Davis, H., Deatherage, B.H., Rosenblut, B., Fernandez, C., Kimura, R., and Smith, C.: Modification of cochlear potentials produced by streptomycin poisoning and by extensive venous obstruction. *Laryngoscope*, **68**; 596-627, 1958.
 - 5) Ward, P.H. and Fernandez, C.: The ototoxicity of kanamycin in guinea pigs. *Ann. Otol.*, **70**; 132-142, 1961.
 - 6) Dallos, P. and Wang, C-Y.: Bioelectric correlates of kanamycin intoxication. *Audiology*, **13**; 277-289, 1974.
 - 7) Simmons, F.B., Galambos, R. and Albrite, J. P.: Serial studies of the onset and progression of drug-induced cochlear damage in cats. *Arch. Otolaryngol.*, **72**; 233-239, 1960.
 - 8) Galambos, R.: Studies of the auditory system with implanted electrodes. In: Rasmussen and Windle (Ed.) *Neural mechanisms of the auditory and vestibular systems*. Illinois: Charles C. Thomas, 137-151, 1965.
 - 9) Farkashidy, J., Black, R.G., and Briant, T.D. R.: The effect of kanamycin on the internal ear: An electrophysiological and electron microscopic study. *Laryngoscope*, **73**; 713-727, 1964.
 - 10) Legoux, J. P.: Technique d'enregistrement des potentiels cochleaires sur l'animal éveillé. *C. rend. Soc. biol.*, **151**; 218-222, 1957.
 - 11) Jewett, D.L.: Volume-conducted potentials in response to auditory stimuli as detected by averaging in the cat. *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.*, **28**; 609-618, 1970.
 - 12) Jewett, D.L., Romano, M.N. and Williston, J.S.: Human auditory evoked potentials: Possible brain stem components detected on the scalp. *Science*, **167**; 1517-1518, 1970.
 - 13) Jewett, D.L. and Williston, J.S.: Auditory-evoked far fields averaged from the scalp of humans. *Brain*, **94**; 681-696, 1971.
 - 14) Lev, A. and Sohmer, H.: Sources of averaged neural responses recorded in animal and human subjects during cochlear audiometry (electro-cochleogram). *Arch. klin. exp. Ohr.-. Nas.- u. Kehlk. Heilk.*, **201**; 79-90, 1972.
 - 15) Hecox, K. and Galambos, R.: Brain stem auditory evoked responses in human infants and adults. *Arch. Otolaryngol.*, **99**; 31-33, 1974.
 - 16) Buchwald, J.S. and Huang, C-M.: Far-field acoustic response: origins in the cat. *Science*, **189**; 382-384, 1975.
 - 17) Taniguchi, I., Murata, K., and Minami, S.: Acoustic far-field responses in the kanamycin-treated guinea pig. *J. Aud. Res.*, in press.
 - 18) 谷口郁雄, 村田計一, 南 定雄: モルモットの聴性脳幹反応と蝸牛内反応との関係. *Audiology Japan*, **19**; 187-192, 1976.
 - 19) Davis, H.: Some principles of sensory receptor action. *Physiol. Rev.*, **41**; 391-416, 1961.
 - 20) Wersäll, J. and Flock, A.: Suppression and restoration of the microphonic output from the lateral line organ after local application of streptomycin. *Life Science*, **3**; 1151-1155, 1964.
 - 21) Harada, Y., Musso, E., and Mira, E.: Action of streptomycin, dihydrostreptomycin, neomycin and kanamycin on the ampuller receptors of the frog. *Acta Otolaryngol.*, **64**; 327-337, 1967.
 - 22) Matsuura, S., Ikeda, K., and Furukawa, T.: Effects of streptomycin, kanamycin, quinine, and other drugs on the microphonic potentials of goldfish sacculus. *Jap. J. Physiol.*, **21**; 579-590, 1971.
 - 23) 秋吉正豊, 村田計一, 谷口郁雄, 他: 慢性有機水銀中毒症における聴覚系の電気生理学的ならびに酵素組織化学的研究. 文部省特定研究「難病」班, 難病の発症機構に関する基礎的研究, 昭和50年度研究業績, 451-454, 1976. (受付 52.1.26)