STUDIES ON PROTEIN IN LABYRINTHINE FLUID

By
A. ITO

From the Department of Oto-Rhino-Laryngology, Nagoya University School of Medicine. (Director: Prof. S. Goto)

The author developed a new ultra micro method of protein determination for labyrinthine fluid, and labyrinthine fluid of guinea pigs and rabbits under various conditions was analysed and following results were obtained.

1) The author developed a new ultra micro method of protein determination applying the principle of crystal pattern of drop. The principle of the method was discussed and by using this method, it was found that total protein level of the perilymph was higher than that of the endolymph or the spinal fluid, and lower than that of the serum.

2) Applying the crystal pattern of drop and ultrafiltration under negative pressure, two new effective methods to concentrate ultra micro samples were developed. By these methods, the paper electrophoresis of protein in labyrinthine fluid was performed.

3) In experimental otitis media and tubal stenosis, changes in protein level of perilymph was observed.

4) Changes in protein level of labyrinthine fluid caused by sound stimulation, egg white allergy, Reilly's phenomenon, liver and kidney disturbances were closely observed.

内 耳 液 の 蛋 白 質 に 関 す る 研 究

第 1 編 内耳液の総蛋白量測定に関する研究

第 2 編 内耳液の蛋白質分割測定に関する研究

第 3 編 実験的伝音系障害時の内耳液蛋白質に関する研究

第 4 編 実験的感音系障害時の内耳液蛋白質に関する研究

名古屋大学大学院医学研究科外科系耳鼻咽喉科専攻（指導： 後藤修二教授）

伊 藤 明 和
イ トウ アキ カズ

目 次

第 1 編 内耳液の総蛋白量測定に関する研究

第 1 章 緒 言

第 2 章 実験材料

第 1 節 実験動物

第 2 節 被検液採取法

第 3 章 実験方法—特に微量蛋白質の新測定法について—

第 1 節 液滴結晶像による測定の理論

第 2 節 液滴結晶法による超微量蛋白質定量

第 4 章 測定法の吟味

第 1 節 再現性

第 2 節 無機物質の影響

第 3 節 pH の影響

第 4 節 温度の影響

第 5 節 湿度の影響

第 6 節 保存の影響

第 5 章 実験成績

第1節 正常海鼠内耳液の総蛋白量

第2節 正常家兎内耳液の総蛋白量

第3節 測定方法の相異による測定値の変動

第6章 総括及び考按

第7章 結 語

第2編 内耳液の蛋白質分割測定に関する研究

第1章 緒 言

第2章 実験材料

第1節 実験動物

第2節 被検液採取法

第3章 実験方法—特に濃縮についての1新方法—

第1節 濾紙電気泳動法

第2節 蛋白質濃縮法

第3節 濃縮法の検討

第4章 実験成績

第1節 蛋白質分割

第2節 リポ蛋白質

第3節 糖蛋白質

第5章 総括及び考按

第6章 結 語

第3編 実験的伝音系障害時の内耳液蛋白質に関する研究

第1章 緒 言

第2章 実験材料

第1節 実験動物

第2節 被検液採取法

第3章 実験方法

第1節 聴器障害方法

第2節 濾紙電気泳動及び蛋白質定量法

第4章 実験成績

第1節 実験的急性中耳炎動物

第2節 実験的耳管狭窄症動物

第5章 総括及び考按

第6章 結 語

第4編 実験的感音系障害時の内耳液蛋白質に関する研究

第1章 緒 言

第2章 実験材料

第1節 実験動物

第2節 被検液採取法

第3章 実験方法

第1節 音響性聴器障害惹起法

第2節 アレルギー性聴器障害惹起法

第3節 Reilly 現象惹起法

第4節 肝、腎障害惹起法

第5節 総蛋白量測定法

第6節 蛋白質分割測定法

第4章 実験成績

第1節 音響性聴器障害

第2節 アレルギー性聴器障害

第3節 Reilly 現象

第4節 肝、腎障害

第5章 総括及び考按

第6章 結 語

参考文献

第1編 内耳液の総蛋白量測定に関する研究

第1章 緒 言

音波が聴覚受容器へ伝達されるには、迷路内液体系と
いう一つの媒質の存在を必要とし、換言すれば内耳液な
くしては聴覚機構の成立は不可能なわけである。

しかし乍ら内耳液は単に音響伝播の媒質としての意義
を有するのみではなく、また内耳物質代謝に直接、間接
に関与して聴覚障害とも密接な関係を有する事が近時よ
うやく注目せられ、難聴問題解決の一方法として内耳液
の生化学的研究の必要性が認められるに至っている。

さて内耳液研究の歴史を遠く遡れば1913年 Doerss-
charte の報告があり、本邦においても1930年海江田⁷¹⁾
による鯪の内耳液分析の報告があるが、研究のその歴史

の古さにも拘らず、今尙基礎的問題についてすら決定的
な見解が得られていないことは大いに反省されなければ
ならない。しかしてその研究に著るしい進展の見られな
かつた原因の一つとしては、解剖的に実験操作が困難な
こと、また試料としての内、外リンパの量が甚だしく微
量である事が考えられ、これらを克服するには先ず測定
法自体についての考究が必要であり、私の研究の重点の
一つはここに置かれている。

さて次に内耳液の蛋白質については、前述の如く海江
田は鯪の内耳液について総窒素量の測定を行なってい
るが、内耳液の総蛋白量の測定については、Ledoux⁹⁰⁾
(1950), Waltner and Raymond¹⁸⁹⁾ (1950), Vilstrup

and Jensen¹⁸⁶⁾ (1954), Smith, Lowry and Wu¹⁸⁶⁾ (1954), Citron, Exley and Hallpike²³⁾ (1956), Antonini, Casorati and Crifo⁴⁾ (1957), Chevance, Galli and Jeanmaire²¹⁾ (1959), Rauch¹²⁶⁾ (1960) etc の報告が見られる。

私は測定法に関しては液滴結晶像を利用する超微量蛋白質定量の一新法を考案したが、本法は前述各研究者の測定法に比して優れた点が多く、内耳液の如き超微量蛋白質定量に最も有力な方法の一つと考えられるので、特にこの方法を中心として本測定法の詳細なる吟味の結果並びに得られた測定成績について記したい。

第2章 実験材料

第1節 実験動物

実験動物としては海猿及び家兎を使用した。海猿は体重 500g 前後で鼓膜正常にしてプライエル氏耳介反射正常なるもの、家兎は体重 3000g 前後で鼓膜正常なるものを使用した。

第2節 被検液採取法

第1項 内、外リンパ採取法

内、外リンパの採取は当教室で行っている方法に従った。合理的な内、外リンパの分離採取を初めて行つたのは Aldred 等²⁾ (1940) であるが、当教室ではこれに改良を加えた方法を用いており、その詳細は既に松生¹⁰¹⁾ (1957) が発表しているのでこゝにその概略のみを述べる。

まず試獣の頸動脈を切断して急速に失血死せしめ、直ちに断頭した後、中耳骨胞を開放し、耳小骨を除去し、瑠璃色硬質硝子毛細管（目盛 0.001）を用いて蝸牛窓より鼓室階外リンパを、前庭窓より前庭階外リンパを採取する。

次いで内リンパの採取であるが、蝸牛窓周辺の骨を鉗除し第二鼓膜を除くと、蝸牛基礎廻転部の骨性及び膜性ラセン板の一部を観察し得る。そこで濾紙によつて残余外リンパを吸収し、次いで解剖双眼顕微鏡の明視下に、マイクロドリルを改良したマイクロマニプレーターに毛細管（目盛 0.0001）を装着して、その尖端を膜性ラセン板に接近させ僅かにこれを穿孔して蝸牛管内リンパを採取する。また松生によると、内リンパ採取に用いる硝子毛細管尖端の外径の理論的数値を海猿の膜性ラセン板の幅の測定値より算出し、毛細管の尖端外径は 0.1mm 以下であれば充分であるとされているのでこれに従った。なお教室の液滴結晶像観察法によつて内、外リンパに赤血球を認めたものは、その内、外リンパの血液による汚

染を考えて実験より除外した。

第2項 髄液採取法

試獣を腹臥位で固定器上に四肢を緊縛し、または前項において述べた如くにして失血死せしめた試獣について、頭部を強く前屈せしめ、しかる後に先端を鈍に切つた 1/3 注射針をツベルクリン用注射器に附して後頭下腔に刺入して髄液を採取した。

第3章 実験方法

一 特に微量蛋白質の1新測定法について

総蛋白量測定には第6章において述べる如く従来多くの方法が報告せられており、また微量蛋白質定量にも様々な工夫がこらされている。しかるに内リンパの総蛋白量は海猿にては1耳につき 0.1r 前後であつて、試料を Pool しなければその総蛋白量測定は不可能であり、前述の各測定者も試料を Pool して実験を行つている。従つて私は海猿1耳の内リンパの蛋白質定量をも可能ならしめるために、液滴結晶像を応用せる微量蛋白質定量法を考案した。

第1節 液滴結晶像による測定の理論

被検液の一定量を乾燥して結晶を生成せしめ、これを封じて顕微鏡下に観察し、無機、有機物質の総合的な観察を行う事については、教室の三宅、松崎¹⁰⁷⁾ (1955) が報告している所である。

被検液の一定量がガラス板上に滴下された場合に、その被検液は液滴の周辺部より乾燥が始まつてその部の濃度が大となるが、流動学から考えると、高分子溶液における Brownian motin に基く高分子の分子間張力は、高分子溶液の濃度が大なる程大であるので、その液滴の蛋白質濃度大なる周辺部において蛋白質の分子間張力は大きくなり、その結果液滴中の蛋白質分子は次第に液滴の周辺部に集まり、遂には顕微鏡下に周辺無構造輪状部として観察されるに至る。

次にこの液滴を物理学的に考察する。

第 1 図

第1図の如く被検液の蛋白質密度を ρ_A 、液滴結晶形成時の液滴周辺の蛋白質密度を ρ'_A 、液滴の半径を R_2 、この R_2 から周辺無構造輪状部の幅をひいたものを R_1 、液滴の高さを d 、液滴結晶形成時の液滴周辺の蛋白質の高さを l とすると、次の式が成立する。

なお写真は液滴結晶周辺輪状部の横断面を撮影したものである。

$$\rho_A \cdot \frac{(\pi R_2^2 + \pi R_1^2)}{2} \cdot d = \rho'_A \cdot \frac{(\pi R_2^2 - \pi R_1^2)}{2} l \dots\dots(1)$$

液滴結晶全面積を A 、輪状部面積を B とすると、

$$\frac{B}{A} = \frac{\pi R_2^2 - \pi R_1^2}{\pi R_2^2 + \pi R_1^2} = \frac{\rho_A}{\rho'_A} \cdot \frac{d}{l} \cdot \frac{(\pi R_2^2 + \pi R_1^2)}{\pi R_2^2} \dots\dots(2)$$

$$= \frac{\rho_A}{\rho'_A} \cdot \frac{d}{l} \left[1 + \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^2 \right] \dots\dots(3)$$

また l を実験的に測定すると第1表、第2図の如くである。なおこの l の測定は予め裏面に切線をつけた cover glass 上に液滴結晶を形成した後、後述する方法によつて蛋白質を染色し、液滴を横断して cover glass を折割し、その切断面を顕微鏡測微計により計測する事により行つた。この際液滴量は 0.0005cc である。

第1表

総蛋白量 (g/dl)	l (μ)
0.019	2
0.038	3
0.055	3
0.076	4
0.110	4
0.145	5
0.290	7
0.580	10

第2図

この成績から凡そ次の如き関係式が成立する。

$$l = K \sqrt{\rho_A} \quad K: \text{定数} \dots\dots(4)$$

液滴の体積 $V = \frac{\pi R_2^2 + \pi R_1^2}{2} \cdot d$ であるので、 V が

一定ならば液滴を顕微鏡下に可能な限り同一の大きさになるように滴下すれば d は近似的に一定と考えられる。 $\dots\dots(5)$

$$\frac{R_1}{R_2} = 1 \quad \dots\dots(6)$$

従つて $\frac{B}{A} = \frac{\rho_A}{\rho'_A} \cdot \frac{d}{l} \cdot K' = \frac{\rho_A}{\rho'_A} \cdot K'' \quad K', K'': \text{定数} \dots\dots(7)$

しかして、 $d, l, \frac{R_1}{R_2}$ の $\frac{B}{A}$ に及ぼす影響について考察する。

まず d は実際上近似的に一定であるが、液滴の平衡状態における A の僅少な変動に対して d と l はほぼ平行的变化をなすので、(3) において $\frac{B}{A}$ にその影響は現われ難い。

l が (4) に示す如き性質を示す事は ρ_A の大となるに従い $\frac{B}{A}$ の大となる割合が減少する事を示すものである。即ち $\frac{B}{A} = \sqrt{\rho_A} \cdot K'''$ (K''' : 定数)。

$\frac{R_1}{R_2} = 1$ の関係は ρ_A の小なる範囲において明らかであるが、 ρ_A の大なる範囲においてはその値は小なる範囲におけるより小となるが、 l と $\frac{R_1}{R_2}$ の数値の変動の状態より考えると $\frac{B}{A}$ に与える影響は $\frac{R_1}{R_2}$ は l に比し遙かに小なる事が分る。

しかして B はその液滴の総蛋白量と平行関係を有する事は (2) において液滴量が一定なる場合 $\pi R_2^2 + \pi R_1^2$ が一定である事より理解できる。

また $\frac{B}{A}$ はその理論式において液滴量と関係しないので、 d を一定になすように操作すれば総蛋白量 (g/dl) と $\frac{B}{A}$ の関係グラフは液滴量が異つても同一のものでよい事になるが、この事については実験的に後述する。

第2節 液滴結晶法による超微量蛋白質定量

第1項 結晶作成法

温度 30°C、湿度 60% の恒温槽を用いて、0.0005cc～0.005cc の被検液をガラス板上に滴下せしめ、結晶を作成した。これを以下液滴結晶と呼ぶ。

なお試料の量は 0.0005cc を基準としたが、試料が比較的多く得られる場合には 0.001, 0.005cc 等も併せ用いた。

第2項 液滴結晶像の蛋白質部の確認

1) 液滴結晶になんらの操作も加えずに周辺無構造輪状部を観察する。

2) 染色法: 液滴結晶の火焰固定を行つた後、BPB 染色液 (BPB 1g, 昇汞飽和, エタノールにて 100cc) にて 3 分間染色し、その後エタノールで脱色を行うと、周辺蛋白質部が輪状に青染されるのでこれを乾燥する。

3) 輪状染色部の内側縁の不鮮明の時は、試料に一定量の蒸留水を加えて液滴結晶を作成するとその染色像は鮮明となる。

第3項 測定

前述の A と B より $\frac{B}{A} \times 100$ を求める。

人血清の総蛋白量を Robinson¹²⁷⁾ 等の方法を使用して測定した後にリンゲル液にて階段稀釈を行い、各濃度の溶液を作成し、それと $\frac{B}{A} \times 100$ との関係を記すと第2表の如くである。

第2表 液滴結晶(人血清)
試料 0.0005cc

総蛋白量 % <i>alt</i>	$\frac{B}{A} \times 100$
0.017	1.71
0.025	2.12
0.034	2.95
0.050	3.10
0.068	3.57
0.100	4.69
0.136	5.01
0.272	7.79

また液滴結晶の A 並びに B の測定は次の二法によつた。

(1) 引伸し法：液滴結晶の50倍拡大像を35ミリフィルムにて顕微鏡撮影し、これを引伸し器によつて直径5倍に拡大投影し、印画紙に追跡して後、その液滴全面積の重量を A、輪状部の重量を B として Torsion Balance によつて測定する。

(2) 顕微鏡測微計による方法：顕微鏡下に測微計により液滴の直径及び周辺輪状部の幅を測定し、その値より $\frac{B}{A}$ を算定する。しかしてこの方法は概略の値を迅速に知り得る特徴を有する。なお私は(1)の方法により実験を行つた。

これを対数方眼紙に図示すると第3図の如くである。

第3図 総蛋白量と $\frac{B}{A} \times 100$

即ち $\frac{B}{A} \times 100$ と総蛋白量は対数方眼紙上において直

線的比例関係を示し、前述の $K''' \approx 1.4$ となる。

このような成績よりして $\frac{B}{A} \times 100$ を測定する事により総蛋白量を測定し得る事が分る。

第4項 動物差の問題

人血清でなくして他の血清、例えば私が実験に用いる海狸、家兎ではどのような関係を示すであろうか。

そこで海狸及び家兎について、前述の人血清の場合と同様にして、その血清にリンゲル液を加える事により各濃度のものを作成し、液滴結晶によつて $\frac{B}{A} \times 100$ を求め、それと総蛋白量との関係を調べた。

第3表は海狸及び家兎の総蛋白量と $\frac{B}{A} \times 100$ との関係を記したものであり、第4図はそれを図示したものである。

これらの表並びに図から分るように、海狸及び家兎の血清は何れも人血清の場合とその傾向が類似しており、この点私の実験に非常に好都合である。

第3表 液滴結晶 試料 0.0005cc

海 狸		家 兎	
総蛋白量 % <i>alt</i>	$\frac{B}{A} \times 100$	総蛋白量 % <i>alt</i>	$\frac{B}{A} \times 100$
0.013	1.43	0.016	1.75
0.026	2.26	0.032	2.29
0.039	2.59	0.042	2.88
0.052	3.29	0.064	3.61
0.078	3.67	0.084	3.91
0.104	4.31	0.106	4.52
0.156	5.82	0.128	5.11
0.312	7.83	0.256	7.02

第4図 総蛋白量と $\frac{B}{A} \times 100$

第5項 液滴の量について

前述の理論式によつて $\frac{B}{A} \times 100$ は d が一定の範囲内

にて液滴量に無関係である事が分るが、実際にこれを検討するため前述の実験において使用したリンゲル液稀釈人血清を用いて、その液滴量を 0.0005cc, 0.001cc, 0.005cc とした場合の $\frac{B}{A} \times 100$ を測定すると第4表の如くであり、この場合 d が一定となる如く 液滴全面積を液滴量の倍率だけ大となして測定を行つた。

第4表 液滴量の関係 $\frac{B}{A} \times 100$

液滴量 cc	0.0005	0.001	0.005
0.017	1.71	1.76	1.65
0.025	2.12	2.10	2.18
0.034	2.95	2.90	2.86
0.050	3.10	3.18	3.11
0.068	3.57	3.60	3.50
0.100	4.69	4.76	4.62
0.136	5.01	5.00	5.09
0.272	7.79	7.69	7.75

即ち $\frac{B}{A} \times 100$ は液滴量の上述の如き範囲の変動によつて殆んど変化せず、理論式と一致する事が分る。

第4章 測定法の吟味

液滴結晶像による測定の理論については前述したが、本章では実際に各条件下における測定値の検討を行つた。

第1節 再現性

測定成績の再現性の問題は極めて重要であるが、リンゲル液稀釈人血清について、その総蛋白量が 0.034g/dl, 0.068g/dl 及び 0.102g/dl のものをそれぞれについて 10 回測定して得た $\frac{B}{A} \times 100$ は第5表の如くである。

第5表 再現性 $\frac{B}{A} \times 100$ 試料 0.001cc

回	0.034	0.068	0.102
1	2.51	3.62	4.43
2	2.42	3.69	4.52
3	2.59	3.60	4.45
4	2.52	3.51	4.38
5	2.47	3.59	4.32
6	2.61	3.71	4.50
7	2.53	3.65	4.48
8	2.59	3.49	4.40
9	2.48	3.65	4.45
10	2.60	3.60	4.53
平均	2.52 ± 0.019	3.61 ± 0.022	4.45 ± 0.021

即ち総蛋白量が 0.034g/dl, 0.068g/dl, 0.102g/dl の場合その $\frac{B}{A} \times 100$ の平均値はそれぞれ 2.52 ± 0.019 , 3.61 ± 0.022 , 4.45 ± 0.021 であり、その再現性は良好である。

第2節 無機物質の影響

無機物質の影響を知るために、リンゲル液の成分を次の如くに変化させ、これによって各種濃度の人血清溶液を作成し、その時の $\frac{B}{A} \times 100$ の変動を観察した。

リンゲル液の無機物質を次の7種類にしたものについて、その各々につき実験を行つた。

- (1) KCl を 0.1g/dl に
- (2) NaCl を 2.0g/dl に
- (3) CaCl_2 を 0.05g/dl に
- (4) MgCl_2 0.05g/dl 添加
- (5) H_3PO_4 0.05g/dl 添加
- (6) (1), (2), (3), (4), (5) 及び NaHCO_3 , 0.002g/dl の溶液
- (7) NaCl 0.08g/dl, KCl 0.0002g/dl CaCl_2 0.002g/dl, NaHCO_3 0.0002g/dl

第6表はこれらの $\frac{B}{A} \times 100$ に及ぼす影響を調べたものであり、第5, 6 図はこれを図示したものである。

第6表 無機物質の影響 $\frac{B}{A} \times 100$ 試料 0.001cc

無機物質 濃度 g/dl	対 照 (12g/l 濃)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
0.024	2.08	2.01	1.98	2.12	2.05	1.92	1.95	2.10
0.036	2.55	2.49	2.62	2.51	2.59	2.45	2.63	2.50
0.048	2.95	2.84	2.98	3.05	2.91	2.89	2.95	3.00
0.072	3.62	3.69	3.55	3.60	3.68	3.57	3.54	3.60
0.096	4.30	4.22	4.39	4.40	4.35	4.31	4.28	4.25
0.144	5.35	5.30	5.22	5.28	5.40	5.34	5.30	5.36
0.288	7.62	7.65	7.58	7.69	7.60	7.65	7.66	7.64

即ち無機物質のこの程度の変動が $\frac{B}{A} \times 100$ に及ぼす影響は極めて少く、無機物質の増、減量の示すこのような事実は、教室の芦原 11) (1960) の報告による内耳液無機物質の変動範囲が、私のこの実験における無機物質の検討範囲に比して甚しく狭い事より考えても、また測定の理論の節で前述した理論式に無機物質が直接影響すると考えられる因子のない事よりしても、本法を超微量蛋

白質定量に使用するに当つては、無機物質の影響を特に考慮する必要はないと考える。

第5図 無機物質の影響 (その1)

第6図 無機物質の影響 (その2)

第3節 pH の影響

試料の pH がその $\frac{B}{A} \times 100$ に及ぼす影響を検討するため、人血清をリンゲル液にて稀釈し、その総蛋白量を 0.024g/dl, 0.048g/dl, 0.096g/dl, 0.288g/dl にした試料の pH を、NaOH 並びに HCl によつて変化させてその液滴結晶について観察した。

第7表は上記各濃度の試料において、pH の変動による影響の状態を観察したものである。

第7表 pH の影響 $\frac{B}{A} \times 100$ 試料 0.001cc

総蛋白量 g/dl \ pH	7	7.5	8
0.024	2.10	2.05	2.03
0.048	3.02	3.09	2.94
0.096	4.41	4.34	4.30
0.288	7.84	7.72	7.76

即ち pH7 乃至 8 の間においては $\frac{B}{A} \times 100$ の変動は極

めて小であり教室の中島¹¹⁶⁾ (1954) による内耳液及び髄液の pH 変動の範囲内においては本法の算る影響は殆んど無視し得る事が明らかである。なお pH 変動に基く蛋白質の性質変化の影響は殆んど認められない事が分る。

第4節 温度の影響

液滴結晶作成時の温度の影響を調べるために電気乾燥器を使用して、前節において用いたものと同濃度の試料についてその液滴結晶の状態を調べると第8表の如くである。

第8表 温度の影響 $\frac{B}{A} \times 100$ 試料 0.001cc

総蛋白量 g/dl \ 温度 °C	25	30	36	50
0.024	2.14	2.10	2.13	2.01
0.048	3.09	3.04	3.02	2.85
0.096	4.40	4.35	4.37	4.11
0.288	7.88	7.89	7.81	7.62

即ち 30°C 前後においては $\frac{B}{A} \times 100$ に対する温度の影響は少いが、これより更に温度が高くなると $\frac{B}{A} \times 100$ は小となる傾向にある。従つて実験を行うに当つて最も安定している 30°C をもつて液滴結晶作成時の温度とした。

第5節 湿度の影響

液滴結晶作成時には温度条件と共に湿度は重要な因子となるが、その関係を知るために恒温槽においてその湿度と $\frac{B}{A} \times 100$ の関連性を調べた。

第9表は 30°C における湿度と $\frac{B}{A} \times 100$ の関係を記したものである。

第9表 湿度の影響 (30°C) $\frac{B}{A} \times 100$ 試料 0.001cc

総蛋白量 g/dl \ 湿度 %	55	61	68	75
0.024	2.18	2.10	2.24	2.29
0.048	3.05	3.11	3.15	3.20
0.096	4.43	4.38	4.50	4.55
0.288	7.84	7.89	7.92	7.86

即ち湿度 55 乃至 75%, 温度 30°C の条件下において

は湿度の変化に伴う所の $\frac{B}{A} \times 100$ の変動は極めて小である 従つて私は恒温槽の性能も念頭に置いて温度 30°C 湿度 60% の条件下において液滴結晶を作成しこれについて測定を行った。

第6節 保存の影響

試料を保存した後に液滴結晶を作成した場合、 $\frac{B}{A} \times 100$ にいかなる影響が現われるかを観察するために、前述のものと同様のリングル液稀釈人血清を 4°C の氷室に 7 日間保存した後その $\frac{B}{A} \times 100$ を測定した。第 10 表はこれらの関係を記したものである。

第 10 表 保存の影響

$\frac{B}{A} \times 100$ 試料 0.001cc

総蛋白質%	保存前	保存後
0.024	2.11	2.25
0.048	3.05	3.12
0.096	4.38	4.27
0.288	7.82	7.71

即ちこの程度の保存によつてはその影響は殆んど現われない事が分る。

第5章 実験成績

第1節 正常海狸内耳液の総蛋白量

正常海狸の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量を測定すると第 11 表の如くなる。

第 11 表 正常海狸の総蛋白量 (mg/dl.)

No.	試料	内リンパ	外リンパ	髄液	血清
1	20	92	35	4750	
2	45	70	20	4540	
3	25	96	28	4360	
5	20	74	25	4530	
6	30	50	24	3960	
7	40	60	17	4030	
8	18	90	19	3920	
10	12	55	18	3870	
11	19	70	30	4720	
12	35	52	14	3300	
平均	26 ± 3.4	71 ± 5.4	23 ± 2.1	4130 ± 47	

なお、内、外リンパ及び髄液は前述の液滴結晶法により測定したが、対照例として調べた血清は、前述の Robinson 等の方法を使用して測定した。又内リンパの採取可能量は平均 0.0003cc 程度、外リンパでは平均 0.003cc 程度であるので、その総蛋白量測定には、内、外リンパ共に両側耳を使用した。

第 11 表においてその測定成績を見ると、まず内リン

パの総蛋白量は最小値 12mg/dl より最大値 45mg/dl にわたる範囲に分布しており、その平均値は 26 ± 3.4mg/dl である。

外リンパの総蛋白量は最小値 50mg/dl、最大値 96mg/dl でその平均値は 71 ± 5.4mg/dl である。

以上の結果より、正常海狸の内、外リンパの総蛋白量に関しては、個体差が相当ある事を知る。

髄液においては最小値 14mg/dl、最大値 35mg/dl で、この範囲内に分布しており、平均値は 23 ± 2.1mg/dl であり、内、外リンパと同様に個体差が相当ある事を知る。

対照として血清については、最小値 3300mg/dl、最大値 4750mg/dl 平均値 4190 ± 147mg/dl である。

しかしして各個体別に内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量の間の関連性を調べると、その間において一定の傾向を認める。即ち外リンパの総蛋白量は血清のそれより少く、内リンパ及び髄液のそれより多いという事実である。

なお、実験に使用した液量は、内リンパでは 0.0005cc、外リンパ及び髄液では 0.005cc である。

第2節 正常家兎内耳液の総蛋白量

正常家兎の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量も、前節の海狸の場合と同様な方法で測定した。

しかしして内リンパの採取可能量は平均 0.001cc、外リンパでは 0.01cc 程度であるので、内、外リンパ共に原則として一側のみから採取した。

その成績は第 12 表に示す如くである。

即ち内リンパの総蛋白量は最小値 13mg/dl より最大値 52mg/dl にわたる範囲に分布しており、その平均値は 33 ± 3.7mg/dl である。

外リンパの総蛋白量は最小値 76mg/dl、最大値 132mg/dl の間に分布しており、その平均値は 105 ± 6.6mg/dl である。

第 12 表 正常家兎の総蛋白量 (mg/dl.)

No.	試料	内リンパ	外リンパ	髄液	血清
1	52	123	25	4920	
2	21	112	40	6800	
3	38	76	35	6270	
4	43	82	20	5740	
6	40	128	22	6900	
7	32	108	24	5230	
8	13	132	40	6710	
10	28	118	21	4540	
11	24	80	24	5390	
12	41	92	19	6290	
平均	33 ± 3.7	105 ± 6.6	27 ± 2.6	5880 ± 265	

このように海猿の場合と同様に、正常家兎においても、内、外リンパ共にその総蛋白量に関しては個体差が相当なる事を知る。

髄液については最小値 19mg/dl, 最大値 40mg/dl, 平均値は 27 ± 2.6 mg/dl であり、その分布に相当の幅を見る。

血清については最小値 4540mg/dl, 最大値 6900mg/dl, 平均値 5880 ± 265 mg/dl である。

しかして家兎においても海猿の場合と同様な総蛋白量の量的関係を、内、外リンパ、髄液及び血清に認めるが、海猿に比してその総蛋白量はいずれの試料においても大なる傾向にある。

なお実験に用いた液量は、内リンパでは 0.0005cc, 外リンパ及び髄液では 0.005cc である。

第3節 測定方法の相異による測定値の変動

前述の Robinson 等の方法、即ち Biuret 反応を応用した方法により正常海猿及び家兎の外リンパ及び髄液の総蛋白量を測定すると第13表の如くである。

第13表 総蛋白量 (Biuret 法による) (mg/dl)

試料	外リンパ	髄液
海猿 1	68	20
海猿 2	75	26
家兎 1	109	32
家兎 2	97	28

但し外リンパの総蛋白量測定には、海猿 20 匹、家兎では 10 羽を使用した。しかしてその値は海猿では 68 及び 75mg/dl, 家兎では 109 及び 97mg/dl であつて、前節の平均値たる海猿の 71 ± 5.4 mg/dl, 家兎の 105 ± 6.6 mg/dl と殆んど一致している。

第6章 総括及び考按

1) 蛋白質の一新微量定量法

従来行われてきた各種の蛋白質定量法は、夫々の目的、条件に応じて適用を考えるべきであり、例えば内耳液の如き低濃度且つ微量試料の定量には、またこれに最適の微量定量法が適用されなければならないことは当然である。

先ず一般的に微量定量法について考察するに

a) Kjeldahl 法のアンモニア定量の段階においてマイクロ法が使われているが、マイクロ蒸溜装置としては Parnas, Wagner の装置の他、最近では Roth¹²⁸⁾, Kirk⁶⁸⁾ らの装置も用いられる。しかしてこれらの方法では特に海

猿1耳の内リンパの 0.1 γ という超微量の総蛋白量の測定は当然不可能である。

又分解液中のアンモニアを直接ネスラー試薬で比色定量したり^{97) 131)} あるいは Van Slyke-Neil の検圧装置により、アンモニアから得る窒素を測定する方法⁵⁰⁾ その際の過剰の次亜臭素酸塩を沃度滴定で測つてアンモニア量を知る方法¹⁴⁷⁾ 等があるが、これらの方法によつても私の求める超微量蛋白質の定量は不可能であり、アゾメトリーによつても⁶⁵⁾ 測定量域は N として約 15~200 γ , 最適測定量域は N として約 25~60 γ , 更に超微量 Kjeldahl-N-Azotometrie では N として 5 γ が測定可能量である。

又極微量のアンモニアを分解液から定量的に遊離吸収させるには Conway の拡散原理²⁹⁾ を利用するのが最も妥当と見られるが、Kirk 氏¹⁴⁸⁾ はこの原理に基き、独特の容器を使つて 0.5 γ 迄の Kjeldahl 窒素の定量に成功し、Carlsberg 学派の方法¹⁰⁾ は 0.1~1 γ 窒素の定量を行ひ得たと報告しているが、操作がやゝ複雑であるのが難点である。

b) フェノール試薬による方法はいろいろの欠点を持つてゐるが、この方法に Biuret 法の長所を採り入れた改良法として、Lowry, Rosebrough and Farr 氏の改良法⁹²⁾ がある。しかしてこれによると 5 乃至 100 γ の蛋白質を測定し得るというが、内リンパの測定はこの方法によつても不可能である。

c) その他微量蛋白質の定量には色々工夫がなされておゐり、様々な試みがあるが、内耳液の蛋白質が極微量であるためにその方法を内耳液蛋白質の定量には用いられない。

即ち、a), b), c) いずれの方法も内耳液の蛋白質定量には使用できないのである。こゝにおいて内耳液の蛋白質を定量するためには、内耳液、特に内リンパの 0.1 γ という極微量の蛋白質を測定し得る方法を考案しなければならず、私は液滴結晶像によりこれを満足する結果を得たのである。

液滴結晶像による測定の理論については既述した所であるが、その理論式より明らかな如く液滴結晶の周辺無構造輪状部面積とその液滴の総蛋白量は平行関係を示すが、それと液滴結晶全面積との比は液滴の厚さ d を一定になすように操作すれば、総蛋白量 (g/dl) と $\frac{B}{A}$ の関係は同一の関係グラフで現わし得る事になる。しかして実際に液滴量を 0.0005cc, 0.001cc, 0.005cc とし $\frac{B}{A}$

を測定すると上述の事実を見る。また $\frac{B}{A}$ と総蛋白量の関係を対数方眼紙上に現わすと直線になるので、實際上 $\frac{B}{A}$ を測定しそれより総蛋白量を求める場合に有利である。なお $\frac{B}{A}$ は数字が小となるので、整理の必要上 $\frac{B}{A} \times 100$ として記載した。また $\frac{R_1}{R_2}$ は総蛋白量が内耳液の如く小である場合は近似的に 1 であるが、総蛋白量が大きくなるに従つて 1 より小となる。しかし $\frac{B}{A}$ に与える影響は 1 に比べると非常に小さいものである事は $\frac{R_1}{R_2}$ との数値の変動の状態を比較する事により明らかであるが、総蛋白量が小なる程測定精度の良好な事は容易に理解し得る。

液滴結晶像の周辺無構造輪状部の確認は、結晶像に何等の操作も加えずに顕微鏡下に測定する方法と B.P.B. 染色液で染色する方法、更に試料に一定量の蒸溜水を加えると輪状部は鮮明となるが、内耳液においては B.P.B. 染色法を用いた。即ちこの方法によると輪状部の内側縁の確認が容易である。

次に輪状部面積並びに全液滴結晶面積の測定は前述の引伸法によつたが、この方法は顕微鏡測微計による方法と共に臨床上にも応用し得る方法であると考える。

動物の種類が異なる場合の $\frac{B}{A}$ については、人、海狸及び家兎血清の総蛋白量と $\frac{B}{A}$ の関係グラフは殆んど一致する傾向を示し、蛋白質定量における本法適用の普遍性を意味している。

扱てこの液滴結晶像による超微量蛋白質定量法が実用的に可能であるためには、先ずその再現性が良好でなければならない。しかしてその再現性は極めて良好であり、後に述べる各種実験に何らの障害とならない事を知つた。

次に共存溶質の無機物質の影響は前述の理論式より考へても小さい筈であり、実際にその影響が殆んど認められない事を知つた。教室の荻原⁴¹⁾ (1960) による内耳液の無機物質の変動範囲と考へ併せても本法により内耳液の総蛋白量測定の妥当性を示すものと考える。

次に試料の pH が測定値に及ぼす影響は殆んど認められず、内耳液及び髄液の pH についての教室の中島⁴⁰⁾ (1954) の報告による変動範囲よりしても、pH の変

動による影響は殆んど無視し得る事を知つた。

又、温度並びに湿度の関係よりして、液滴結晶作成には温度 30°C、湿度 60% の恒温槽を使用し、良好な結果を得ている。

内耳液の研究の場合、採取試料を直ちに測定するのを常としているが、試料を保存した場合の影響を見るために、リンゲル稀釈人血清を 7 日間、4°C の氷室に保存した場合について検索したが、その影響は殆んど現われていない。

このように液滴結晶像による蛋白質定量法は、前述の理論的裏付けと共に各吟味の結果よりして、適当なる条件を定める事により内耳液の如き超微量試料の定量に好適である事を証明し得た。

2) 内耳液の総蛋白量

正常海狸の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量は、内リンパ $26 \pm 3.4 \text{ mg/dl}$ 、外リンパ $71 \pm 5.4 \text{ mg/dl}$ 、髄液 $23 \pm 2.1 \text{ mg/dl}$ 、血清 $4190 \pm 147 \text{ mg/dl}$ であり、正常家兎については、内リンパ $33 \pm 37 \text{ mg/dl}$ 、外リンパ $105 \pm 6.6 \text{ mg/dl}$ 、髄液 $27 \pm 2.6 \text{ mg/dl}$ 、血清 $5880 \pm 265 \text{ mg/dl}$ である。

即ち、外リンパの総蛋白量は血清のそれより少く、内リンパ及び髄液のそれより多いという事実が、海狸と家兎を通じて共通に認められるが、家兎は海狸に比して、各試料共にその総蛋白量が大きい傾向にある。

しかし乍らこれらの標準誤差からも明らかなように、内、外リンパ、髄液並びに血清の総蛋白量にはかなりの個体差が認められ、変動の多い事を知つた。

しかして内耳液の総蛋白量に関する従来の業績を見るに、いずれも試料を Pool して測定を行つており、私の如く個体別に測定を行つた報告には未だ接しない。

まず海江田⁷¹⁾ (1928) はサメの外リンパの総窒素量を測定しているが、TH Vilstrup and C. E. Jensen¹⁵⁶⁾ (1954) は *Acanthias vulgaris* の内、外リンパの総蛋白量測定に Kjeldahl 法並びに Dumas 法を採用した。更に C.A. Smith, O.H. Lowry and M.L. Wu¹⁵⁶⁾ (1954) は Lowry らの Folin-Phenol Reagent を応用した分光々度計による定量法⁹²⁾ により測定を行い、海狸の内、外リンパ、髄液は共にその総蛋白量は少いが、外リンパは他の 2 者の約 2 倍の濃度を有すると報告している。又 L. Citron, D. Exley and C.S. Hallpike²³⁾ (1956) は比色法によつて測定しているが、ベックマン分光々度計に特殊な capillary cuvette を採用して、海狸及び猫の内、外リンパ及び髄液の総蛋白量を報告している。E.

Antonini, V. Casorati and S. Crito⁴¹⁾ (1957) は馬の外リンパ及び髄液の総蛋白量測定に、Biuret 反応を応用して発色した試料を分光光度計によつて定量し、外リンパは血清より少いが髄液より多い総蛋白量を有すると述べている。最近、L.G. Chevance, A. Galli and Mme. Jeanmaire²¹⁾ (1959) は、耳疾患あるいは脳中枢に関係のない疾患が死亡した患者から採取した外リンパについて、試料を Lyophilization して更に稀釈する時の操作により蛋白質量の凡の推定を行い、外リンパは髄液の4乃至5倍も稀いのではないかと述べている。更に Sigurd Rauch¹²⁰⁾ (1960) は、内リンパの蛋白質は非常に微量であり、外リンパのそれは髄液のその4乃至6倍であると述べている。

次にこれら内、外リンパの総蛋白量についての成績を表記すると第14表の如くである。

これらの報告に共通して見られる点は、試料はいずれも多数個体のものを Pool したものであり、外リンパは内リンパ及び髄液よりも総蛋白量は大であるが血清より小であるという傾向のある事である。但し Chevance et al.²¹⁾ の人についての成績が他のそれに比して傾向を異にする点は特異的である。

第14表 各種動物の総蛋白量

動物 試料	内リンパ	外リンパ	髄液	発表者
サメ <i>Acipenser vulgaris</i>	1.8 %	125.49 % (血清量) 1.2 %		堀江田 (1928)
海鰻	1.5 %	50 %	2.1 %	Vistrup et al. (1954)
	2.5	75	2.0	Smith et al. ()
	2.6	71	2.3	Citron et al. (1956)
家兎	3.3	105	2.7	Itô (1960)
ネコ	11.8	268	3.1	Ledoux (1950)
		142	2.5	Citron et al. (1956)
ウマ		291.7	118.2	Antonini et al. (1957)
ヒツツメ (ヒツツメ)		27	13	Walther et al. (1950)
ヒツツメ		髄液の $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$		Chevance et al. (1959)

さて外リンパの総蛋白量が髄液のそれよりも大であるという事実は、これら両液の交通が蝸牛小管を経て行われ、外リンパ中に高分子の蛋白質を留め、より小なる分子の電解質の自由なる交通を許すという Waltner¹⁵⁸⁾ (1948) の云うが如き Barrier membrane が存在するという説に支持を与えるものであるが、更に当教室の外リンパの二起源説の裏付けをもなす事実であると考えられ、外リンパの起源を尋ねる上に興味ある成績である。即ち外リンパと髄液は少なくとも総蛋白量に関する限り

同一物でないという見解に達し、この点内耳液に関する当教室の一連の研究業績とよく一致するものである。

所で従来使用されている蛋白質定量法の中で、Biuret 法を選んでこの方法により正常海鰻及び家兎の外リンパ並びに髄液の総蛋白量を測定すると、液滴結晶法による測定値と殆んど一致する数値を得た。しかしてこの場合、【一つの測定値を出すに際して海鰻では20匹、家兎では10羽を必要とした。】従つて各動物の個体差は当然分らないわけである。

3) 総蛋白量より見た内耳液と血液、髄液との関連性

内耳液はどこから生じるのか、又内、外リンパは容易に交流しているものか等の問題は内耳液研究の根本課題の一つでありながら、まだ殆んど分らず多数の説があるが、私は内耳液の総蛋白量の観点よりこれらの問題を考えてみたい。

さて従来内耳液生成生理の実験に用いられてきた方法は主として色素、薬物によるものであり、顆粒の大きさや透過性、あるいは比重の点、更には薬物としての作用を考える時、真の生理的追及としては幾多の難点を含んでいる事は確実であり、これを解消する合理的方法としてのアイソトープによる tracer 実験によつてかなり正確な知見が得られるようになった。即ちこれについては Rüedi¹²⁰⁾ (1951), Portmann¹²⁴⁾ (1954) らの研究があるが、そのうち特に教室の坪井¹⁵⁸⁾ (1960) はアイソトープを使用して内耳液生成生理を追及し、内リンパは血行性に蝸牛管壁より速かに分泌されると考え、その内リンパ生成部位については主として血管条を考えているが、卵形囊の如き膜迷路感覚上皮部も内リンパの生成に関与すると推論している。しかして外リンパの生成については内リンパの生成とは別途の起源を考え、Waltner¹⁵⁸⁾ (1948) の言うが如き Barrier membrane が存在するとは断定していないが、外リンパの一部は蝸牛小管を介して髄液との交流による事を考えている。しかし正常時においては無制限自由な交流は考えられず、又外リンパの一部は外リンパ腔壁より比較的徐々に生成される事を観察し、外リンパの二起源説に賛成している。この坪井の業績は後述する内、外リンパの総蛋白量の諸問題に密接な関連を有するものであるが、後藤、三宅、松崎ら⁴²⁾ (1957) は上述の外リンパの二起源説を唱え、液滴結晶像による研究で、外リンパは髄液と外リンパ腔壁より生成される蛋白質に富んだ血清に近い液体との混合液であろうと考えているが、同じく教室の芦原¹¹⁾ (1960) は、

Na, K の フレームフォトメーターによる定量からしてかゝる事実を推定している。

所で前述の如く、多リンパの総蛋白量は血清より小さく、髄液より大であるので、総蛋白量の立場から考えた場合、(1) 外リンパは髄液と外リンパ腔壁血管より生成される血清に類似したもの混合物であろうとする外リンパの二起源説に対し有力な一つの裏付けとなるものであるが、(2) 更に蝸牛小管における Barrier membrane の存在を想定せしむるものである。即ちこの membrane は、外リンパと髄液の交通が蝸牛小管を経て行われるとする時、外リンパ中に高分子の蛋白質を留め、より小なる分子の電解質の自由なる交通を許すという機能を有するものと考ええる。即ちこの (1), (2) の機序により、外リンパと髄液間の蛋白質の濃度差が保たれているのであろう。

扱て、前述の坪井の実験、更には後藤、三宅、松崎らの業績よりして、内リンパに対する血管条、外リンパに対する外リンパ腔壁血管の占める役割の大なる事が理解される。而して毛細管壁は普通一層の内皮細胞から成り、電解質を自由に透過させ、血液蛋白質も透過しようという事は既に疑問の余地がない。その血液蛋白質の毛細血管壁よりの透過は、管壁の状態及び毛細血管内々圧によるものであり、且つその透過性は各部位で異なるという。この事は、内、外リンパの総蛋白量が、同じく血液由来の蛋白質を含む身体各部のリンパ液の総蛋白量に比し極めて小さい事の説明の一部になるかもしれない。

又血液蛋白質の毛細血管壁よりの透過は、同一部位でも種々の生理的条件により異なるものであるが、この事は後述する内耳液の病態の理解に必要である。

毛細血管は蛋白質を吸収しないが、これは毛細血管壁に蛋白質を透過させるだけで吸収しないというような一方向への透過性があるという事ではなく、単に水力学的条件に左右されて吸収されないものであり、その毛細血管内内圧の関係よりして毛細血管壁から血中に吸収される因子がない事に由る。従つて内、外リンパの蛋白質はその部の毛細血管から再吸収される事はないと考えられ、内、外リンパの再吸収が行われるとすると、その残る吸収路の一つとして毛細リンパ管によるものが考えられる。この毛細リンパ管よりの吸収は通常徐々に行われるが、これは毛細リンパ管内に内圧が無く、その壁は極めて透過し易いからである。かゝる意味からして、内耳毛

細リンパ管が、内、外リンパの蛋白質代謝に対して何らかの形で参与している可能性の存在が想定せられる。

又髄液の総蛋白量が小である事は、脳の毛細血管より透過された少量の蛋白質が、大量に生成され且つ速やかに循環している髄液のために稀釈された結果であるとも想定されるが、この意味においても、内、外リンパはその生成、循環の有機的直関の上においてその蛋白質の恒常化に努め、内耳蛋白質代謝の普遍性維持を図っているものと考えられる。

しかしいづれにしても、内、外リンパとその間壁部組織とが互いに調整しつゝ、細密にある範囲内に平衡を維持する如く機能を営んでいる事は確かであろう。

第7章 結 語

1) 内耳液、特に内リンパの如き低濃度且つ微量試料の総蛋白量測定のために、液滴結晶像を応用した超微量蛋白質定量法を考案した。本法では 0.1 μ l の総蛋白量を測定し得る。

2) この測定法についてまず理論的解析をなし、本法による蛋白質定量の妥当性を理論的に証明した後、再現性を検討し、更に無機物質、pH、温度、湿度、保存による影響の程度を検した結果から、本測定法は内耳液の如き超微量試料の測定に特に適している事を認めた。

3) この方法によつて得た内、外リンパ及び髄液、更に Biuret 法による血清の総蛋白量は、海猿ではそれぞれ、 26 ± 3.4 , 71 ± 5.4 , 23 ± 2.1 , 4190 ± 147 mg/dl、家兎ではそれぞれ 33 ± 3.7 , 105 ± 6.6 , 27 ± 2.6 , 5530 ± 265 mg/dl である。

即ち正常海猿においては外リンパの総蛋白量は血清より小さく、内リンパ及び髄液より大であり、外リンパの総蛋白量は内リンパ、髄液の数倍もある。又家兎においてもこれと同傾向であるが、内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量は共に海猿のそれより大である傾向にある。

4) この総蛋白量の相異から、外リンパと髄液が同一物でない事は明らかであり、また外リンパの総蛋白量が髄液のその数倍を占めるという事から、両液を隔てる蝸牛小管は高分子である蛋白質の通過を許さないが、より小なる分子である電解質の自由な通過を許す事が考えられ、Barrier membrane の如きものゝ存在を推定し、更に三宅、松崎等の外リンパの二起源説の一つの裏付けともなる。

第2編 内耳液の蛋白質分劃測定に関する研究

第1章 緒 言

Tiselius の電気泳動法は蛋白質の研究には極めて有力な方法ではあるが、試料を比較的多量に必要とするので、内耳液の如き超微量の試料には用い得ない憾みがある。他方 Paperchromatography は微量試料について実施できる特徴を有するが、蛋白質の如き高分子物質に対しては未解決の問題が多くて使用できない。

そこで Paperchromatography に電気泳動を導入したのが濾紙電気泳動である。この濾紙電気泳動はまずアミノ酸について試みられ(Wieland¹⁶⁾, Haugard⁴⁸⁾, 1948) その後研究が進められて蛋白質その他の分析に応用されるに至ったが、本法は微量の試料で分析を行い得るので、内耳液の如き超微量試料の研究には極めて有力な利用価値の高い手段と考えられる。

扱て内耳液の蛋白質については、Th. Vilstrup, G. Vilstrup, V.Kornerup and C.E. Jensen¹⁶⁷⁾ (1954) は、Elasmobranch の内、外リンパの蛋白質分劃の測定を行い、また L.G. Chevance, A. Galli and Mme. Jeanmaire²²⁾ (1956) は猫の外リンパ、髄液及び血清について、E.Antonini, V.Casorati and S. Crifó⁴⁾ (1957) は馬の外リンパ、髄液及び血清について同様の研究を行っている。又同じく蛋白質分劃について免疫学的分劃法によつて検索した例としては、L.G. Chevance, A. Galli and Mme Jeanmaire²²⁾ (1959) は、耳疾患あるいは脳中枢に関係のない疾患で死亡した患者から外リンパを採取し、それについて検索を行っている。

扱て私は、第1編における内耳液の総蛋白量検索に引きつづき、本編においてはその蛋白質分劃を中心として内耳液の蛋白質代謝を追究せんがために、海狸及び家兎についてその内、外リンパ、髄液及び血清の蛋白質分劃を濾紙電気泳動法によつて測定した。しかして更に複合蛋白質たる糖及びリポ蛋白質の分劃測定を行つて、エネルギー代謝の面からも内耳代謝の様相をうかがわんとした。

又一方この濾紙電気泳動を行うに当つて、その前提となる低蛋白濃度体液の濃縮法についても、多くの研究者により夫々独自の方法が考案されてきた。即ち髄液を中心にして今迄に行われた濃縮法としては、凍結乾燥法、限外濾過法、低温アセトン沈澱法及び透析法等があり、夫々の特徴を有している。

しかし乍らこれ等を内耳液研究に応用せんとする場

合、その微量なるためにこれ等の方法をそのままに利用する事は得策ではないので、私は先づ Mies の考案した限外濾過法¹⁶⁾ を改良して微量試料の濃縮を可能ならしめる方法を考案し、あるいは当教室の結晶像の研究に着眼して、結晶の周囲蛋白輪から蛋白質を採取する事により蛋白質の濃縮に良好な結果を得たのでこれらについて述べる。

第2章 実験材料

第1節 実験動物

動物実験材料としては第1編に述べたと同様のものを使用した。

第2節 被検液採取法

被検液採取法としては第1編に述べたと同様の方法を使用した。

第3章 実験方法

一 特に濃縮についての1新方法 一

第1節 濾紙電気泳動法

第1項 泳動装置

1) 泳動箱

水平式にして緩衝液槽と電極槽を別にし、約 10cm の炭素棒を電極として電極槽中の塩化カリ液の中に入れ、緩衝液槽との間を塩化カリ寒天橋で連絡せる装置を用いている。

2) 整流器

最大電圧 1000volt, 最大電流 30mA の定電圧定電流兼用の真空管整流器を使用した。

第2項 泳動条件

濾紙は東洋濾紙 No.51A を使用し、40×2cm のもの3枚を同時に泳動した。試料の量は 0.01 乃至 0.001cc を濾紙の原点に線状に塗布した。緩衝液は Veronal 緩衝液 (Veronal-Na 10.3g Veronal 1.84g Aq. dest にて 1ℓ にする。pH8.6, $\mu=0.05$) を使用し、電流は濾紙幅 1cm 当り 0.3mA に定め、Albumin が原点より 4 乃至 7cm 泳動する如くした。泳動終了後は濾紙を乾燥器 (100°C) 中で加熱乾燥する。

第3項 測定条件

1) 蛋白質の確認法 (染色法)

a. 蛋白質

蛋白質の染色は Amidoschwarz 10B 染色液 (メタノール 9 容, 氷醋酸 1 容, Amidoschwarz 10B 飽和) によつたが、洗滌はメタノール醋酸溶液を使用した。

b. リポ蛋白質

Sudan Black B 溶液（60% エタノールに Sudan Black B を飽和にとかし、沸騰させ冷却後濾過、濾液を 60% エタノールで 2 倍に稀釈したもの）中に濾紙を 3 時間浸して染色し、50% エタノールで洗滌、その後常温に放置して乾燥した。

c. 糖蛋白質

小林らの報告せる方法に従った。即ち泳動濾紙片をエタノールに 5 分浸し、0.5% 過沃度酸水溶液に 5 分、その後 30 分以上蒸留水でよく洗い、Schiff 試薬に 15 分、その後亜硫酸洗液にて数分乃至数十分宛 3 回洗い、そのまゝ風乾する。

蛋白質、リポ並びに糖蛋白質を染色せる濾紙片は乾燥した後、加熱溶融したパラフィン中を通して半透明となした。

2) 測定

田中式濾紙光電光度計を用いて、上記の溶融パラフィン中を通して半透明となした所の蛋白質染色濾紙について、その透過光を測定する事により定量を行つた。

なお Amidoschwarz 10 B 染色濾紙片には 590m μ , Sudan Black B 染色のものにも 590m μ , Schiff 試薬染色のものには 550m μ のフィルターを使用した。

第2節 蛋白質濃縮法

内耳液の如き超微量低濃度試料の濃縮法として次の如き方法を用いた。

第1項 Mies の方法の変法（減圧限外濾過法）

Mies の報告せる装置⁹⁶⁾の限外濾過部の Micro 化を行つた。即ち試料を入れたガラス毛细管の先端に、盲端に終るように作成したコロジオンチューブを装着して、ガラス毛细管とはゴム輪で固く密着させ、空気並びに試料の漏出が全く無いようにする。かくしてこれを第7図の如くリングル液中に浸してセットし、水流ポンプにて減圧吸引するのである。

第 7 図

第2項 液滴結晶による方法

液滴乾燥結晶像の周辺無構造輪状部が蛋白質である事は前編において詳述した所であるが、私は拡大鏡下にその輪状部から蛋白質を採取して一種の濃縮法とした。なお内リンパの如き超微量試料では、前法によるよりも本法で行つた方が操作が容易で且つ確実である。従つて外リンパには主として Mies の変法を、内リンパには液滴結晶による方法を行つた。

第3節 濃縮法の検討

濃縮に際して蛋白質の変性が起るか否かの問題であり、私は前述2つの濃縮法についてこの点を検討した。即ち人血清をそのまゝと同血清を稀釈後濃縮を行つたものとの値を比較して濃縮操作の影響を調べた。

第1項 Mies の方法の変法の影響

第15, 16, 17 表は Mies の方法の変法によつて濃縮操作を行つた場合の蛋白質、リポ蛋白質、糖蛋白質の測定値である。

なお各表においていずれも上段は血清をそのまゝ、下段は同一血清を蒸留水で記載数値に迄稀釈した後 Mies の方法の変法で濃縮して泳動した値である。

第15表 Mies の方法の変法の影響（蛋白質）

蛋白質濃度	分割%	A	α_1	α_2	β	$\gamma-G$
1	6.5 8/61	53.9	10.3	9.6	13.0	13.2
	0.25	51.2	13.2	6.8	15.1	13.7
2	4.3	56.2	6.5	10.3	11.8	15.2
	0.2	53.8	8.8	11.1	13.2	13.1
3	5.2	54.3	14.5	8.0	10.2	13.0
	0.1	56.1	11.2	6.8	13.5	12.4
4	5.9	56.5	9.3	7.3	12.8	14.1
	0.05	53.0	11.7	5.1	14.2	16.0

第16表 Mies の方法の変法の影響（リポ蛋白質）

蛋白質濃度	分割%	A	α	β	$\gamma-G$
1	6.5 8/61	21.5	13.9	52.8	11.8
	0.25	29.3	6.1	40.3	24.3
2	4.3	13.5	10.2	65.3	11.0
	0.2	6.1	21.3	50.2	22.4
3	5.2	18.2	19.3	40.8	21.7
	0.1	5.5	21.2	50.2	23.1
4	5.9	10.3	9.6	60.2	19.9
	0.05	20.8	2.5	50.5	26.2

第17表 Mies の方法の変法の影響（糖蛋白質）

蛋白質濃度	分割%	A	α	β	$\gamma-G$
1	6.5 8/61	14.3	28.3	25.2	32.2
	0.25	19.9	33.3	21.5	25.3
2	4.3	19.2	22.8	30.3	27.7
	0.2	27.3	15.2	35.2	22.3
3	5.2	9.3	19.3	32.5	38.9
	0.1	16.7	27.2	25.8	30.3
4	5.9	21.2	23.8	21.9	33.1
	0.05	19.0	20.2	32.3	28.5

第15表から分るように、本濃縮操作による蛋白質の変化は僅かではあるが、第16, 17表に示すリポ並びに糖蛋白質は比較的濃縮操作による影響を受け易い事を知る。しかしてリポ蛋白質に比して糖蛋白質の方がその変化が比較的少い事が分る。

第2項 液滴結晶による方法の影響

第18, 19, 20表は、液滴結晶による濃縮操作の蛋白質、リポ蛋白質、糖蛋白質に及ぼす影響を示している。

なお上段は血清をそのまま、下段は同一血清を蒸溜水で記載数値に迄希釈して後液滴結晶による濃縮操作を行って泳動した値である。

第18表から分るように、本濃縮操作による蛋白質の変化は僅かではあるが、第19, 20表に示すリポ並びに糖蛋白質は濃縮操作による影響を比較的受け易く、且つリポ蛋白質に比して糖蛋白質の方がその変化が比較的少い事は前項に述べた所の Mies の方法の変法による成績と同様である。

第18表 液滴結晶による方法の影響（蛋白質）

蛋白質濃度	分割%	A	α_1	α_2	β	$\gamma-G$
1	6.5 8/101	54.2	11.3	8.5	13.1	12.9
	0.25	53.7	12.7	7.5	14.8	11.3
2	4.3	55.5	7.3	9.3	12.8	15.1
	0.2	56.7	8.9	8.1	11.5	14.8
3	5.2	53.5	13.2	9.2	9.1	15.0
	0.1	52.1	11.3	11.5	10.8	14.3
4	5.9	55.8	8.3	8.8	13.8	13.3
	0.05	53.9	9.9	9.5	10.9	15.8

第19表 液滴結晶による方法の影響（リポ蛋白質）

蛋白質濃度	分割%	A	α	β	$\gamma-G$
1	6.5 8/101	23.2	12.1	54.3	10.4
	0.25	21.3	10.2	58.5	10.0
2	4.3	12.1	8.1	69.0	10.8
	0.2	10.2	5.3	72.5	12.0
3	5.2	15.9	21.3	43.9	18.9
	0.1	10.2	12.9	52.3	24.6
4	5.9	12.3	7.2	65.2	15.3
	0.05	10.1	15.2	59.3	15.4

第20表 液滴結晶による方法の影響（糖蛋白質）

蛋白質濃度	分割%	A	α	β	$\gamma-G$
1	6.5 8/101	11.5	24.9	32.3	31.3
	0.25	14.3	20.1	35.1	30.5
2	4.3	20.5	18.4	29.3	31.8
	0.2	22.2	20.5	24.3	33.0
3	5.2	12.3	21.3	31.2	35.2
	0.1	11.5	17.3	34.3	36.9
4	5.9	19.2	25.3	18.2	37.3
	0.05	23.8	21.5	25.3	29.4

しかして前項の成績と考え併せると、液滴結晶による方法の方が Mies の方法の変化より試料に与える変化が

比較的小であるので、液滴結晶による方法はこの意味において Mies の方法の変法に比して少しく優れていると考えられる。

第4章 実験成績

第1節 蛋白質分割

第1項 正常海狸の蛋白質分割

正常海狸についての内、外リンパ、髄液及び血清の成績を示すと、第21, 22, 23, 24表の如くである。

第21表 正常海狸内リンパの蛋白質分割

群	分割%	A/G	α	β	$\gamma-G$	A/G
3	60.1	7.3	14.3	18.3	1.51	
4	57.8	14.9	5.2	22.1	1.37	
5	56.9	5.9	12.1	25.1	1.32	
平均	58.3	9.4	10.5	21.8	1.40	

第22表 正常海狸外リンパの蛋白質分割

群	分割%	A/G	α	β	$\gamma-G$	A/G
6	57.3	11.6	12.8	18.3	1.34	
7	52.1	13.2	18.3	16.4	1.09	
8	58.3	12.3	17.1	12.3	1.40	
9	56.8	9.3	20.1	13.8	1.31	
10	52.2	15.1	15.6	17.1	1.09	
平均	55.3	12.3	16.8	15.6	1.24	

第23表 正常海狸髄液の蛋白質分割

群	分割%	A/L	α	B	$\gamma-G$	A/G
11		52.2	10.2	22.3	15.3	1.09
12		58.1	16.3	13.4	12.2	1.38
13		55.8	11.9	18.5	13.8	1.26
14		56.1	13.3	20.5	10.1	1.28
15		50.2	18.1	16.6	15.1	1.01
平均		54.4	14.0	18.3	13.3	1.19

第24表 正常海狸血清の蛋白質分割

No.	分割%	A/L	α_1	α_2	β	$\gamma-G$	A/G
68		47.2	8.2	7.5	18.2	18.9	0.89
69		50.3	6.2	11.3	16.0	16.2	1.01
70		42.9	11.8	12.2	11.8	21.3	0.75
71		51.2	12.2	5.5	15.6	15.5	1.05
72		49.8	7.8	8.8	9.1	24.5	0.99
平均		48.3	9.2	9.1	14.1	19.3	0.93

しかしてその測定には、内リンパについては各群45匹、外リンパ及び髄液についてはそれぞれ各群20匹の海狸を使用した。

即ち内リンパでは、A1, α , β , γ -G1の各分割を測定し得てその A/G の平均値は1.40である。

外リンパにおいても同様に、A1, α , β , γ -G1の各分割を測定し得て A/G は最小値1.09, 最大値1.40の間に分布し、平均値は1.24である。

髄液においても Al , α , β , γ -G1 の各分劃を測定し得て、 A/G は最小値 1.01, 最大値 1.38 で、その平均値は 1.19 である。

血清においては、 Al , α_1 , α_2 , β , γ -G1 の各分劃を測定し得て、 A/G は、その最小値は 0.89, 最大値は 1.05, 平均値 0.93 である。

第 21, 22, 23, 24 表を総括すると第 25 表の如くである。

なお総蛋白量は第 1 編に述べた所の数値であり、この数値より各分劃量を算定して括弧内に記した。

第 25 表 正常海狸の蛋白質

試料	分劃%	Al	α	β	γ -G
肉リンパ	26	58.3% (15.2)	9.4% (2.4)	10.5% (2.7)	21.8% (5.7)
外リンパ	71	55.3% (39.3)	12.3% (8.7)	16.8% (11.9)	15.6% (11.1)
髄液	23	54.4% (12.5)	14.0% (3.2)	18.3% (4.2)	13.3% (3.1)

試料	分劃%	Al	α_1	α_2	β	γ -G
血清	41	48.3% (2023.8)	9.2% (385.5)	9.1% (381.3)	14.1% (590.8)	19.3% (808.6)

() 内 mg/dl

第 2 項 正常家兎の蛋白質分劃

正常家兎についての内、外リンパ、髄液及び血清の成績を示すと、第 26, 27, 28, 29 表の如くである。

しかしてその測定には、内リンパについては各群 25 羽、外リンパについては各群 10 羽、髄液については各群 5 羽の家兎を使用した。

第 26 表 正常家兎内リンパの蛋白質分劃

群	分劃%	Al	α	β	$\gamma-G$	A/G
3	61.7	10.3	13.5	14.5	1.61	
4	64.3	7.2	21.3	7.2	1.80	
5	57.2	15.4	10.2	17.2	1.34	
平均	61.1	11.0	15.0	12.9	1.57	

第 27 表 正常家兎外リンパの蛋白質分劃

群	分劃%	A_2	α	β	γ	A/G
6		58.3	9.5	16.3	15.9	1.40
7		56.5	14.2	13.7	15.6	1.30
8		59.7	8.6	19.5	12.2	1.48
9		57.6	15.3	20.7	6.4	1.36
10		50.1	18.7	10.9	20.3	1.00
平均		56.4	13.3	16.2	14.1	1.29

第 28 表 正常家兎髄液の蛋白質分劃

群	分割%	AL	α	β	γ -G	A/G
11		59.8	12.7	17.2	10.3	1.49
12		50.2	16.2	13.4	20.2	1.01
13		60.7	9.5	21.3	8.5	1.54
14		57.1	11.4	14.8	16.7	1.33
15		59.3	13.3	13.5	13.9	1.46
平均		57.4	12.6	16.0	14.0	1.35

第 29 表 正常家兎血清の蛋白質分劃

No	分劃%	A_2	α_1	α_2	β	γ -G	A/G
40		54.3	10.1	9.2	12.1	14.3	1.19
41		56.7	14.9	5.4	11.2	11.8	1.31
42		49.3	8.7	10.8	14.1	19.1	0.97
43		55.2	10.3	12.3	12.8	9.4	1.23
44		48.9	12.7	11.3	13.9	13.2	0.96
平均		52.9	11.3	9.8	12.8	13.2	1.12

即ち、内リンパでは、 Al , α , β , γ -G1 の各分劃を測定し得て、その A/G の最小値は 1.34, 最大値は 1.80 にし、平均値は 1.57 である。

外リンパでは、同様にして Al , α , β , γ -G1 の各分劃を測定し得て、その A/G の最小値は 1.00, 最大値は 1.48, 平均値は 1.29 である。

髄液においても同様にして Al , α , β , γ -G1 の各分劃を測定し得て、その A/G の最小値は 1.01, 最大値は 1.54, 平均値は 1.35 である。

血清については、 Al , α_1 , α_2 , β , γ -G1 の各分劃を測定し得て、その A/G の最小値は 0.97, 最大値は 1.31, 平均値は 1.12 である。

第 26, 27, 28, 29 表を総括すると第 30 表の如くである。

なお総蛋白量は第 1 編において述べた所の数値であり、この数値より各分劃量を算定して括弧内に記した。

第 30 表 正常家兎の蛋白質

試料	分劃%	Al	α	β	γ -G
肉リンパ	33	61.1% (20.2)	11.0% (3.6)	15.0% (5.0)	12.9% (4.2)
外リンパ	105	56.4% (39.2)	13.3% (14.0)	16.2% (17.0)	14.1% (14.8)
髄液	27	57.4% (15.5)	12.6% (3.4)	16.0% (4.3)	14.0% (3.8)

試料	分劃%	Al	α_1	α_2	β	γ -G
血清	5880	52.9% (3112.5)	11.3% (664.0)	9.8% (576.2)	12.8% (752.6)	13.2% (776.3)

() 内 mg/dl

第 2 節 リポ蛋白質

正常家兎についての内、外リンパ、髄液及び血清の成績を示すと第 31, 32, 33, 34 表の如くである。

しかしてその測定には、各試料について各群共前節第 2 項において述べたものと同数の家兎を使用した。

第31表 正常家兎内リンパのリボ蛋白質

群	分割	AL	α	β	γ -G
16		—	+	+	—
17		—	±	+	—
18		—	+	—	—

第32表 正常家兎外リンパのリボ蛋白質

群	分割	AL	α	β	γ -G
19		—	++	—	—
20		+	++	+	±
21		—	++	+	+

第33表 正常家兎髄液のリボ蛋白質

群	分割	AL	α	β	γ -G
22		—	++	+	+
23		+	++	+	+
24		—	+	—	—
25		±	++	+	++

第34表 正常家兎血清のリボ蛋白質

No.	分割	AL	α	β	γ -G
100		18.9	30.4	18.8	31.9
101		16.2	33.8	15.3	34.7
102		9.5	34.3	26.5	29.7
103		13.1	36.5	20.3	30.1
104		11.2	28.1	29.2	31.5
平均		13.8	32.6	22.0	31.6

なお、内、外リンパ及び髄液については、濾紙上に出現したその色調の濃淡によりその程度++（明瞭）、+（比較的明瞭）、±（痕跡）、—（不認）の四段階に分けて表示した。

即ち、内リンパにおいては α 、 β -G1の位置にて Sudan Black B に陽性を示し、外リンパでは特に α -G1の位置に、又髄液においても α -G1の位置に著明であるが、血清においては、 α 、 β 、 γ -G1のすべてに亘って平均して分布している。

第3節 糖蛋白質

正常家兎についての内、外リンパ、髄液及び血清の成績を示すと第35、36、37、38表の如くである。

しかしてその測定には、各試料について各群共前節において述べたものと同数の家兎を使用した。

なお、++、+、±、—の記載の基準は前節において述べたと同様である。

第35表 正常家兎内リンパの糖蛋白質

群	分割	AL	α	β	γ -G
26		—	+	+	+
27		—	+	+	—
28		—	+	+	—

第36表 正常家兎外リンパの糖蛋白質

群	分割	AL	α	β	γ -G
29		+	++	++	++
30		—	+	+	+
31		+	++	+	++

第37表 正常家兎髄液の糖蛋白質

群	分割	AL	α	β	γ -G
32		—	++	+	+
33		—	+	++	+
34		+	++	++	+
35		+	++	+	—

第38表 正常家兎血清の糖蛋白質

No.	分割	AL	α	β	γ -G
160		14.6	30.6	26.7	28.1
161		11.2	36.5	34.2	18.1
162		15.6	45.8	27.1	11.5
163		9.8	30.2	39.5	20.5
164		15.9	37.7	25.3	21.1
平均		13.5	36.2	30.6	19.7

即ち、内リンパにおいては、1例において α 、 β 、 γ -G1の位置に、他の2例において α 、 β -G1の位置にて Schiff 試薬に陽性を示している。又外リンパにおいては α 、 β 、 γ -G1の位置に、髄液においては α 、 β -G1の位置に、又血清においても α 、 β -G1の位置に特に著明である。

第5章 総括及び考按

1) 低蛋白質試料の濃縮法の改良について

内耳液、髄液の如き低蛋白質試料の濾紙電気泳動を行うに当つては、先ず試料の濃縮を行わねばならないが、私はかかる試料の濃縮法として、Miesの方法を改良して微量試料の濃縮を容易ならしめる方法を考案し、更に液滴結晶を利用する方法を行つて良結果を得ている。

しかしてこれらの新方法を批判し、その特徴とする点を論ずるために、まず従来報告せられている濃縮法について述べる。

a) 凍結乾燥法

Eaton³⁰⁾ (1953), Gries³⁰⁾ (1953), Cuvelier²⁶⁾ (1954)らの報告した方法であり、試料を凍結乾燥した後これを少量の食塩水又は緩衝液に溶解して濃縮を図る方法であるが、蛋白質は変性し易く、更に複雑な装置を必要として、内耳液の濃縮には不適當である。

b) 限外濾過法

Ewerbeck³²⁾ (1950), Esser³¹⁾ (1952), Knapp⁴⁹⁾ (1952), Olderschausen¹¹⁷⁾ (1953), Mies³⁶⁾ (1953), Mumenthaler³⁰⁾ (1957), 香月⁷⁵⁾ (1956), 斎藤¹⁴⁰⁾

(1957), 吉川¹⁶⁹⁾ (1958) らが述べている如く、特別な限外濾過装置を用いて陰圧あるいは陽圧を加えて、濃縮を行うのであるが、Mies の報告している装置は簡単で、且つ短時間に濃縮を行い得るので、私はこの装置を微量試料の濃縮を可能ならしめるように改良してよい結果を得た。

c) 低温アセトン沈澱法

Bücher¹⁴⁾ (1952) らが髄液濃縮に 応用しているが、この方法によるとリポド類もかなり除去でき、乾燥した粉末原料を得る事が可能で且つ蛋白質の変性も少いと云う。本法のマイクロ化は今後研究の価値があるものと考えらる。

d) 透析法

透析嚢としてはセロファン、コロジウム膜、Sartorius Werke の製品などがあり、濃縮剤としては Polyvinyl-pyrrolidone, アラビヤゴム、デキストランなど、更に新井ら¹⁰⁾ (1956) は Carbowax 1500 を使用する迅速濃縮法を発表し、伊藤ら⁶⁴⁾ (1959) は Carbowax 6000 を用いてよい結果を出している。この方法も内耳液の濃縮に試むべき方法と考えるが、限外濾過法に比して時間を長く必要とする点において劣っている。

以上の如き方法があるが、私が内耳液及び髄液の濃縮のために考案した2方法の中、液滴結晶を利用する方法は従来のいずれの方法にも属していないものである。

さて低蛋白質溶液の濃縮には水分及び塩類の除去が必要であり、もし塩類を除去せずして塩類が同時に濃縮される方法をとると、pH の変化によつて蛋白質の変性を招来する。又一般に変性防止のためには短時間に濃縮操作が終る事が必要である。しかし乍ら前述の私の2つの濃縮法は共にこれらの条件を充している。即ち Mies の方法を改良したものにおいては塩類の濃縮は当然おこらず、又数時間で充分濃縮可能である。次に液滴結晶を利用した方法においても、塩類は結晶の周辺無構造輪状を呈している蛋白質部の内側に特有の結晶を作るので塩類の濃縮に基く蛋白質の変性は考えられず、又濃縮に要する時間は僅かに数分である。

また実際にこれら2方法によつて濃縮を行い、蛋白質の変化の有無を検すると、その変化は僅かである。なお複合蛋白質については、リポ蛋白質が特に変化をきたし易い事は B. Swahn¹³⁹⁾ (1952, 1953), E.R.B. Smith¹³⁷⁾ (1953) らも述べている所である。しかして私の実験結果を見てもこれら2方法による濃縮時にリポ及び糖蛋白質にその変化と考えられる数値を見るが、その変化

は2方法共に糖蛋白質の方がリポ蛋白質より比較的小である。なおこれらの実験においていずれも液滴結晶による方法の方が Mies の方法の変法に比して濃縮時に与える影響は小であり、前者が後者に比して少しく優れていると考えられるが、その差は小であつて両濃縮法共に内耳液の如き超微量低濃度蛋白質溶液の分割研究に有力な一つの手段であると考えらる。

2) 内耳液の蛋白質分割について

正常海狸の内、外リンパ、髄液においては、Al, α , β , γ -G1 の各分割を測定し得て、その値は内リンパではそれぞれ 58.3, 9.4, 10.5, 21.8%, 外リンパではそれぞれ 55.3, 12.3, 16.8, 15.6%, 髄液ではそれぞれ 54.4, 14.0, 18.3, 13.3%, A/G は内リンパでは 1.40, 外リンパでは 1.24, 髄液では 1.19 である。又血清では Al, α_1 , α_2 , β , γ -G1 の各分割を測定し得て、その値はそれぞれ 48.3, 9.2, 9.1, 14.1, 19.3%, A/G は 0.93 である。

即ち A/G は、内リンパ、外リンパ、髄液、血清の順に小となつており、 β -G1 の比率については内リンパは外リンパ及び髄液に比して小なる傾向にあるが、第25表からも分るように β -G1 の蛋白量は外リンパが最も大である。なおその総蛋白量の関係よりして各分割の蛋白量は外リンパが内リンパ、髄液に比し著るしく大である。

正常家兎の内、外リンパ、髄液においても、海狸と同様にして、Al, α , β , γ -G1 の各分割を測定し得て、その値は内リンパではそれぞれ 61.1, 11.0, 15.0, 12.9%, 外リンパではそれぞれ 56.4, 13.3, 16.2, 14.1%, 髄液では 57.4, 12.6, 16.0, 14.0%, A/G は内リンパでは 1.57, 外リンパでは 1.29, 髄液では 1.35 である。又血清では Al, α_1 , α_2 , β , γ -G1 の各分割を測定し得て、その値はそれぞれ 52.9, 11.3, 9.8, 12.8, 13.2%, A/G は 1.12 である。

即ち A/G は前述の海狸の場合と異り、内リンパ、髄液、外リンパ、血清の順に小となつており、分割比そのものも各試料の間において類似の傾向を示している。又各分割の蛋白量については外リンパが内リンパ、髄液に比して著るしく大である事は第30表よりして明らかである。

複合蛋白質についてはこれを正常家兎について検索するに、リポ蛋白質は内リンパにおいては α , β -G1 の位置において Sudan Black B に陽性を示し、外リンパでは特に α -G1 の位置に、又髄液においても α -G1 の位置に明らかに認められるが、血清においては α , β , γ -G1 の各々にほぼ平均した分布を示している。

糖蛋白質は内リンパにおいては、その1例において α , β , γ -Gl の位置に、他の2例において α , β -Gl の位置にて Schiff 試薬に陽性を示している。又外リンパにおいては α , β , γ -Gl の位置に、髄液においては α , β -Gl の位置に、血清においても α , β -Gl の位置に特に明らかである。

しかして内耳液の蛋白質分割について従来の報告を概観すると、TH Vilstrup, G. Vilstrup, V. Kornerup and C. E. Jensen¹⁵⁷⁾ (1954) は濾紙電気泳動法により、Elasmobranch の内リンパ Al 0%, Gl 100% (α 10.5, β 23.5 γ 66.0%), 外リンパ Al 21%, Gl 79% (α 7.5, β 26.0, γ 46.0), 人間血清では Al 79%, Gl 21%, 人間硝子体では Al 43%, Gl 57% の数値を得ており、L.G. Chevance, A. Galli and Mme Jeanmaire²²⁾ (1956) は同じく濾紙電気泳動法により猫の外リンパにおいて、Al 16.95%, $\alpha + \beta$ -Gl 45.1%, γ -Gl 37.95% と報告し、E. Antonini, V. Casorati and S. Crifo⁴⁾ (1957) は馬について Al, α_1 , α_2 , β , γ -Gl 値をそれぞれ外リンパでは 51.05, 3.04, 9.4, 24.3, 10.3, 髄液では 49.05, 3.16, 8.02, 24.6, 14.2, 血清では 50.52, 3.22, 9.7, 12.4, 21.3 と発表し、血清並びに髄液中に存在する分割はすべて外リンパにも存在し、血清に比べると外リンパでは β -Gl が多く、 γ -Gl は少いと述べている。又 L.G. Chevance, A. Galli and Mme Jeanmaire²²⁾ (1959) は前編で述べた如き人間の死体から外リンパを採取し、免疫学的分割法を行い、外リンパの α , β -Gl 分割は髄液のそれと比べその値(%)が大である事からして外リンパが髄液の単なる透析液であるとする考え方には賛成できないと述べている。

内耳液のリボ蛋白質については未だ文献に記載を見ず、私ははじめてその存在を明らかにしたが、その由来乃至は代謝については論拠を有しない。

次に内耳液の糖蛋白質については、TH Vilstrup and C.E. Jensen¹⁵⁶⁾ (1954) は *Acanthias Vulgaris* では内リンパはムコ多糖類を含み、これはヒアルロン酸であろうと考えており、Bélanger¹³⁾ (1953) は S^{35} の注射実験によつて、Cupula と Tectorial membrane 乃至は Cupula の表面とその基底部に S^{35} を強い濃度で見出し、Cupula の物質はムコ多糖類を含んでいると結んでいる。また G. Dohlman, F.C. Ormerod, and K. McLay²⁹⁾ (1959) は S^{35} を用いた実験を行つて、 S^{35} は先ず Cupular substance を直接とりまく分泌上皮中に現れ、次いで内リンパ中や Cupula 表層へ通過し、最

後には全 Cupula を通じて分散されてしまうが、 S^{35} によつて示される含硫黄物質は恐らく含硫ムコ多糖類であろうと述べている。

擬て、これら従来の報告を私の成績と比較して考える時、私の成績は Antonini らの馬についての成績と類似の傾向を示し、Vilstrup らの Elasmobranch, Chevance らの猫についての成績とは異なる傾向を示しているが、この差が動物差に基くものか、あるいは実験方法上の要因に基くものかは更に検討の必要がある。

リボ蛋白質については、内耳液に関してのその文献は未だ見ない事は前述したが、糖蛋白質についての前述の S^{35} による実験は、内耳液の糖蛋白質の由来、代謝について示唆を与えるものであり、Cupular substance とそれを取りまく分泌上皮の内リンパ糖蛋白質との密接な関連を思わしめるものである。

擬て内耳液の蛋白質の動的平衡について考察すると、その蛋白質はいくつかのアミノ酸から合成され、それが一定の期間内耳液中を流動して機能を営み、結局破壊されていくものであらうと推定される。しかし、その蛋白質が内耳血管から産生されるものがあると考えるとき、いかなる形でそれが行われるか、また蛋白合成が行われるとするとそれがどこで行われ、恐らく細胞の中であらうが、どの種類の細胞でという。またどこで吸収あるいは破壊されるか、あるいは蛋白質は一斉にアミノ酸から合成されるのか、すでにある蛋白質が部分的に修正されるのか、また逆に蛋白質の破壊はすべてアミノ酸あるいは窒素にまで根本的に行われるのか否かというような事については、現在最もよく研究されている血漿蛋白質についてもその多数の業績の成績は必ずしも一致しておらず、更に複雑なる代謝機構を有すると考えられる内耳組織、内耳液の蛋白質については殆んど解明されていない。しかして内耳液蛋白質は体蛋白の動的平衡の部分であるから、病態についてもその意味で考えられなければならないが、われわれは各種病態や疾患時の体蛋白の病態を考察する際に、まず血漿の蛋白像を出発点とするのであり、内耳液、髄液の蛋白質分割を測定したのも実にこの意味においてである。

なお Field, Leigh, Heim and Drinker³⁰⁾ (1934—1935) は犬の各部リンパ液の蛋白濃度を測定した結果、毛細血管壁からは血清 Globulin より Albumin の方が透過し易い事を明らかにしたが、恐らく、蛋白質溶液では Globulin 分子の大きさが毛細血管壁を透過するしないの限界であらうと考えられるので、内、外リンパの由来

について第1編において述べた如く考えるならば、この実験的事実は内耳病態時の内耳液蛋白質分割を考察するに当つて1つの示唆となるであろう。

第6章 結 語

1) 内耳液や髄液の如き低蛋白濃度試料を濾紙電気泳動するには、先ず試料の濃縮を必要とするが、内耳液はまた甚だ微量でもあるので、その濃縮の方法として私は Mies 氏法の改良法もしくは液滴結晶利用法を考案して効果をあげる事ができた。

2) 上記濃縮法はいずれも単純蛋白質に殆んど変性をきたさぬことを確かめたが、リポ並びに糖蛋白質にはある程度の変化が生じ易い事を知った。しかし液滴結晶利用法の方が Mies 氏法の改良法に比し、その与える変化は少しく小である。

3) この方法を用いて測定した蛋白質分割の Al , α , β , $\gamma\text{-Gl}$ (%) は、正常海狸の内リンパではそれぞれ 58.3,

9.4, 10.5, 21.8 (%)、外リンパでは 55.3, 12.3, 16.8, 15.6 (%)、髄液では 54.4, 14.0, 18.3, 13.3 (%)、血清の Al , α_1 , α_2 , β , $\gamma\text{-Gl}$ (%) は 48.3, 9.2, 9.1, 14.1, 19.3 (%) であり、また正常家兎の内リンパではそれぞれ 61.1, 11.0, 15.0, 12.9 (%)、外リンパでは 56.4, 13.3, 16.2, 14.1 (%)、髄液では 57.4, 12.6, 16.0, 14.0 (%)、血清の Al , α_1 , α_2 , β , $\gamma\text{-Gl}$ (%) は 52.9, 11.3, 9.8, 12.8, 13.2 (%) であつた。

4) 正常家兎のリポ蛋白質は、内リンパにおいては α , $\beta\text{-Gl}$ の位置に明らかであり、外リンパでは特に $\alpha\text{-Gl}$ の位置に著明である。一方髄液では $\alpha\text{-Gl}$ 、血清では α , β , $\gamma\text{-Gl}$ の位置に認められる。

5) 正常家兎の糖蛋白質は、内、外リンパ共に、 α , β , $\gamma\text{-Gl}$ の位置に明らかであり、髄液、血清においては α , $\beta\text{-Gl}$ の位置に特に著明である。

第3編 実験的伝音系障害時の内耳液蛋白質に関する研究

第1章 緒 言

中耳伝音系障害時の難聴については、中耳のみの伝音障害で説明し難い場合があり、この際内耳液中における伝音障害も理論的に可能であり、また我が教室の内耳液の理化学的性状の病態追及成績からも実際にこれが立証されているが、私は未だ明らかにされていない蛋白質の病態をこゝに検索せんとした。

即ち、実験的中耳炎及び耳管狭窄症の際の内耳液の総蛋白量並びに蛋白質分割を測定したが、その成績を述べると共に、かゝる際の難聴の発現理由並びにその機構等について検討したところを報告する。

第2章 実験材料

第1節 実験動物

実験動物としては第1編において述べた如き海狸を用いた。

第2節 被検液採取法

被検液採取法としては第1編において述べたと同様の方法を使用した。

第3章 実験方法

第1節 聴器障害方法

第1項 実験的中耳炎惹起法

寺島株葡萄球菌を斜面寒天に培養し、24時間後に1斜面を4ccの0.9% (pH 7.0) の滅菌食塩水(NaOHでpHを修正したもの)に溶解し、凡そ7~10perccの菌

量を示す菌液を作り、これに血液寒天斜面に培養した肺炎双球菌を同様に4ccの食塩水に溶かしたものを加えて8ccの混合菌液を作り、これを約0.1乃至0.2cc海狸に経鼓膜的に中耳腔内に注入した。

第2項 耳管狭窄惹起法

手術的に耳管を露出して焼灼する方法を採つた。即ち海狸を仰臥位に固定し、左下顎角部を中心に縦に皮切を加え、筋膜を剝離して耳下腺、顎下腺を見、更に咬筋を分けて中耳骨胞を認める。その骨胞の骨膜を切開して骨膜下に剝離、尖端を露出する。しかしてその突起尖端が耳管の中央部に相当しているので、その耳管を露出し焼灼を行う。なおこの操作は右耳のみにを行い、左耳は対照とした。

第2節 蛋白質定量法及び濾紙電気泳動法

蛋白質定量及び濾紙電気泳動法は、第1編及び第2編において述べた方法と同一である。

第4章 実験成績

第1節 実験的急性中耳炎動物

葡萄球菌と肺炎双球菌の混合液を中耳腔内に注入すると、翌日既に鼓膜発赤高度となり、剖検すると中耳腔粘膜は全般に亘り発赤し、且つ腫脹著明である。

そこで穿刺注入後24時間及び5日後の内耳液、髄液及び血清について測定した。その成績を示すと第39, 40, 41, 42表の如くである。

第39表 実験的急性中耳炎海鯉の総蛋白量

(mg/dl)											
		1 日		5 日				1 日		5 日	
		No.		No.				No.		No.	
内 リ ン パ	352	36	501	23	體 液	409	14	414	21		
	354	25	503	33		410	23	415	15		
	355	28	505	28		411	18	416	25		
	356	25	506	31		412	20	417	19		
	357	31	507	21		413	25	419	30		
		29±2.1		27±2.3				20±1.9		22±2.6	
外 リ ン パ	352	140	501	93	血 清	352	4220	501	3810		
	354	90	503	125		354	5070	503	4350		
	355	132	505	143		355	4180	505	3220		
	356	95	506	123		356	3810	506	5150		
	357	118	507	122		357	4830	507	4820		
		115±9.9		121±8.0				4420±231		4270±346	

しかして蛋白質分割の測定には、各試料について各群共第2編、第4章、第1節において述べたものと同数の海鯉を使用した。

即ちその総蛋白量については、菌液の穿刺注入後24時間のものにおいては、内リンパの総蛋白量は25~36mg/dl, 平均値29±2.1mg/dl, 外リンパの総蛋白量は90~140mg/dl, 平均値115±9.9mg/dlとなり、内、外リンパ共に正常値よりやや多い傾向がみられるが、それは特に外リンパにおいて明である。しかしてその傾向は

第40表 実験的急性中耳炎海鯉の蛋白質分割

(24 時間)													
材料	分割%		A ₁	d	β	γ-G	A/G						
	群	No											
内リンパ	16	55.7	7.2	7.5	29.6	1.26							
	17	54.2	8.3	10.7	26.8	1.18							
	平均	55.0	7.7	9.1	28.2	1.22							
外リンパ	18	48.2	16.4	14.2	21.2	0.93							
	19	53.2	10.2	20.8	15.8	1.14							
	20	47.5	18.5	15.2	18.8	0.90							
平均	49.6	15.0	16.7	18.7	0.98								
髄液	21	54.3	17.1	16.5	12.1	1.19							
	22	50.1	12.3	20.3	17.3	1.00							
	23	54.5	18.6	17.8	9.1	1.20							
平均	53.0	16.0	18.2	12.8	1.13								
材料	分割%		A ₁	d ₁	d ₂	β	γ	A/G					
	No	前發											
血	257	50.3	12.7	14.3	10.3	12.2	1.01						
		52.3	13.3	8.3	11.3	14.8	1.10						
		50.7	11.5	9.3	13.5	15.0	1.03						
	293	49.8	10.2	5.2	15.3	19.5	0.99						
		48.2	9.7	11.1	20.1	10.9	0.93						
	324	48.8	8.6	13.3	16.2	13.1	0.95						
		48.3	14.3	6.2	18.5	12.7	0.93						
	352	47.2	15.3	9.8	16.4	11.3	0.89						
		52.3	6.3	14.2	7.2	20.0	1.10						
	370	55.1	7.5	10.1	10.1	17.2	1.23						
50.0		10.9	11.0	14.0	14.1	1.00							
平均	50.6	11.0	9.3	13.9	15.2	1.02							

内リンパにおいては No 352, 357, 外リンパにおいては No. 352, 355 に著明である。

次で髄液の総蛋白量は 14~25mg/dl, 平均値 20±1.9mg/dl, 血清では 3810~5070mg/dl, 平均値 4420±231

第41表 実験的急性中耳炎海鯉の蛋白質分割

(5日)															
試料		分割%		A1		d		β		γ-G		A/G			
内リンパ		24		54.3	10.1	7.4	28.2	1.19							
		25		56.1	9.5	5.1	29.3	1.28							
平均				55.2	9.8	6.3	28.7	1.24							
外リンパ		26		47.3	14.1	13.3	25.3	0.90							
		27		51.2	11.9	19.8	17.1	1.05							
		28		45.3	22.1	11.5	21.1	0.83							
平均				47.9	16.0	14.9	21.2	0.92							
體液		29		50.8	13.6	20.3	15.3	1.03							
		30		56.1	18.6	14.1	11.2	1.28							
		31		51.2	15.2	17.5	16.1	1.05							
平均				52.7	15.8	17.3	14.2	1.11							
試料		分割%		A1		d1		d2		β		γ-G		A/G	
		No.													
血清		420	前後	42.6	13.5	11.4	13.9	18.6	0.74						
				46.8	15.7	8.3	15.1	14.1	0.88						
		458		48.1	12.5	5.9	13.2	20.3	0.93						
				49.1	9.1	8.5	10.5	22.8	0.96						
		446		49.1	14.9	6.8	13.8	15.4	0.96						
				52.9	16.0	5.3	15.3	10.5	1.12						
		473		51.2	9.8	10.2	12.2	16.6	1.05						
				47.2	11.8	7.9	14.8	18.3	0.90						
		501		54.5	7.3	12.5	9.8	15.9	1.20						
				52.7	9.3	10.3	12.2	15.5	1.11						
平均				49.1	11.6	9.4	12.6	17.3	0.97						
				49.7	12.4	8.1	13.6	16.2	0.99						

第42表 実験的急性中耳炎海鯉の蛋白質

		分割		A1		d		β		γ-G	
		経過日数		mg/dl							
肉リンパ	24時間	29	55.0% (160)	7.7% (2.2)	9.1% (2.6)	28.2% (8.2)					
	5日	27	55.2 (14.9)	9.8 (2.6)	6.3 (1.7)	28.7% (7.8)					
外リンパ	24時間	115	49.6 (57.0)	15.0 (17.3)	16.7 (19.2)	18.7 (21.5)					
	5日	121	47.9 (58.0)	16.0 (19.4)	14.9 (18.0)	21.2 (25.6)					
髄液	24時間	20	53.0 (10.6)	16.0 (3.2)	18.2 (3.6)	12.8 (2.6)					
	5日	22	52.7 (11.6)	15.8 (3.5)	17.3 (3.8)	14.2 (3.1)					

		分割		A1		α1		α2		β		γ-G	
		経過日数		mg/dl									
血清	24時間	4420	50.6% (2236.3)	11.0% (486.2)	9.3% (411.1)	13.9% (614.4)	15.2% (671.8)						
	5日	4270	49.7 (2122.2)	12.4 (529.5)	8.1 (345.4)	13.6 (580.7)	16.2 (691.7)						

()内mg/dl

mg/dl であり、共に正常値の変動範囲を越えない。

次に菌液の穿刺注入後5日のものについて見ると、内リンパの総蛋白量は $21 \sim 33 \text{ mg/dl}$ 、平均値 $27 \pm 2.3 \text{ mg/dl}$ 、外リンパではその総蛋白量は $93 \sim 143 \text{ mg/dl}$ 、平均値は $121 \pm 8.0 \text{ mg/dl}$ となり、特に外リンパは正常値よりやゝ多い傾向を示し、菌液の穿刺注入後5日に至るものなおその変化を継続している事を認めた。

次で髄液の総蛋白量は $15 \sim 30 \text{ mg/dl}$ 、平均値は $22 \pm 2.6 \text{ mg/dl}$ 、血清では $3220 \sim 5150 \text{ mg/dl}$ 、平均値は $4270 \pm 346 \text{ mg/dl}$ であり、24時間後のものと同様正常値の変動範囲を越えない。

次に蛋白質分割についてみると、内、外リンパ及び髄液は Al , α , β , $\gamma\text{-Gl}$ 、血清は Al , α_1 , α_2 , β , $\gamma\text{-Gl}$ の各分割を認め得る事は正常時と変りないが、 A/G は24時間後のものにおいては、内リンパは1.22、外リンパは0.98、5日後のものにおいては、内リンパは1.24、外リンパは0.92となり、正常時より小なる成績を示すが、その傾向は外リンパにおいて著明である。なお24時間後における髄液の A/G は1.13、血清のそれは1.02、5日後における髄液の A/G は1.11、血清のそれは0.99で、共に正常値の変動範囲を越えない。

次に各分割の絶対量は第42表から分るように、24時間、5日のもの共に内リンパの $\gamma\text{-Gl}$ は正常値より少しく大であり、外リンパにおいては各分割いずれも正常値より大であるが、髄液及び血清においては、各分割においてその値は正常値の変動範囲を越えない。

次に血清蛋白質分割(%)の実験的急性中耳炎惹起前後の測定値の間には明らかな差異は認められない。

又内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量及び各分割(%及び mg/dl)において、24時間後と5日後の成績の間には明らかな差異はみられない。

なお以上の実験は中耳炎の極めて初期のものであり、内耳液結晶像にも細胞の浸潤を見なかつたことより内耳炎の範疇に入るものとは考えられない。

第2節 実験的耳管狭窄症動物

実験的に耳管の狭窄が惹起された場合には4、5日で鼓膜は濁濁し、不透明更には内陷を呈し、滲出液線を見る事がある。剖検すると中耳腔粘膜は軽度の発赤を認め、且つ滲出液が貯留しているのを見る。そこで術後12日の内耳液等について測定した。

その成績は第43表に示す如くである。

即ち内リンパの総蛋白量は $19 \sim 39 \text{ mg/dl}$ 、平均値は $28 \pm 3.6 \text{ mg/dl}$ 、対照は $25 \pm 1.6 \text{ mg/dl}$ 、外リンパの総蛋白

量は $68 \sim 108 \text{ mg/dl}$ 、平均値は $89 \pm 7.5 \text{ mg/dl}$ 、対照は $76 \pm 2.4 \text{ mg/dl}$ となり、内、外リンパ共にその総蛋白量は対照と比べると大なる傾向を示すが、これは外リンパにおいて特に明らかである。しかして内リンパにおいて No. 559, No. 560 は対照より増量しているが、その他は著明ではなく、No. 562 はむしろ減少の傾向を示している。外リンパにおいても No. 559, No. 560, No. 563 は対照より増量しているが、その他は著明でない。

第43表 実験的耳管狭窄症海猿の総蛋白量 (mg/dl)

内リンパ			外リンパ			髄液		血清	
No.		対照	No.		対照	No.		No.	
559	39	29	559	108	81	564	25	559	4120
560	32	26	560	92	78	566	19	560	3800
561	28	27	561	68	69	567	30	561	4630
562	19	23	562	77	72	568	14	562	4540
563	22	20	563	102	81	569	22	563	3510
28		25	89		76	22		4120	
±3.6		±1.6	±7.5		±2.4	±2.7		±213	

次に髄液の総蛋白量は $14 \sim 30 \text{ mg/dl}$ 、平均値 $22 \pm 2.7 \text{ mg/dl}$ 、血清では $3510 \sim 4630 \text{ mg/dl}$ 、平均値 $4120 \pm 213 \text{ mg/dl}$ であり、いずれも正常値の変動範囲内にある。

第5章 総括及び考按

中耳伝音系障害時の難聴については、それが中耳のみの伝音障害で説明し難い場合があるが、我が後藤教授は1952年の宿題報告⁴¹⁾の中において、内耳性難聴者に中耳炎病歴を有するものが少なく、かゝる点よりしても中耳伝音系障害時に内耳が何らかの影響を受けるであろう事は想像に難くないとされているので、この点を内耳液の蛋白質について追究した。

1) 中耳の炎症と内耳液

葡萄球菌と肺炎球菌の混合液を海猿の中耳腔に経鼓膜的に注入して実験的急性中耳炎を惹起させ、24時間及び5日後の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量並びに蛋白質分割の測定を行つて、内、外リンパ、特に外リンパに変化をきたす事を知つた。

即ち24時間のものにおいては内リンパの総蛋白量は平均値 $29 \pm 2.1 \text{ mg/dl}$ 、外リンパのそれは $115 \pm 9.9 \text{ mg/dl}$ となり、内、外リンパ共に正常値よりやゝ多い傾向が見られるが、それは特に外リンパにおいて明らかである。なおこの場合髄液及び血清は共に正常値の変動範囲を越えない。

次に5日後のものにおいては、内リンパの総蛋白量は平均値 $27 \pm 2.3 \text{ mg/dl}$ 、外リンパのそれは $121 \pm 8.0 \text{ mg/dl}$ となり、特に外リンパは正常値よりやゝ大なる傾向

を示しており、感染後5日に至るもなおその変化を継続している事が考えられる。

次に蛋白質分劃についてみると、内、外リンパ及び髄液は $Al, \alpha, \beta, \gamma$ -G1, 血清は $Al, \alpha_1, \alpha_2, \beta, \gamma$ -G1 の各分劃を認め、この点においては正常時と変りないが、A/Gについてみると24時間後のものにおいては内リンパは1.22, 外リンパは0.98, 5日後のものにおいては内リンパは1.24, 外リンパは0.92となり、いずれも正常値より小となつてゐるが、それは特に外リンパに著明である。なお髄液及び血清のA/Gは正常値の変動範囲を越えない。

又各分劃の絶対量 (g/dl) は24時間、5日のもの共に内リンパの γ -G1 は正常値より大となつており、外リンパにおいては各分劃いずれも正常値より大であるが、髄液、血清においてはその値は正常値の変動範囲を越えない。

これらの成績から分るように、実験的急性中耳炎時に内、外リンパの変化をきたすがその主体は外リンパにある事が分る。

扱て、蛋白質代謝の生理や病態生理については不明の点が多い事は既述した所であるが、蛋白質の変化を現象的に大きく分けると Albumin の変化（主として減少）と γ -Globulin の変化（主として増加）である。Albumin の減少と Globulin の増加は同時に見られることが多く、この場合 Albumin が Globulin に転化すると考える人もあるが、問題は更に複雑なものである事が考えられる。

次に各分劃の内耳液における意義について考察する。

a) Albumin の変化

Albumin の生理的機能の主なるものは（1）膠質滲透圧の保持、（2）栄養あるいは生体構成成分素材としての役割、（3）物質運搬の作用、（4）膠質系における保護作用であり、この Albumin の変動は内耳代謝機構、更には聴覚に重大なる影響を与えるであろう事は容易に想定される所である。

しかしてその病態生理を論ずるにあつてはこれを大きく（1）素材の問題（2）産生の問題および（3）産生後の消耗あるいは破壊の増減、とに分けて考えることができる。前述の成績をみると、Albumin の絶対量は内リンパにおいては正常値の変動範囲を越えないが、外リンパにおいては総蛋白量の増大に伴つて大となつてゐる。この場合上述の素材は第1編で述べた如く内リンパの生成は血管条を主とし、また卵形囊の如き膜迷路感

覚上皮部もこれに関与する事より、内リンパでは主として血清が考えられ、外リンパの生成はその二起源説よりして素材として血清と髄液が考えられる。しかしこの髄液と血清は本実験において正常値の変動範囲を超えていないので（1）の素材の問題は考慮外に置くことができる。

次に（2）の産生の問題であるが、実験的急性中耳炎に際して外リンパ腔壁血管、更には血管条の毛細血管が拡張してその透過性が昇進してその総蛋白量が増大したと考えられるが、解剖学的関係よりして外リンパ腔壁血管の変化が血管条のそれに比べて大であつたために外リンパの変化は内リンパに比べて特に明らかであつたと考えられる。なおこの場合毛細血管の変化に対するアレルギーの影響は当然考えられる所である。しかしてこの産生の問題については更に後述する。この場合、総蛋白量の増大に伴つて Albumin も変動するわけであるが、内リンパの場合に Albumin の変動がみられない事実は次の3つに分けて考える事ができる。即ち（イ）産生の増大、消耗あるいは破壊の増大により表面上変動を見ない。（ロ）中耳の急性炎症の影響がなく、産生正常、消耗あるいは破壊の正常。（ハ）産生減少、消耗あるいは破壊の減少、であるが（ハ）はこの場合その血管の変化を考えても可能性は少い。結局（イ）と（ロ）とがその可能性が大であるが、これは中耳炎の時期、程度などによつて定るものと考えられる。しかし、内耳液結晶像にも細胞浸潤を見ていないので内耳炎の範疇に入るものとは考えられない。

次に外リンパの場合、その各分劃の絶対値は正常値より大であるが、これを大きく次の3つに分けて考えることができる。即ち（イ）産生の減少、消耗あるいは破壊の著るしい減少、（ロ）産生は正常、消耗あるいは破壊の減少、（ハ）産生増大、消耗あるいは破壊はそれより小の場合、である。しかして外リンパ腔壁血管よりの産生を考える場合、菊地⁷⁸⁾（1958）も報告している如く、かゝる血管は急性中耳炎時に拡張をみるので、（イ）（ロ）の可能性は少く、（ハ）が最も有力であると考えられ、その血管壁透過性は増大し、その産生の増大をきたしているものと想定せられる。

Albumin は γ -Globulin などに比べて、その生理、機能ともに生体の栄養あるいは構成成分の素材的な意味がつよいので、このように量的、機械的に考察を加えたわけであるが、 γ -Globulin についてはやゝ趣きが異なるのである。そこで次に γ -Globulin について考察をすゝめ

る。

b) γ -Globulin の変化

血清の γ -Globulin の減少は栄養不足、ネフローゼ、先天性無 γ -Globulin 血症以外には殆んどみられず、病態時には常にその増加が指摘され、この場合同時に Albumin の減少を伴うのであるとされている。しかし私の実験成績においては24時間並びに5日後のもの共に内リンパにおいては γ -Globulin、外リンパにおいては γ -Globulin を含めた全分劃絶対量の増大を示している。この場合の γ -Globulin の増量は、前編に述べた所の毛細血管壁からは血清 Globulin より Albumin の方が透過し易く、恐らく蛋白質溶液では Globulin 分子の大きさが毛細血管を透過するしないの限界であろうとした実験成績 (Field, Leigh, Heim and Drinker³⁴⁾ 1934—1935) から考えても、Albumin の変化の所で述べたように、実験的急性中耳炎のために血管条並びに外リンパ腔壁血管を含めた内耳毛細血管の拡張がおこり、その透過性が昂進して γ -Gl の増量をきたしたとも考えられるが、内リンパにおいては γ -Globulin 以外の分劃の増量がみられないので、 γ -Globulin の問題は Albumin の場合とその趣きを異にしており、量的、機械的に取り扱えないものである。特に内、外リンパは血清に比べてその生理、病態生理は更に複雑であり、そのすべてが殆んど分っていない現状である。しかし γ -Globulin は周知の如く免疫抗体との関係において意義が大きいのである。そしてそれは生体とその体内、体外に由来する抗原的なものに対して作つたものとする考え方であり、従つてその対象となる抗原的環境を想定しなければならない。又抗体は一般に γ -Globulin の一種であると考えられているが、正常ならびに病態時の γ -Globulin のすべてを具体的にある特定の抗体であるとする証明は未だなされていない現状である。従つて実験的急性中耳炎という抗原的環境を想定した場合、内、外リンパの γ -Globulin の増量はそれが免疫抗体との関係についてはその証明がなされていないので論ずる事ができないが、内リンパの γ -Globulin は、外リンパの γ -Globulin が他の全分劃も含めて増量しているのに比べて、そのみ増量しているので、この点内リンパは免疫抗体との関連の意味をも含めて、外リンパと生理、病態生理の上から根本的な差異を有している事が考えられる。

扱て内耳液を免疫学的に見ると、羽根⁶⁵⁾ (1918) は免疫処置にて内耳液中に凝集素の出現する事を報告し、松本¹⁰²⁾ (1923) は山羊又は牛血球で家兎を免疫して血球

の溶血素価高き時には内耳液中にも溶血素が出現し、高原¹⁶⁰⁾ (1933—1934) は内耳液中に人血球免疫処置にて血球凝集素を認めている。又田井¹⁴⁹⁾ (1936) も自動免疫を施した家兎内耳液中に沈降素、鶏血球凝集素、溶血素、菌凝集素などを発見し、教室の大島¹¹⁹⁾ (1956) も聴器結核抗原抗体反応証明の立場から内耳液の沈降反応を行い、沈降素を証明している。

かくの如くにして内耳液の中には免疫体が存在し、また内耳液中に免疫体の移行が可能である事が証明せられているので、これら内、外リンパにおける γ -Globulin の変化も理解される。

c) α -Globulin 及び β -Globulin

前者はいくつかの糖蛋白質、またはポ蛋白質の集合したものと考えられるが、その機能や生理的意義についてはよく分っていない。

後者はリポ蛋白質その他の複合蛋白質であると考えられており、この分劃には色々の物質が結合し、また銅や鉄の結合性蛋白として意義が大きい。

しかし私の実験成績においては内リンパにてはこの両分劃共に殆んど変動を示していないが、外リンパにおいては24時間、5日のものに両分劃に増量をみているが、この分劃は Albumin、 γ -Globulin に比べてその意味が少いとされている現状であり、内耳代謝においてその占める位置も勿論未知数である。

扱て中耳に炎症の存する場合に内耳にいかにして波及するか、勿論私の実験においては内耳炎をおこしていない事は既述の通りであるが、内耳への感染の機転を知つて内耳への影響の機轉を推定せんとした。

即ち経中耳性内耳感染の機転及びその際における内耳病変については従来 Brunner-Alexander-Marburg¹⁸⁾、Denker-Kahler²⁶⁾、Marx⁹⁴⁾ らの成書にも詳細に論ぜられている如く、その感染の機転としては、(1) 前庭窓乃至蝸牛窓經由、(2) 血行性、(3) 内耳殻の外傷性裂隙經由、(4) 鼓室と内耳間の組織の破壊由来、などが記載され、その際細菌又は毒素が上述の内耳窓を経て内耳に侵入すると云われている。

実験的急性中耳炎時において内耳液蛋白質の変動に対して内耳毛細血管の占めるその意義の重要性については前述した所であるが、経中耳性内耳感染においては内耳毛細血管の拡張をきたしその透過性の昂進する事は当然と考えられる。しかし炎症部では血管内圧も上昇しており、これも一因子として考える必要があり、従つて内

圧・口径・及び透過性の3因子を同時測定する事が必要となってくる。Landis⁸⁰⁾ (1927) はこれらの条件を満足する実験を行い、毛細血管壁よりする色素の透過性は毛細血管の口径に関係なく、内圧に関係する事を認めた。Florey⁸⁵⁾ (1926) は家兎の腸血管系においてその毛細血管を検索し、澱粉のような膠質は内皮細胞の細胞質を通過できるが、核に入る事はできないと述べ、更に炎症性組織においても同様な所見を得ており、又ヘモグロビン液がゼラチン膜を通過す時は収縮した膜よりも伸展した膜で容易に拡散する事を示して、炎症時における血管壁の透過性昇進に基く膠質の拡散について示唆を与えている。

次にこのような炎症時の充血の場合に、毛細血管の透過性の昇進をきたすに至る条件はその時の状態によつて異なる事は当然である。しかし炎症由来のものは、熱によつて皮膚の毛細血管が持続的に拡張し水分と血液蛋白質とが異常に透過するためと考えられている熱帯浮腫、その他鬱滞時の受動的鬱血などと異つて、水分や蛋白質の滲出を起す条件は短時間で可能ではないかと考えられるが、勿論その部位によつてその条件の異つてくる事は当然である。

このような内耳毛細血管の拡張に基く透過性昇進が内耳液蛋白質に及ぼす問題に関連して、次に内耳液蛋白質のかゝる状態時における吸収について述べると、Miller⁸⁸⁾ (1938) は実験的に、炎症時には非拡散性の蛋白質、炭水化物及び色素の吸収は遅延するが、拡散し易い炭水化物や色素等の吸収は逆に促進される傾向がある事を見出している。これを実験的急性中耳炎時の内耳にあてはめて考察すると、内耳液の水分や又は小分子の溶質は毛細血管より吸収され、一方 Globulin 大から、より分子の大きなものは分解して小分子になるか、リンパ管により排泄されるか、又は遊走した細胞に貪食されるかのいずれかの途をとる事が考えられるが、解剖学的に外リンパ腔が内リンパ腔より中耳の炎症性変化を蒙り易い事を考え併せると、かゝる状態時の外リンパの総蛋白量増大の機序の一部としてかゝる因子を考える事の妥当性が生ずる。

即ち内耳血管におけるこれらの変化によつて内耳液、特にその蛋白質に変動を与えるものであると考えられる。

このように血管の重要性を指摘したが、中耳腔と内耳の間の血管連絡はどうなつていようか。これについては古くから議論のある所である。しかし Politzer

¹²²⁾ (1876) は中耳血管は内耳骨殻の血管と交通し、それから内耳血管に連ると述べ、Shambaugh¹³²⁾ (1905) は仔牛において膜様迷路と内耳骨殻の血管の間の交通をみている。Wolff²⁷⁾ (1934)、星野⁵⁷⁾、仙石¹⁴⁸⁾ (1930)、Lucas⁹³⁾、Alexander⁹⁾ (1904) もこの説を肯定し、Zange¹⁶⁸⁾ (1914) も多くの標本の中で正円窓から鼓室岬を通つて基礎回転に達する血管を示す只1例をみたのみであると言つている。

それに対して Hyrtl⁵⁴⁾ (1845)、Siebenmann¹³⁴⁾ (1894)、Shambaugh¹³³⁾ (1922)、Rushton¹³⁰⁾ (1957) らは否定の立場をとり、菊地⁷⁸⁾ (1958) も家兎における実験によつてやはり中耳、内耳の血管連絡を否定しており、炎症をおこしたものでは蝸牛窓附近で交通の認められるものがあつたが、これは新生血管と思われると述べ、本杉¹¹⁵⁾ (1959) も血管連絡を否定している。

このように中耳と内耳の血管連絡は無いというのが現在の大勢である。しからば内耳の血管変化はいかなる機転で惹起されるか、この経路は、Mayer⁹⁵⁾ (1908、1909)、Blohmke¹⁴⁾ (1912)、Görke³⁸⁾ (1906)、Pause¹²⁰⁾ (1909)、Grünberg⁴⁰⁾ (1909)、Friedrich³⁶⁾ らにより蝸牛窓説が唱えられ、現在最も有力である。

しかして今迄屢々述べた如く私の実験においては特に内耳における炎症性細胞浸潤の無い点より所謂内耳炎の範疇に入るものとは考えられず、内耳に見られる病変の本質は炎症であろうとも、その病変は一定の強さを示していないことより、「炎症」の問題は「強さ」の問題であると喝破している Aschoff の言葉に従いたい。

さて Herzog⁴⁹⁾ (1913) は組織連続性の破綻が無くて起る中耳性内耳炎を誘導性漿液性内耳炎と名付けているが、彼は細菌毒素の刺激による各部位における内耳液成分の差異に対し、これを平均等一ならしめんとする身体の自然能力により内耳液の交流作用を起し、その成分の変化せる内耳液はその部位の血管を刺激し、炎症刺激は全内耳に波及し、広範なる漿液性炎症の像を呈するに至るという。この場合彼は特に蝸牛窓を重視しているが、この考え方は私の実験にもあてはまるものであるとしても、そのすべてを言い尽しているものではないと考える。又小出⁸²⁾ (1955) の報告せる家兎の鼓室灌流実験に見られる如き現象が、鼓室注入菌液又は滲出物と内耳との間に起る可能性も充分あり、更に又局所アレルギーの問題も念頭に置く必要は大である。

このように内、外リンパの総蛋白量並びに蛋白質分割の実験的急性中耳炎時に示す意義を色々考察したが、そ

の複雑さはその意義の重大性を更に深く思わせるものである。しかして私の場合においてはいわゆる内耳炎を否定し、蝸牛窓を介しての中耳異常代謝産物が内耳組織、特に毛細血管を刺激してその透過性昇進をきたし、更には毛細血管並びに毛細リンパ管の異常に基く代謝障害をきたして内耳液蛋白質の病態を見ると考えるが、更に鼓室注入菌液又は滲出物と内耳液との蝸牛窓（特に病的変化を起した）を介しての物理的相関問題、又中耳の局所アレルギーに基く内耳の病変も考慮に置いているが、その原因が中耳異常代謝産物にしても又局所アレルギーにしても、内耳の毛細血管の影響を強調するものである。

2) 実験的耳管狭窄症と内耳液

実験的に海猿に耳管狭窄症を惹起せしめて12日後にその内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量を測定し、特に外リンパにおいてその変化をきたす事を知った。

即ち内リンパの総蛋白量は $28 \pm 3.6 \text{ mg/dl}$ 、外リンパのそれは $89 \pm 7.5 \text{ mg/dl}$ となり、特に外リンパは対照に比べて増量している傾向にある事が分る。しかし内リンパにおいては増量を示すものと変動しないもの、あるいはむしろ減少の傾向を示すものがあり、外リンパでも変動を示さないものが認められるが、その意義については後述する。

扱て耳管狭窄症に関する病理組織学的の検索については、本症成立の原因として Bezold は補空水腫説を、Politzer が炎症説を唱えてよりその本態究明のために主として病理組織学的立場から努力が払われ、又本症の示す聴力障害についても色々説明が試みられ、その内耳病変についても多くの業績がある。

即ち Beck¹²⁾ (1914, 1919) は主として犬を用いて実験的に耳管狭窄症を惹起させて、中耳腔内の貯留液は無菌的であるが、粘膜に炎症所見を示す事を報告し、Claus²⁴⁾ (1930) も同様の実験を犬を用いて行い、Beckと同様に貯留液を認め、且つ炎症所見を見ているが、更に蝸牛窓膜の肥厚、蝸牛窓膜、前庭窓の骨胞側への転移を指摘している。鰐淵、林¹⁶⁴⁾ (1932) は家兎の実験において、中耳腔に刺激性炎症を起さずして耳管狭窄を惹起させる事の困難なるを説き、安藤⁹⁾ (1934) も家兎による実験でやはり中耳粘膜の炎症性変化と中耳貯留液の相関性について論じている。菅谷¹⁴⁵⁾ (1935) は海猿を用いて実験を行い、骨軸血管の充血、鼓室階又は前庭階の出血、更に第二鼓膜の附着部結合組織の浮腫状変化及び充血、出血を認める事があると論じ、丸岡¹⁰⁰⁾ (1940)

は家兎による実験で、耳小骨及び小筋の被覆粘膜及び第二鼓膜の肥厚について言及し、小西³⁵⁾ (1953) は海猿及び犬による実験において、中耳腔の粘膜の病変の状態よりして浮腫型と増殖型に分け、増殖型では蝸牛窓の固定、第二鼓膜の肥厚を呈するものがあるが、いずれの例においても内耳には見るべき変化がなかったと述べている。

このように実験的耳管狭窄症においては内耳に炎症所見を認め、且つ蝸牛窓に病的所見を見るという業績から考えると、私の実験においてもかかる所見が実験成績の上に何らかの形で影響しているのではないかと想像せられる。しかしこの炎症機転波及の問題は内耳液の液滴結晶像に細胞浸潤を見ない事よりしても、いわゆる内耳炎の範疇に入るとは考えられない。従つて実験的耳管狭窄症における内耳液の病態は実験的急性中耳炎の場合の考え方によつて取り扱うと理解が容易となり、前述した所の Herzog のいわゆる誘導性漿液性内耳炎の概念を考慮の中へ入れて、蝸牛窓を介して内耳への中耳異常代謝産物の侵入とそれに伴う内耳毛細血管の変化などを考える時、前述した実験的急性中耳炎の場合と同様な考え方によつて内、外リンパの蛋白質についての病態が理解されるのである。

この他更に中耳腔内貯留液と内耳液の内耳窓、特に蝸牛窓を介しての存在による両液間の物理的相互影響に基く膠質、塩類などの滲透圧平衡が内耳液の蛋白質に重大なる影響を与えるであろう事は充分予測され、蝸牛窓が病的変化を起している場合は更にその影響する所は大となるであろう。又本症における中耳腔内陰圧の測定については、G. Holmgren⁵²⁾ (1934), L. Holmgren⁵³⁾ (1940) が犬を用いて実験を行つているが、このような中耳腔内陰圧が蝸牛窓を介して外リンパの病態に、主として物理的立場から影響を与える事は充分可能性のある事であり、これ以外に中耳の局所アレルギーに基く内耳液の変化も当然予測される所である。

しかして、その変化が主として外リンパに認められ、内リンパにはその変動が少い事実は、外リンパと中耳の解剖的關係より理解し得るが、個々の動物においてその変動にかなりの差異のみられる事は、本症に基く炎症の程度、蝸牛窓の変化、中耳腔内貯留液や陰圧の状態、局所アレルギー、動物の個体差などの色々の因子によつて惹起されたものであらうと考える事は、この問題の凡てではないが大部分を説明しているものと考えられる。

3) 伝音系障害と内耳液

伝音系障害時における内耳液の病態については我が教室の理化学的性状の病態の追究成績からも立証されている。

即ち、実験的急性中耳炎については三宅¹⁰⁵⁾ (1953) は屈折性物質の増量、中島¹¹⁵⁾ (1954) は pH の酸性への接近を報告し、吉川¹⁶⁶⁾ (1955) は犬による実験にて内耳液アミノ酸は遊離では Aspartic acid, Alanine が認められ、加水分解物中では Aspartic acid, Glutamic acid, Glycine, Alanine, Valine, Leucine, Phenylalanine が認められて、正常に比しアミノ酸の種類に差異はなかつたが、出現率では遊離のものには差異はなく、加水分解中のものでは Glycine, Alanine, Leucine, Phenylalanine はいずれも多くみられたと述べ、柴田¹⁴⁴⁾ (1956) は電気伝導度が大となることを報告している。

次に実験的耳管狭窄症においては、三宅¹⁰⁵⁾ (1953) は屈折性物質、中島¹¹⁵⁾ (1954) は pH について実験的急性中耳炎と同様な傾向を認める事を報告し、吉川¹⁶⁶⁾ (1955) は正常に比してアミノ酸の種類には差異なかつたが出現率では遊離のものには差異なく加水分解中のものにおいて Glycine, Alanine は多く、Valine, Leucine は少いが、中耳腔に変化の大なるものでは、特に加水分解物中のものにおいてアミノ酸の出現率、斑点の濃度は夫々対照に比して同等かそれ以上に認められたと述べ、柴田¹⁴⁴⁾ (1956) は同様電気伝導度が大となる事を報告している。

しかしてこれらの実験成績はいずれも外リンパについてのものであるが、耳管狭窄において急性中耳炎と平行した内耳液病態を見る事は、私の実験成績と同様の傾向であり、耳管狭窄と急性中耳炎の間に何らかの相関性の存在を思わしむるものである。

又外リンパのアミノ酸が上述の如き病態をきたす事は私の実験において蛋白質に変動をきたし、内耳代謝障害の存在を考え得る事から理解されるが、蛋白質の動的平衡の立場からその構成アミノ酸の意義は重大であり、内耳蛋白質代謝を考える上において不可欠である。

かくの如く中耳伝音系障害時に外リンパにおける蛋白質の増量を基本的変化とした内耳伝音系の病態を認めたが、内耳毛細血管の拡張及びそれに伴う透過性昇進を主たる原因としていられる蛋白質のこれらの変化は、内耳液の滲透圧を増大せしめ、音響インピーダンスの増大と共に基礎膜に対する振動圧を小ならしめて、伝

音障害の一因子となりうるものと考ええる。即ち中耳伝音障害時の難聴の主体は中耳にあるとは言え、内耳液もこれに関与して内耳液伝音障害をきたし得ると言う事に一つの根拠を得たものと考ええる。

第6章 結 語

実験的伝音系障害時の内耳液について、その総蛋白量並びに蛋白質分割を測定した。

1) 実験的急性中耳炎海猿の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量は24時間後では、それぞれ $29 \pm 2.1 \text{mg/dl}$, $115 \pm 9.9 \text{mg/dl}$, $20 \pm 1.9 \text{mg/dl}$, $4420 \pm 231 \text{mg/dl}$ であり、5日後ではそれぞれ $27 \pm 2.3 \text{mg/dl}$, $121 \pm 8.0 \text{mg/dl}$, $22 \pm 2.6 \text{mg/dl}$, $4270 \pm 346 \text{mg/dl}$ であつて、中耳炎惹起後24時間にして既に内耳液総蛋白量に変動を認め、5日後においても変動の状態が維持されている。しかしてこの総蛋白量の変動は内、外リンパ、特に外リンパにおける増大であり、髄液、血清においては殆んど変動は見られない。

2) 上記動物の蛋白質分割は、24時間後における内リンパの Al, α , β , γ -GI 値はそれぞれ 55.0, 7.7, 9.1, 28.2% であり、外リンパでは 49.6, 15.0, 16.7, 18.7%, 髄液では 53.0, 16.0, 18.2, 12.8%, 血清の Al, α_1 , α_2 , β , γ -GI 値はそれぞれ 50.6, 11.0, 9.3, 13.9, 15.2% であり、5日後においては内リンパ 55.2, 9.8, 6.3, 28.7%, 外リンパ 47.9, 16.0, 14.9, 21.2%, 髄液 52.7, 15.8, 17.3, 14.2%, 血清 49.7, 12.4, 8.1, 13.6, 16.2% であり、内、外リンパの A/G はいずれも小となつてゐるが、その変動は外リンパにおいて特に著明である。なお変動の程度の時間的關係は総蛋白量の場合と同様5日後においても変動の状態が維持されている。

各分割の蛋白質絶対量を見ると、24時間、5日のもの共に同傾向を示し、内リンパにおいては γ -GI, 外リンパにおいては各分割いずれも増量を示す事は、内リンパの特殊性、特に γ -GI との関連においてその特殊性を示すものと考ええる。

3) 実験的耳管狭窄症海猿の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量はそれぞれ $28 \pm 3.6 \text{mg/dl}$, $89 \pm 7.5 \text{mg/dl}$, $22 \pm 2.7 \text{mg/dl}$, $4120 \pm 213 \text{mg/dl}$ であり、特に外リンパにおける増大の傾向が認められる。

4) 以上の如く実験的に惹起せしめた急性中耳炎及び耳管狭窄症動物の内耳液蛋白質に同一傾向の病態を認め、中耳伝音系障害時における内耳液の変化が証明できた。しかしてこの変化は特に外リンパの総蛋白量の増量として著明である。従つてこのような変化に基く内耳液

の滲透圧増加、音響 impedance の増大、更には基礎膜に対する振動圧の減少などは伝音障害の一要因たり得るものであり、中耳伝音障害時の難聴の主体は中耳にある

とは言え、内耳液もこれに関与して内耳液伝音障害をきたし得る可能性の一つを示唆するものである。

第4編 実験的感音系障害時の内耳液蛋白質に関する研究

第1章 緒 言

前編において私は、中耳性疾患の際に内耳液が種々の病態を呈する事を述べたが、感音系疾患においても同様に内耳液の病変が見られるや否やは甚だ興味あるところである。しかしてこの際もし変化ありとすればそれがいかなる種類、程度の変化であり、またそれがいかなる機転にもとづくものであるかを知ることは、内耳性難聴の成立機構乃至は治療学上重要な意義を有する問題である。

こゝにおいて私は特に内耳液の蛋白質が実験的感音系障害時にいかに変化するかを調べ、従来殆んど未知なる感音系難聴と内耳蛋白質代謝との関連に対する基礎的課題にいさゝか知見を得んとしたものである。

しかして実験的な感音系障害の惹起には、i) 音響性 ii) アレルギー性を用い、その他 Reilly 現象や、肝、腎障害時の内耳液蛋白質の変動についても追究した。

第2章 実験材料

第1節 実験動物

動物実験材料としては第1編に述べたと同様の海狸を使用した。

第2節 被検液採取法

被検液採取法としては第1編に述べたと同様の方法を使用した。

第3章 実験方法

第1節 音響性聴器障害惹起法

自家製純音発生器を使用し、1500cps, 90db の音響を1日12時間宛30日間作用せしめた。

第2節 アレルギー性聴器障害惹起法

無菌的操作により生理的食塩水10倍卵白溶液を作成し、0.2cc を前感作として海狸腹壁皮下に注射し、3日間隔に6～7回注射を行うと局所に Arthus 現象が発生する。最後の注射から10日後に同一卵白溶液0.2cc を経鼓膜的に右中耳腔に注入した。なお左中耳腔には生理的食塩水を注入して対照の一群を作った。

第3節 Reilly 現象惹起法

Speransky の用いた実験方法¹²⁸⁾を応用した。即ち

クロトン油をオリーブ油によつて1/100に稀釈し、1/2 mm の注射針をツベルクリン用注射器に附して、海狸の口蓋粘膜に水泡を作るように1/10cc 注射し、注射後30分及び1時間の群について CRP の測定を行つた。なお何等操作を施さない健康な海狸よりエーテル麻酔下に第1編に述べた如き方法で内耳液を採取し、対照とした。

CRP 測定法

C-reactive protein (CRP) test には DIFCO LABORATORIES の Bacto C-protein antiserum を使用し、前記海狸の内、外リンパ、髄液及び血清について実験を行つた。但し内、外リンパ及び髄液は蛋白質濃度が小であるので第2編で述べた Mies 氏法の改良法で濃縮を行つた後測定に供した。

CRP の測定法としては、一般に Anderson, Mc Carthy 及び Swift による capillary precipitin method、即ち毛細管を用いて患者血清と抗血清とを接触、反応させ、一定時間後生じた沈澱をみる方法が用いられている。

即ち内径0.7乃至1mm、長さ75乃至90mmの毛細管に、抗血清を長さ25乃至30mm 吸い上げ、次に被検血清を同じ長さだけ吸いあげて両者を接触させ、中央部に移動せしめる。この毛細管を37°C 恒温槽で2時間反応させ、ついで氷室(0～6°C)に一夜放置した後判定する。その判定の標準は、沈澱の全くないものを(－)、沈澱1mmのものを(＋)、2mmのものを(++)、3mmのものを(+++)とする。

しかし乍ら私の実験の場合は被検液たる内耳液の量が極めて微量であるため、測定並びに判定法については少しく変更した。即ち硝子毛細管としては内径0.02乃至0.05mmのものを作成し、これに Antiserum 及び試料をそれぞれ1mm 宛吸引し、上記の如く接触、反応せしめた後、拡大鏡下に判定したのである。しかして沈澱の全くないものを(－)、沈澱が認められるが判然としなないものを(±)、沈澱の認められるものを(＋)とした。

第4節 肝、腎障害惹起法

肝障害には四塩化炭素を、腎障害には昇汞もしくはク

ロム酸カリを使用した。

四塩化炭素は局所の炎症と疼痛を避ける目的でオリーブ油を10%の割合に混和せしめ、海猿に prokg 0.1cc を3日毎に3回大腿内側皮下に注射し、注射終了後10日間飼育した。

昇汞は0.1%水溶液を海猿に prokg 1cc を3日毎に3回、クロム酸カリは1%水溶液を prokg 1cc 宛3日毎に3回大腿内側皮下に注射し、注射終了後3週間飼育した。

なお肝、腎障害の証明は組織学的検索によった。

第5節 総蛋白量測定法

総蛋白量測定法は第1編において述べた通りである。

第6節 蛋白質分劃測定法

蛋白質分劃測定法は第2編において述べた通りである。

第4章 実験成績

第1節 音響性聴器障害

前述の如き条件により音響を負荷した海猿の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量並びに蛋白質分劃は第44、45表の如くである。

なおプライエール氏耳介反射は一般に減弱の傾向が認められた。

しかして蛋白質分劃の測定には、各試料について各群共第2篇、第4章、第1節において述べたものと同数の海猿を使用した。

第44表 音響障害海猿の総蛋白量

内リンパ		外リンパ		髄液		血清	
No.		No.		No.		No.	
999	12	999	50	1005	16	999	3310
1000	25	1000	83	1006	28	1000	4320
1002	17	1001	54	1008	17	1002	4180
1003	23	1002	58	1009	22	1003	4830
1004	15	1004	60	1011	19	1004	3250
18 ± 2.4		61 ± 5.8		20 ± 2.2		3980 ± 304	

即ちその総蛋白量については、内リンパの総蛋白量は12~25mg/dl、平均値 18 ± 2.4mg/dl、外リンパでは50~83mg/dl、平均値 61 ± 5.8mg/dl となり、内、外リンパ共に正常値より若干減少の傾向が認められる。

次に髄液の総蛋白量は16~28mg/dl、平均値 20 ± 2.2mg/dl となり、正常値に比べてその変動は極めて僅かである。又血清のそれは3250~4830mg/dl、平均値 3980 ± 304mg/dl となり、正常値と著差を認めない。

第45表 音響障害海猿の蛋白質分劃

試料群		分割%	Al	d	β	γ-G	A/G	
内リンパ	32		56.9	5.9	13.9	23.3	1.32	
	33		58.2	11.3	9.3	21.2	1.39	
	平均		57.6	8.6	11.6	22.2	1.36	
外リンパ	34		54.8	15.4	12.3	17.5	1.21	
	35		53.5	8.8	20.4	17.3	1.14	
	36		54.9	16.2	15.5	13.4	1.22	
平均		54.4	13.5	16.1	16.0	1.19		
髄液	37		52.8	17.5	15.5	14.2	1.12	
	38		55.8	14.9	13.4	15.9	1.26	
	39		53.9	14.5	16.3	15.3	1.17	
平均		54.2	15.6	15.1	15.1	1.17		
試料No.		分割%	Al	d ₁	d ₂	β	γ-G	A/G
血清	786	前	52.7	4.2	12.1	15.8	15.2	1.11
		後	50.8	5.9	10.3	15.7	17.3	1.03
	806		47.5	9.1	14.3	9.3	19.8	0.90
			45.3	11.0	14.2	11.3	18.2	0.83
	829		47.1	10.5	9.2	10.5	22.7	0.89
			45.5	12.5	8.8	9.1	24.1	0.83
	846		49.5	14.1	7.2	14.3	14.9	0.98
			48.5	12.3	9.3	13.7	16.2	0.94
	866		52.2	9.5	14.1	13.1	11.1	1.09
			52.7	10.0	15.3	10.7	11.3	1.11
	平均		49.8	9.5	11.4	12.6	16.7	0.99
	平均		48.6	10.3	11.6	12.1	17.4	0.95

第46表 音響障害海猿の蛋白質

試料		分劃	Al	α	β	γ-G
内リンパ	mg/dl		57.6%	8.6%	11.6%	22.2%
	18		(10.4)	(1.5)	(2.1)	(4.0)
外リンパ	mg/dl		54.4%	13.5%	16.1%	16.0%
	61		(33.2)	(8.3)	(9.8)	(9.7)
髄液	mg/dl		54.2%	15.6%	15.1%	15.1%
	20		(10.9)	(3.1)	(3.0)	(3.0)

試料		分劃	Al	α ₁	α ₂	β	γ-G
血清	mg/dl		48.6%	10.3%	11.6%	12.1%	17.4%
	3980		(1934.3)	(409.9)	(461.7)	(481.6)	(692.5)

() 内mg/dl

次に蛋白質分劃についてみると、内、外リンパ及び髄液は Al, α, β, γ-GI, 血清は Al, α₁, α₂, β, γ-GI の各分劃を認め得る事は正常時と変りない。又その A/G は内リンパは1.36、外リンパは1.19、髄液は1.17、血清は0.95であり、更に各群あるいは No. 別に見ても個体差があるが、正常値と著差は無い。

血清では音響負荷前と負荷後において、その各分劃に著差を見ない。

第2節 アレルギー性聴器障害

前述の如き方法でアレルギー性聴器障害を惹起せしめた海猿の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量を測定すると第47表の如くである。

なおブライエル氏耳介反射は一般に減弱の傾向が認められた。

第47表 アレルギー性聴器障害海猿の総蛋白量

(mg/dl)									
内リンパ		外リンパ		髄液		血清		対 照	
N.O.		N.O.		N.O.		N.O.		N.O.	
925	17	925	123	932	17	925	3350	925	22
928								928	925
930	13	926	55	933	22	926	4630	930	19
932								932	926
935	28	927	108	935	18	928	3940	935	25
937								937	927
939	34	929	111	936	23	930	4420	939	28
940								940	929
941	22	930	59	937	21	931	4910	941	26
943								943	930
23±3.8		91±14.2		20±1.2		4190±273		24±1.6	
								79±3.7	

即ち内リンパの総蛋白量は 13～34mg/dl, 平均値は 23±3.8mg/dl, 外リンパでは 55～123mg/dl, 平均値は 91±14.2mg/dl となり、共にその変動範囲は大であり、その変動の状態に一定の傾向を認めない。

次に全身アレルギーとの関係、内耳窓の透過膜としての機能などを知らんがために対照群について行つた実験成績では、内リンパでは 19～28mg/dl, 平均値は 24±1.6mg/dl, 外リンパでは 71～92mg/dl, 平均値は 79±3.7mg/dl でいずれも正常値の変動範囲を越えない。

次に髄液の総蛋白量は 17～23mg/dl, 平均値は 20±1.2mg/dl, 血清では 3350～4910mg/dl, 平均値は 4190±273mg/dl でいずれも正常値の変動範囲を越えない。

第3節 Reilly 現象

前述の如き方法で海猿の口蓋刺戟を行うと、約30分乃至1時間経過すると海猿のあるものはショック症状を呈するので、それについて内、外リンパ、髄液及び血清のCRPを測定して第48表の如き成績を得た。

なおブライエル氏耳介反射は一般に減弱の傾向が認められた。

しかして各群共、海猿3匹宛を使用した。

即ち対照群においてはCRPは、内、外リンパ、髄

第48表 CRP 測定成績（海猿）

試料		内リンパ	外リンパ	髄液	血清
対照群	56	—	—	—	—
	57	—	—	—	—
	58	—	—	—	—
クロトン油注射後30分	59	—	—	—	—
	60	—	—	—	—
	61	—	—	—	—
	62	+	+	+	+
	63	—	—	—	+
油注射後1時間	64	—	—	—	—
	65	+	+	+	+
	66	—	—	—	+
	67	+	+	—	+
	68	—	—	—	+

液及び血清すべてに（—）であるが、クロトン油注射を受けた群では30分後に内、外リンパ、髄液及び血清共に（+）を示すものが5例中1例みられ、又血清にのみ（+）で他は（—）の1例もある。

しかして注射後1時間のものでは、内、外リンパ、髄液及び血清共に（+）を示す例が5例中2例あり、又血清の一部（+）を示し、他は（—）の例も2例ある。

第4節 肝、腎障害

肝、腎障害海猿の総蛋白量を示すと、四塩化炭素によるものは第49表、昇汞によるものは第50表、クロム酸カリによるものは第51表の如くである。

即ち四塩化炭素障害の海猿の内リンパは 16～32mg/dl, 平均値 24±2.8mg/dl, 外リンパは 51～72mg/dl, 平均値は 61±3.4mg/dl, 髄液は 13～28mg/dl, 平均値は

第49表 四塩化炭素障害海猿の総蛋白量

(mg/dl)							
内リンパ		外リンパ		髄液		血清	
N.O.		N.O.		N.O.		N.O.	
900	21	900	51	907	18	900	3820
902	28	901	72	908	15	902	5260
903	32	903	62	909	28	903	5130
904	16	904	59	911	19	904	4210
906	25	906	61	912	13	906	3150
24±2.8		61±3.4		19±2.6		4310±398	

第50表 昇汞障害海猿の総蛋白量

(mg/dl)							
内リンパ		外リンパ		髄液		血清	
N.O.		N.O.		N.O.		N.O.	
913	16	913	60	919	17	913	3760
914	23	915	71	921	25	914	3910
916	27	916	55	922	14	916	3320
917	28	917	58	923	12	917	3670
918	29	918	47	924	23	918	4110
25±2.4		58±3.9		18±2.5		3750±132	

第51表 クロム酸カリ障害海猿の総蛋白量

(mg/dl)					
内リンパ		外リンパ		血 清	
NO.		NO.		NO.	
1012	16	1012	58	1019	21
1013	20	1013	43	1020	18
1015	30	1014	78	1021	16
1016	24	1015	59	1023	14
1018	29	1018	69	1024	24
24 ± 2.7		61 ± 5.9		19 ± 1.8	
				3700 ± 173	

19 ± 2.6mg/dl, 血清は 3150 ~ 5260mg/dl 平均値は 4310 ± 398mg/dl, 昇汞障害例の内リンパは 16 ~ 29mg/dl, 平均値は 25 ± 2.4mg/dl, 外リンパは 47 ~ 71mg/dl. 平均値は 58 ± 3.9mg/dl, 髄液は 12 ~ 25mg/dl, 平均値は 18 ± 2.5mg/dl, 血清は 3320 ~ 4110mg/dl, 平均値は 3750 ± 132mg/dl となり. クロム酸カリ障害例の内リンパは 16 ~ 30mg/dl, 平均値は 24 ± 2.7mg/dl, 外リンパは 43 ~ 78mg/dl, 平均値は 61 ± 5.9mg/dl, 髄液は 14 ~ 24mg/dl, 平均値 19 ± 1.8mg/dl, 血清は 3120 ~ 4130mg/dl, 平均値は 3700 ± 173mg/dl となつてこれら三種の薬剤の障害例の総蛋白量は, 内リンパにおいてはほぼ正常値の変動範囲内にあるが, 外リンパにおいては減少の傾向が見られる. 又髄液においても減少の傾向が見られるが血清では後二者の薬剤の障害例において総蛋白量減少の傾向を見る.

第52表 四塩化炭素障害海猿の蛋白質分割

分割%		A1	α	β	γ-G	A/G
試料	群					
		NO.				
内リンパ	40	57.7	14.5	8.8	19.0	1.36
	41	58.3	9.2	15.2	17.3	1.40
	平均	58.0	11.9	12.0	18.1	1.38
外リンパ	42	51.2	9.2	15.3	24.3	1.05
	43	55.3	12.5	17.7	14.5	1.24
	44	51.0	18.3	12.1	18.6	1.04
	平均	52.5	13.3	15.0	19.2	1.11
髄液	45	50.7	16.8	19.2	13.3	1.03
	46	55.5	18.9	14.3	11.3	1.25
	47	50.8	10.6	17.8	20.8	1.03
	平均	52.3	15.4	17.1	15.2	1.09
試料	群					
		NO.				
血	前	47.8	9.3	10.5	17.3	15.1
	後	42.3	12.2	9.8	14.4	21.3
	581	50.2	15.3	8.2	15.2	11.1
		46.3	14.4	6.3	11.5	21.5
	601	50.3	11.3	8.2	10.3	19.9
		54.2	9.0	10.2	9.3	17.3
	621	48.3	8.2	9.3	15.2	19.0
		43.5	6.7	11.3	16.2	22.3
	641	54.2	9.8	9.1	13.2	13.7
		48.3	16.2	7.2	10.3	18.0
清	平均	50.2	10.8	9.1	14.2	15.7
		46.9	11.7	9.0	12.3	20.1

次に蛋白質分割については四塩化炭素によるものは第52表, 昇汞によるものは第53表の如くなり, 各分割の絶対量については四塩化炭素によるものは第54表, 昇汞によるものは第55表の如くなる.

しかして蛋白質分割の測定には, 各試料について各群共第2編, 第4章, 第1節において述べたものと同数の海猿を使用した.

即ち蛋白質分割は四塩化炭素, 昇汞いずれの障害においても内, 外リンパ及び髄液においては A1 α, β, γ-GI 各分割を認め, 血清においては A1, α₁, α₂, β, γ-GI の

第53表 昇汞障害海猿の蛋白質分割

分割%		A1	α	β	γ-G	A/G
試料	群					
		NO.				
内リンパ	48	57.7	10.3	13.2	18.8	1.36
	49	58.8	8.9	11.7	20.6	1.43
	平均	58.3	9.6	12.4	19.7	1.39
外リンパ	50	54.3	12.2	19.3	14.2	1.19
	51	51.7	15.5	15.2	17.6	1.07
	52	51.3	14.2	16.2	18.3	1.05
	平均	52.4	14.0	16.7	16.9	1.10
髄液	53	50.3	15.4	20.1	14.2	1.01
	54	58.2	10.7	18.7	12.4	1.39
	55	49.7	12.5	18.1	19.7	0.99
	平均	52.7	12.9	19.0	15.4	1.11
試料	群					
		NO.				
血	前	47.2	12.8	11.7	13.5	14.8
	後	43.7	13.9	11.8	9.3	21.3
	671	48.2	10.5	10.1	14.5	16.7
		45.3	15.2	9.8	12.5	17.2
	691	53.2	9.2	10.3	11.5	15.8
		49.2	10.3	11.2	13.0	16.3
	711	47.8	10.2	12.3	15.7	14.0
		42.8	15.5	14.1	11.3	16.3
	751	48.5	12.3	9.2	16.3	13.7
		44.3	12.7	10.2	14.5	18.3
清	平均	49.0	11.0	10.7	14.3	15.0
		45.1	13.5	11.4	12.1	17.9

第54表 四塩化炭素障害海猿の蛋白質

分割		A1	α	β	γ-G
試料	群				
		mg/dl			
内リンパ	24	58.0%	11.9%	12.0%	18.1%
		(13.9)	(2.9)	(2.9)	(4.3)
外リンパ	61	52.5	13.3	15.0	19.2
		(32.0)	(8.1)	(9.1)	(11.8)
髄液	19	52.3	15.4	17.1	15.2
		(9.9)	(2.9)	(3.2)	(3.0)

分割		A1	α	β	γ-G
試料	群				
		mg/dl			
血清	4310	46.9%	11.7%	9.0%	12.3%
		(2021.4)	(504.3)	(387.9)	(530.1)

() 内mg/dl

第55表 昇汞障害海狸の蛋白質

試料	総蛋白量	分割	A1	α	β	γ -G
内リンパ	25	mg/dl	58.3% (14.6)	9.6% (2.4)	12.4% (3.1)	19.7% (4.9)
外リンパ	58	mg/dl	52.4 (30.4)	14.0 (8.1)	16.7 (9.7)	16.9 (9.8)
髄液	18	mg/dl	52.7 (9.5)	12.9 (2.3)	19.0 (3.4)	15.4 (2.8)

試料	総蛋白量	分割	A1	α 1	α 2	β	γ -G
血清	3750	mg/dl	45.1% (1691.3)	13.5% (506.3)	11.4% (427.5)	12.1% (453.8)	17.9% (671.1)

() 内 mg/dl

各分割を認めて正常時との差異は見られない。また A/G は、四塩化炭素障害例では内リンパは 1.38, 外リンパは 1.11, 髄液は 1.09, 血清は 0.88 となり昇汞障害例では内リンパは 1.39, 外リンパは 1.10, 髄液は 1.11, [血清は 0.82 となる。しかし四塩化炭素障害例の内リンパの A/G の変動は極めて小さいが、外リンパは 3 例中 2 例、髄液も 3 例中 2 例に A/G の減少の傾向を認め、共にこの 1 例は正常値と殆んど同一である。血清では薬剤使用前後の A/G の比較よりして、5 例中 4 例に減少、のこり 1 例に増大の傾向を見た。

次に昇汞障害例では内リンパの A/G の変動は四塩化炭素障害例と同様に小であるが、外リンパでは 3 例中 2 例に、髄液では 3 例中 2 例に減少、他の 1 例に増大の傾向を見、血清ではすべてに減少の傾向を見る。

次に四塩化炭素及び昇汞障害例の蛋白質分割の絶対値 (mg/dl) は総蛋白量及び分割がいずれも平均値であるために正常値と比べて変動の程度は小さい。

しかし内、外リンパ、髄液及び血清の各分割 (%) の増減は各群及び No. において一定の傾向を見ない。

各薬剤による肝、腎障害の証明をするために肝、腎の組織学的検索を行った。

a) 肝の病理組織学的所見

四塩化炭素投与例では、肝小葉の細胞配列が乱れ、中心性壊死並びに脂肪変性像を認め、退行変性の像を示している。(第8図)

他の二薬剤投与例ではその変化は著明でない。

b) 腎の病理組織学的所見

クロム酸カリ投与例では腎炎の所見を示す。即ち細尿管主部より移行部まで濁潤腫脹、好中球浸潤あり、又硝子様変性を呈せる部もある。糸球体にも上記の如き変化

を認める。(第9図)

昇汞投与例では糸球体はバウマン嚢上皮細胞の腫脹を

第8図 四塩化炭素障害肝

第9図 クロム酸カリ障害腎

第10図 昇汞障害腎

見るが嚢壁自体としては著変なく、細尿管部にクロム酸カリと同様の变化を見るがそれは変性を主としており、炎症所見をみない。(第10図)

四塩化炭素投与例ではこの変化は少い

第5章 総括及び考按

1) 音響性障害時の内耳液蛋白質について

1500cps. 90db の音響を 1 日 12 時間宛 30 日間作用せしめてその内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量及び

蛋白質分割の測定を行い、内、外リンパに次の如き変化をきたす事を知つた。

即ちこの程度の音響負荷にては総蛋白量については、内、外リンパは正常値より若干減少の傾向が見られるが、髄液、血清は正常値と著差を認めない。又蛋白質分割(%)は内、外リンパ、髄液及び血清共に正常時と著差はない。従つて各分割の蛋白質絶対量も正常時と比べて著変は見られないという成績である。

扱て強い音響作用によつて聴器の蒙る影響について関心がもたれたのは相当古い時代であつたが、その系統的な研究は比較的新しい問題である。しかしてこのような特に内耳の音響性障害の生化学的並びに組織化学的追究は極めて新らしく、特に蛋白質に関連した業績について概観するに、Hamberger & Hyden⁴⁵⁾ (1945), Hambrger, Hyden & Nilsson⁴⁶⁾ (1949), Hammer⁴⁷⁾ (1956, 1957), 森¹¹¹⁾ (1959), 片桐及び大橋⁷²⁾ (1959)らは騒音曝露時の内耳組織内核酸の変動の状態を追究している。更に教室の滝本¹⁵¹⁾ (1959)はCorti氏器細胞の核酸を研究して、音響刺激によつて外有毛細胞、Deiter氏細胞には著明な変化を示す核は少く、特にDeiter氏細胞に関してはDHSM注射時の所見と比較すると音響刺激にかなりの抵抗すると思はれると述べ、更に音響刺激により聴器の初期障害が予想される場合には4～8時間迄が障害からの恢復に対して最も重要な時間であると結論している。また水越¹¹⁰⁾ (1956)は音響刺激に対する聴中枢神経細胞内PNAの態度について増加の可能性があるとして述べ、神経細胞においてはPNAが機能上重要な関連性を有する事を組織化学的に立証したとしており、宇野¹⁵⁴⁾ (1958)は蝸牛神経中枢の核酸成分を紫外線吸収性より追究し、音響刺激による258m μ における吸光度の変化を求め、刺激が加われば中枢部のプリン・ピリミジン物質は一応増加し、刺激が強度になれば減少方向を示すと述べ更に音響刺激により細胞内RNAは一過性の増加の後減少するが、仁の吸収性の低下は立証できないと論じている。また水越¹⁰⁹⁾ (1960)はRNAを検出する事により内リンパの蛋白質合成能力は蝸牛内では血管条において営まれるものと考え、更に膜蝸牛アミノ酸をペーパークロマトグラフ法によつて分析し、音響刺激によりTyrosine, Cystine, Methionine, が増量し、刺激が高度となれば減少すると報告している。

かくして音響刺激により内耳末梢並びに中枢の核蛋白質に変動が齎られる事が明らかとなつたが、蛋白質合

成に対する核酸の意義については、Jeener⁶⁷⁾ (1953), Hinshelwood⁶¹⁾ (1950), Gale⁶⁷⁾ (1955)らの研究により細胞の蛋白質合成機構を順調に営ましめる事に対する核酸、特にRNAの意義が追究されたが、音響刺激による上述の如き内耳の核蛋白質の変動よりして内耳液の蛋白質にも変動の齎られる事は当然予想される所である。

次に内耳液もしくは髄液の性状の音響負荷による影響の有無について見るに、すべて我が教室の業績のみであり、三宅¹⁰⁵⁾ (1953)は1500cps 90dbの音響を毎日12時間作用せしめた家兎に聴性瞳孔反応低下に伴なつて髄液屈折性物質の減少傾向を認め、伊藤⁶³⁾ (1954)は三宅と同条件で音響を作用せしめた家兎の内耳液、髄液のアミラーゼは、共に正常動物のそれに比較して殆んど変動が認められなかつたと報告している。更にまた吉川¹⁶⁶⁾ (1955)は高音作用後の家兎外リンパ中の遊離、加水分解物中アミノ酸は共に減少するものが多かつたが、低音作用後では、遊離のものは殆んど変動なきに反し、加水分解物中のものには軽度ながら減少の傾向を認めたと報告している。この内耳液のアミノ酸平衡の障害は上記の核酸の病態と関連して内耳蛋白質平衡障害の一環をなすものである。また柴田¹⁴⁴⁾ (1956)は1500cps 90dbの音響を18日間、35日間作用せしめた海狸の内耳液電気伝導度を測定し、18日において既に高い値をとるが、35日においては更に高くなる事を報告し、加藤⁷⁸⁾ (1960)は3000cps 90dbの音刺激を与えた場合の海狸内耳液のコリエステラーゼの変化を追究している。

このように音響刺激により内耳液及び髄液に物理化学的性状の変化が occuri、内耳代謝障害の存在に伴う内耳液病態が存する事を見たが、特にアミノ酸の障害の存在よりして内耳液蛋白質代謝障害の存在が想定され、前述の内耳核蛋白質の病態及び私の内耳液蛋白質の変動から考えてもこの事は充分予想されるのである。

しかして私の実験成績による内、外リンパの蛋白質の病態は、前述の内耳血管条をも含めた内耳核蛋白質の異常も要因の一部とする内耳蛋白質代謝の異常に基くものと考え、髄液及び血清の測定成績からしても全身的影響は否定されるので、その総蛋白量の減少が蛋白質産生の障害に基くものか、産生後の消耗あるいは破壊の増大に基くものか、また産生は正常でその消耗、破壊の増大に基くものかそのいずれによるかを考えても、それを明らかに説明し得る資料を有しない。しかし蛋白質分割に明らかな変動が認められない事は、本実験におい

ては免疫体が特別には関係しない事もその一因である。

かゝる内、外リンパの変動は内耳代謝障害に因るものである事は勿論であるが、前述の伝音系障害時とその総蛋白量が対蹠的である。

しかして内耳液の変動が他の体液に比して著明であることから、内耳液の性状の病態は、選択的に聴器を障害する音響作用による聴器障害の結果として理解される。

2) アレルギー時の内耳液蛋白質について

卵白溶液により海狸にアレルギー状態を惹起させた場合の内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量を測定して、内、外リンパにその変化をきたす事を知つた。

即ち内、外リンパの総蛋白量は一定の傾向を有せず、その増大するものと減少するものがある。又対照群については内、外リンパの総蛋白量は正常値の変動範囲内に留つてゐる事が分つた。なお髄液及び血清の総蛋白量も正常値の変動範囲を越えないという成績を得た。

扱て原因不明の所謂内耳性難聴がなお多くの不明な点を残している現在、アレルギーあるいは過敏症において聴器病変が惹起されるという従来の研究よりしても、特異なアレルギー疾患又は過敏症として発現しないアレルギー状態においても聴器病変が発生するのではないかという事が想像せられる。私はこのような想定より、先ず卵白アレルギー動物における内耳液蛋白質の変動を検索し、上記の如き結果を得たのである。

アレルギー時の内耳液の理化学的性状にいかなる病態が見られるかについての研究は当教室において既に数多く行われている。

即ち三宅¹⁰⁵⁾ (1953) は BCG アレルギーにより内耳液及び髄液における屈折性物質の減少を認め、聴性瞳孔反応及び廻転後眼震により聴覚の低下を観察し、中島¹¹⁵⁾ (1954) は BCG による結核アレルギーにより内耳液及び髄液がアルカリ性に傾く事を述べ、伊藤⁶³⁾ (1954) は BCG による結核並びに卵白アレルギー動物の内耳液及び髄液のカタラーゼ及びアミラーゼの消長について検索を行つている。また吉川¹⁶⁶⁾ (1955) は BCG 注射家兎の内耳液アミノ酸は、注射1週後は遊離、加水分解物中アミノ酸は共に減少の傾向にあり、特に加水分解物中のものは総てのアミノ酸に減少が認められ、2週後は遊離加水分解物中のものに共にアミノ酸の出現が正常よりよいものが多く、3週後は遊離のものは増加と減少のものゝあつたが、加水分解物中のものは殆んど減少していた。4週後は加水分解物中のものは増加と減少

とを示すものがあつたと報告している。また大島¹¹⁹⁾ (1956) はその沈降反応を卵白アレルギー、BCG 並びに結核菌体成分接種などアレルギーの立場より検討し、柴田¹⁴⁴⁾ (1956) は卵白及び結核アレルギー家兎の内耳液電気伝導度が正常に比し高値をとる事を認め、森¹¹²⁾ (1954) は BCG 接種家兎の髄液の焦性葡萄糖は、1週、4週共に著明に増量し、2ヵ月後には健康の範囲に復する事を認めている。

即ちこのような物理化学的性状の検索よりして内耳代謝障害の存在する事が考えられ、特にアミノ酸の変動は蛋白質代謝障害の存在を想定せしめるものである。

毛細血管壁の透過性と内耳液蛋白質の関係については今迄度々述べた所であるが、アレルギー時に毛細血管が拡張して管壁の透過性の増大する事は周知の事実である。しかしてアレルギー時の内耳毛細血管、特に内リンパ腔壁の中でも血管条、更には外リンパ腔壁血管の透過性増大が内、外リンパの総蛋白量と密接な関係を有していると考えられる。しかして内、外リンパ共にその総蛋白量の傾向が一定でない事は、その動物の個体差に基く所のアレルギーに対する血管の反応差、更にはその反応の時間的消長の差に基くものと考えられる。教室の日比野⁶⁴⁾ (1955) は BCG アレルギー時に血管条の組織呼吸が低下する事を報告しているが、この事からも中耳の局所アレルギーによる内耳病変、特に血管に対する影響の存在を想定せしめる。

次に惹起抗原に対する中耳のアレルギー性変化が内耳に波及する経路を考察すると、本杉¹¹⁸⁾ (1959) は内耳に臓器選択を示した中耳アレルギーに基く全身アレルギーの一分症、中耳の局所アレルギーの内耳への波及並びに中耳腔に注入した液体が直接内耳液に変化を与えるなど色々考えられるとし、小出⁸²⁾ (1955) の言う家兎の鼓室の灌流実験の結果を引用し、卵白アルブミンと内耳液の間にこれに類似した変化の起る事を想定している。また追川¹¹⁸⁾ (1959) は抗原注入を行わない他側内耳の組織所見が正常像である事から、内耳に起つたアレルギー性病変はその全身アレルギーの一分症として内耳に臓器選択が行われたものではないと考えている。

私の実験においても対照耳の内、外リンパに総蛋白量の変動が認められないので、全身アレルギーの一分症でない事は明らかである。しかして中耳局所アレルギーがその主体をなすと考えるが、内耳への侵入経路としては、中耳炎時と同様に蝸牛窓がその可能性最大であり、ここを経て伝つたものが内耳病変を惹起するのでは

ないかと考える。

3) Reilly 現象と内耳液の CRP

Reilly 現象と内耳液の CRP の関係を知るために、クロトン油を海狸の口蓋に注射してショック症状を惹起させ、注射後 30 分及び 1 時間の内、外リンパ、髄液及び血清の CRP を測定した。

即ち对照群においては CRP はすべてに (—) であるが、注射後 30 分のものには内、外リンパ、髄液及び血清共に (+) を示すものが 5 例中 1 例見られ、1 時間のものでは 5 例中 2 例見られた。

扱て生体が外界から刺激を受けた場合、それに対処するために色々の反応を起すが、現代の医学はその発病因子として生体外のものだけでなく、更に生体側における物理的、化学的、細菌学的、あるいは精神的作用因子に対する反応の問題が重要視されるに至つた。しかし 1929 年の Cannon の Homeostasis の概念提唱、1934 年以後の Reilly 並に 1936 年以後の Selye の学説、即ち自律神経反射を主体とした生体反応のあり方についての Reilly 現象、即ち自律神経刺激擾乱症候群と、stress に対する下垂体副腎系の反応を主体とする適応症候群の考え方が最近漸次導入されているが、更に Speransky は神経デストロフィー説を、Laborit は侵襲後の生体反応体系について更に広範な研究を行つた。自律神経と聴器との関係については、既に 1885 年 S. Istamamow は音響が自律神経に及ぼす影響について観察を行つている。その後メニエル氏症候群の概念における自律神経と内耳との関係に関する観察が多いが、これについては polizer¹²³⁾ (1908), Lermoyez⁹¹⁾ (1919), Kobrak⁷⁰⁾ (1922), Brunner¹⁷⁾ (1925), Portmann¹²⁵⁾ (1930) らの論説があり、頸部交感神経と聴力との問題については、Ferri³³⁾ (1903), Fasse (1948), 河田⁷⁴⁾ (1955), 秋山⁸⁾ (1955) らの研究がある。また小出⁸⁴⁾ (1957) は内耳の糖代謝の方面よりの研究にて迷路性眩暈の原因としてストレスによる内耳代謝平衡の失調を考えている。

自律神経と聴力との関係については、河田⁷⁴⁾ (1955) は交感緊張により聴力低下をきたす事を述べ、秋山⁸⁾ (1955) は家兎の頸部交感神経切除を行つてその側の内耳の血管拡張、末梢感覚器の膨脹像を見、健康な迷路の構造と機能とは交感神経と副交感神経の平衡の上に立つ事を示唆するものであると述べている。安達⁹⁾ (1956) もかゝる問題について研究し、自律神経作用薬剤の効果について論じているが、岩田⁶⁶⁾ (1958) は交感神経緊

張により聴力低下、副交感神経緊張により増進する事は一般に信ぜられているが、これは血管の収縮、拡張が起る事にのみ起因するのではなく、収縮拡張による刺激が高位中枢、延いては肝臓、脳下垂体、副腎などの機能変化を招来し、生体反応のあり方の変化に基く聴覚の変動を考慮に入れるのが妥当と考えると述べている。しかしこの岩田の考えは従来のこれに関する諸説を綜合整理しており、最も妥当で理解に容易な論説である。

次に鈴木¹⁴⁶⁾ (1958) は扁桃摘時のショックが自律神経遮断剤を使用する事により阻止できる事を述べ、飯田⁶²⁾ (1958) は実験的に海狸の口蓋粘膜下にクロトン油を注射する事によりショック症状を惹起させてその病理組織学的検索を行い、肺、肝、腎、副腎の所見は一般に循環系の変化を主としており、これに退行性変化が加わつた像を呈していると述べている。更に深沢⁶⁰⁾ (1958) も同様な方法で海狸にショック症状を惹起させ、クロールプロマジンの使用によりこれを予防し得る事を述べている。更に西端、鈴木¹⁴⁶⁾ ら (1960) は同様な方法により実験的にショックを誘発又は阻止せしめ、更に組織学的検索を行つて、我科領域のショック並びに頸部自律神経系の有する意義について検討している。又、L. G. Chevance かも海狸の口蓋粘膜下にクロトン油を注射する事によりショックを誘発せしめ、その際の外リンパのアミノ酸¹⁰⁾ (1958)、並びに CRP⁵⁰⁾ (1959) を追究している。

Reilly 現象に基く血管運動性障害は、最初は交感緊張による血管収縮を起し、次いで毛細管拡張、更には透過性昂進のために間質の浮腫をきたすと言う。内耳の毛細血管透過性については、その蝸牛における血管の解剖と生理を基にして説明されてきたが、C. A. Smith¹³⁶⁾ (1954), Agazzi¹⁾ らによつて蝸牛血管の機能的解剖の研究があり、輸入血管系と輸出血管系の間に主として血管条に広くて複雑な Capillary bed が存在し、急激な動脈緊張変化に対して起る所の蝸牛の擾乱を防ぐと言う事の可能性を論じている。しかしこの bed の動静脈 Shunt と intraarterial pad に富む事の血流調節に対する意義は大である。

しかしかゝるショック時の内臓の病理組織像については既に述べたが、L. G. Chevance¹⁰⁾ (1958) は口蓋注射をされた海狸の内耳を生体染色で観察し、従来の染色法では見るべき変化を見ないが、組織化学的検索によると、血管帯に局限した変化並びに毛細管における滲出を思わせる所見を見るという。即ち Feulgen 反応では

コルチ氏器の毛細管の核は正常であるが、血管系の毛細管は細胞破壊を疑わしめる像を呈すると言う。なお Weille and Gargano⁶⁹⁾, Perlman and Kimura¹²¹⁾ は加刺激時における毛細血管の透過性昂進、滲出、血球遊出、遂には血管拡大し麻痺状になる様子を顕微鏡下に観察している。

以上の如き組織変化をきたし、且つ聴力の推移を示すわけであるが、CRP はいかにして、何処で出現するかという問題については、岩田も言う如く、肝、脳下垂体、副腎の機能変化を含めた生体の反応に基く所のものとして理解したいが、この点免疫体の内耳液移行の場合とその趣きを異にしていると考ええる。

しかしてかゝる Reilly 現象発現時、その早期に、外リンパに CRP の出現を見る事は、内耳と自律神経の密接な関連性を示すものであると共に、自律神経の失調が早期に内耳の平衡を乱す事を示し、且つかゝるショック時に血清の CRP が（＋）ならば内耳における上述の如き機能並びに組織変化を予想し得るわけであり、臨床診断上一つの指標となり得るものである。

4) 肝、腎障害時の内耳液蛋白質について

海猿に四塩化炭素により肝障害を、昇汞もしくはクロム酸カリにより腎障害を惹起させて内、外リンパ、髄液及び血清の総蛋白量並びに蛋白質分劃を測定し、得たる結果を総括すると、これは三種の薬剤障害による内耳液の総蛋白量は内リンパにおいてはほぼ正常範囲内にあるが、外リンパにおいては減少の傾向がみられ、髄液に減少の傾向をみるが、血清では昇汞及びクロム酸カリ障害例においてこの傾向がある。又蛋白質分劃については、その分劃の種別は内、外リンパ、髄液及び血清いずれも正常時と異なる。又四塩化炭素もしくは昇汞障害例においてその A/G は内リンパにてはその変動は小であるが、外リンパにおいては A/G は小となる傾向を示し、髄液、血清でも同様の傾向を示すが、逆に大となるものもある。しかして各分劃（％）の増減には各試料に一定の傾向を見ない。

従つて内耳液、殊に外リンパの総蛋白量は一般に減少の傾向を示し、蛋白質分劃（％）は大部分に Albumin の減少と Globulin の増加を認め A/G は減少するが、内リンパにおいてはその変化は小である事が分る。

次に四塩化炭素及び昇汞障害例の蛋白質分劃の絶対値 (mg/dl) はその変動の程度が小さいようにみえるが、これは総蛋白量並びに蛋白質分劃（％）の値がいずれも平均値であるためと考えられ、各群又は No. 別の測定

値が得られるならば、正常値と遙かに異なる病態時の値が得られるものと考ええる。

扱て所謂感音系難聴が聴器以外に障害の共存する時に特に発現し易く、あるいは又難聴の進行に悪影響を蒙るであろうことは臨床上の経験よりも充分推定されるところであり、事実聴器以外の身体他部器官又は全身的の何らかの異常が難聴を招来し易い事について多くの報告がある。即ち血液疾患、新陳代謝疾患、内分泌腺疾患、ビタミン欠乏症、神経系疾患、消化器疾患、泌尿器疾患、その他あらゆる疾患に際して難聴をきたすとされているが、その本態については全く不明である。こゝにおいて私は聴力障害の内因を究明する手がかりとして肝、腎障害時の聴器病態を、特に内耳液蛋白質を中心として研究した。

まづ広く肝機能と聴器疾患の関係について見るに 1939 年浦上¹⁶⁵⁾、豊岡¹⁶²⁾ らは急性中耳炎及び乳様突起炎に黄疸を合併せる症例を報告し、更に Zange¹⁶⁷⁾、細谷⁵⁹⁾、星野⁵⁸⁾、木村⁸⁰⁾ らは中耳炎より頭蓋内合併症を惹起せる際の尿中 urobilinogen 反応出現の診断的価値を述べ、木村はこれについて実験的研究を行つている。また村上¹⁶⁶⁾ はかゝる際の尿ミロン反応を検索し、関谷¹⁴²⁾ (1941) は中耳炎における肝機能障害は僅かであるが、続発疾患を起した時はかなり著明である事を実験的に認めて報告している。即ちこれらの研究から中耳炎の際は多少とも肝機能障害をきたす事が分る。

一方 Wollfheim¹⁶⁸⁾ (1950) は肝硬変が難聴の原因たり得る事を説き、菊地 (三)⁷⁷⁾ (1955) は神経難聴者の多数に肝機能障害を認め、肝機能の改善に伴つて聴力の回復することを述べ、我が教室の佐藤¹⁴¹⁾ (1949) は感音系難聴者髄液の Vitamin B₁ 量に減少の傾向あるを述べ、更に森¹¹²⁾ (1954) は同様難聴者の血液及び髄液の焦性葡萄糖は正常者と殆んど差異がないが、雙啞児については高い値を得ており、実験的に撒曹中毒、音響障害並びに BCG 接種を行つた家兎髄液焦性葡萄糖の増量を認め、吉川¹⁶⁰⁾ (1955) は実験的に感音系障害を惹起せしめた動物の内耳液に Alanine, Valine, Leucine, Phenylalanine などアミノ酸の減少する事を報告し、Pick は神経難聴者に血中コレステロールの増量する事を述べている。

即ち肝硬変、肝機能障害時の難聴、更に感音系難聴時の内耳液、髄液あるいは血液中の Vitamin B₁、焦性葡萄糖、アミノ酸、コレステロールなどの病態から、肝機能と聴器の密接なる関連が想像される。なお上述のアミ

ノ酸の変動よりして内耳液の蛋白質にも変動のくる事は当然予想される所であり、私の実験においても前述の如き実験成績を得て内耳液では特に外リンパの変化を見る事を述べた。

次に今迄度々述べた如く 内耳毛細管と内耳液蛋白質の密接なる関連が考えられるが、肝と自律神経の緊密な関係よりして肝機能障害時の内耳血管系も含めた聴器に対する自律神経の状態を知る事は必須の条件である。しかして我が後藤教授⁴¹⁾は1952年の宿題報告において、内耳性難聴者に自律神経機能状態に異常のある者の多い事実を報告され、安達⁶⁾(1956)も同様の事実を報告している。また菊地(三)⁷⁶⁾(1957)は自律神経、肝機能、聴力との密接なる関係を推定し、岩田⁶⁶⁾(1958)もこの問題を綜説的に論じている。久保⁸⁹⁾(1958)は肝疾患々者の過半数に無自覚性の高音障害をきたし、又原因不明神経難聴及びSMによる神経難聴に潜在性肝機能障害の出現率が高率である事などより、肝機能と聴力の間の密接なる関連性を推定している。菊地(庸)⁷⁹⁾(1957)は肝、腎障害時に内耳の音響受傷性の昂進する事を動物実験によつて証明し、肝あるいは腎の障害により直接に、あるいは自律神経を介して内耳血管系に影響を及ぼし、内耳液乃至感覚細胞になんらかの抵抗減弱を齎した状態を推定している。

これらの業績よりしても肝障害時に自律神経を介しての内耳の変化、特に血管系の変化は当然予測される所である。

なお久保(正)⁸⁷⁾(1959)は実験的に肝障害がDihydrostreptomycinの聴器侵襲力に対し補助的促進的役割を果たしていると論じているが、この問題も自律神経をもつてすると理解し易い。

次に腎機能と聴器疾患の関連性について見るに、その間の密接な関連性は古くから認められており、特に急性腎炎の経過中に原因不明の難聴をきたした症例の報告例は多く(Moos, Morf, Dieulafoy, Doumerque, Rosenstein, Mann etc.)腎炎と難聴の程度が並行する例が多いといわれており、Volhardは内耳性難聴の発現に尿毒症を、Wittmaack¹⁸²⁾(1907)は慢性腎炎を、それぞれ例示している。

さて次に、上述した如き肝、腎障害時に難聴を発現するに至る機序について考察する。

松尾¹⁰⁵⁾(1951)は肝機能障害は(1)末梢血管に一定の機能的変化を与え、(2)脳組織の呼吸及び解糖に影響を与え、(3)Stammganglienに変化をきたし、(4)植

物神経系に異常をきたし、(5)髄液圧の変動をきたすと云う。これらは内耳においてはその毛細管、特に血管条及び外リンパ腔壁血管に機能的変化を与え、内耳代謝機構に影響を与え、更にStammganglien、植物神経系、髄液圧への影響となつて現れるのである。しかして私の実験成績では内耳液蛋白質の変化の主体は外リンパにあり、内リンパ蛋白質の変動はそれ自体が聴覚障害を惹起すると考えられる程明らかでないで、肝障害に基く内耳毛細血管の機能変化、特にその透過性を考える時、血管条の変化は外リンパ腔壁血管に比べて軽度のものであり、血管条は他部の血管に比してその管壁の安定性が大きであつて透過性に変動を受け難く、血液の蛋白質に変動をきたしても内リンパにその影響が現れ難いように内リンパ性状の恒常性維持を図るための特殊性を有しているものと考えられる。又髄液圧の変化は、外リンパに対しては蝸牛小管を介して交流などの現象により影響を与える事も考えられるが、この他の内耳代謝異常に基く所の影響は当然考えられる所である。

腎障害時難聴の発現については、古くは動脈張力昂進に基く迷路内圧増進のためと言われ、以後多くの業績を見るが、聴神経浮腫説(Rosenstein)、血管性状変化に起因する局所貧血による蝸牛神経の後迷路性障害(Volhard)、Acidosisに基く中毒性血行性迷路退行変性(Wittmaack)などの論説が見られる。しかしてWolffheim¹⁶³⁾は(1)高血圧と血管壁の変性に因るNephroskleroseに起因する内耳血管系の変化、(2)聴神経浮腫、(3)acidosis又は迷路出血による迷路の変性をあげている。

これらの諸変化の中で内耳血管系の変化が内耳液蛋白質に対して特に重要であり、その血管壁の変性に基く透過性の変化が内耳液の諸成分、特に蛋白質に変化を与え、肝障害時と同様その変化は血管条よりも外リンパ腔壁血管に著しいと考えられる。

なお松尾も云う如く薬剤によつて肝あるいは腎を単独に障害する事は困難であり、両臓器共に障害されるので、これら薬剤による実験では両臓器を別個にとり扱わずに肝、腎障害とした方が妥当である。

以上よりして肝、腎障害それ自体によつては内耳障害をきたし、聴覚障害を招来すると考えられる程の内リンパの病変は明らかではないが、これに何等から障害因子が加わる事によつて聴覚障害が明らかとなり、あるいは障害因子が小なるにも拘らず聴覚障害を生じし易いものとする。

第6章 結 語

実験的感音系障害時の内耳液について、その総蛋白量並びに蛋白質分割を測定した。

1) 音響性聴器障害海猿における総蛋白量は、内リンパ $18 \pm 2.4 \text{ mg/dl}$ 、外リンパ $61 \pm 5.8 \text{ mg/dl}$ 、髄液 $20 \pm 2.2 \text{ mg/dl}$ 、血清 $3980 \pm 804 \text{ mg/dl}$ であり、蛋白質分割の Al , α , β , $\gamma\text{-G}$, (%) は、内リンパではそれぞれ 57.6, 8.6, 11.6, 22.2 (%), 外リンパでは 54.4, 13.5, 16.1, 16.0 (%), 髄液では 54.2, 15.6, 15.1, 15.1 (%), 血清の Al , α_1 , α_2 , β , $\gamma\text{-G}$ (%) は 48.6, 10.3, 11.6, 12.1, 17.4 (%) である。

即ち総蛋白量については、内、外リンパ共に正常値より若干減少の傾向が見られるが、髄液、血清はこの程度の音響負荷では正常値と著差をみない。又蛋白質分割(%)は内、外リンパ、髄液及び血清いずれも正常時と著差を認めない。

かゝる内、外リンパ蛋白質の変動は内耳代謝障害に基づくものである事は勿論であるが、その総蛋白量は前述の伝音系障害時と対照的である。しかし内耳液の変動がこの程度の音響負荷では髄液、血清に比べて著明であるので、内耳液蛋白質の病態は、選択的に聴器を障害する音響作用による聴器障害の結果として理解される。

2) アレルギー性聴器障害海猿における総蛋白量は増大するものと減少するものとがあり、その平均値は内リンパ $23 \pm 3.8 \text{ mg/dl}$ 、外リンパ $91 \pm 14.2 \text{ mg/dl}$ 、髄液 $20 \pm 1.2 \text{ mg/dl}$ 、血清 $4190 \pm 273 \text{ mg/dl}$ である。

しかしこの病態を惹起する原因は内耳毛細血管の拡張に基づく透過性上昇がその主体をなすと考えられ、中耳局所アレルギーが主として蝸牛窓を経て内耳へ侵入したものと推定される。

従つて特異なアレルギー疾患又は過敏症として発現しないアレルギー状態においても聴器、特に内耳液の病変が発生する事を認めたのである。

3) クロトン油の口蓋注射に因る Reilly 現象惹起海猿の内、外リンパ、髄液及び血清の CRP の検索を行うと、口蓋注射後 30 分にして内、外リンパに CRP 陽性となる群のある事を認めた。即ち生体が外界から刺激を受けた場合、生体が刺激に対する反応のあり方として、内耳の立場においても Reilly 現象及び Selye の脳下垂体副腎系の反応を主体とする適応症候群が考えられ、血管の収縮、拡張による刺激によつて高位中枢、更には肝臓、脳下垂体、副腎などの機能変化を齎し、この立場において内耳液にかゝる変動をきたすものと考えられ

る。

しかしてかゝるショック時に血清の CRP (+) となる時は内耳における既述の如き機能並びに病理組織変化の存在を推定しうるわけであり、臨床診断上一つの指標となるものである。

4) 肝、腎障害海猿の総蛋白量は、四塩化炭素障害例では、内リンパは $24 \pm 2.8 \text{ mg/dl}$ 、外リンパは $61 \pm 3.4 \text{ mg/dl}$ 、髄液は $19 \pm 2.6 \text{ mg/dl}$ 、血清は $4310 \pm 398 \text{ mg/dl}$ となり、昇汞障害例では、内リンパは $25 \pm 2.4 \text{ mg/dl}$ 、外リンパは $58 \pm 3.9 \text{ mg/dl}$ 、髄液は $18 \pm 2.5 \text{ mg/dl}$ 、血清は $3750 \pm 132 \text{ mg/dl}$ であり、クロム酸カリ障害例では、内リンパは $24 \pm 2.7 \text{ mg/dl}$ 、外リンパは $61 \pm 5.9 \text{ mg/dl}$ 、髄液は $19 \pm 1.8 \text{ mg/dl}$ 、血清は $3700 \pm 173 \text{ mg/dl}$ となる。

即ちこれら三種の薬剤の障害例の総蛋白量は、内リンパはほぼ正常値の変動範囲内にあるが、外リンパには減少の傾向が見られ、髄液にも同様の傾向を見るが、血清では昇汞もしくはクロム酸カリ障害例においてこの傾向がある。

次にその蛋白質分割は、四塩化炭素障害例の Al , α , β , $\gamma\text{-G}$ (%) は、内リンパではそれぞれ 58.0, 11.9, 12.0, 18.1 (%), 外リンパでは 52.5, 13.3, 15.0, 19.2 (%), 髄液では 52.3, 15.4, 17.1, 15.2 (%), 血清の Al , α_1 , α_2 , β , $\gamma\text{-G}$ (%) は 46.9, 11.7, 9.0, 12.3, 20.1 (%) となり、昇汞障害例の Al , α , β , $\gamma\text{-G}$ (%) は、内リンパではそれぞれ 58.3, 9.6, 12.4, 19.7 (%), 外リンパでは 52.4, 14.0, 16.7, 16.9 (%), 髄液では 52.7, 12.9, 19.0, 15.4 (%), 血清の Al , α_1 , α_2 , β , $\gamma\text{-G}$ (%) は 45.1, 13.5, 11.4, 12.1, 17.9 (%) となる。

即ち四塩化炭素もしくは昇汞障害例においてはその大部分に Albumin の減少、Globulin の増加を認め、A/G は減少するが、内リンパにおいてはその変化は極めて小である。髄液、血清には勿論その変動を見るが、内耳液においてはその変動の主体は外リンパにあるのである。

即ち以上の如く内耳液の変化の主体は外リンパにあつて、内リンパの変化は極めて小さい事と、肝、腎障害の内耳血管に与える機能変化を考え併わせると、内耳血管系は血清の変動にもかゝらず、内リンパ蛋白質の性状を一定に保たんとする特殊性を有している如く思われる。

また肝、腎障害それ自身が難聴を惹起した例が臨床に明らかでない事、腎障害のものにカナマイシン中毒を惹起し易い事などより考えると、肝、腎障害はこのよう

内耳血管、更には自律神経の機能異常をきたして、聴覚障害の準備状態を形成するものと考えられる。

参考文献

- 1) Agazzi, C.: Arch. ital. di Otol., 60: 40, 1949.
- 2) Aldred, P., Hallpike, C. S. and Ledoux, A.: J. Physiol., 98: 446, 1940.
- 3) Alexaner: Verhandl. d. dtsh. Otol. Ges., 1904.
- 4) Antonini, E., Casorati, V. and Crifo, S.: Annals of ORL., 56: 129, 1957.
- 5) 安達哲哉: 日耳鼻, 59巻, 408頁, 昭31.
- 6) 赤堀四郎編: 酵素研究法, 第1巻.
- 7) 赤堀, 水島編: 蛋白質化学, 第2巻.
- 8) 秋山登: 日耳鼻, 58巻, 1237頁, 昭30.
- 9) 安藤唯一: 耳鼻臨, 29巻, 4号, 昭9, 30巻, 1号, 昭10.
- 10) 新井賢治他: 生物々理化学, 3巻, 56頁, 昭31.
- 11) 芦原実: 日耳鼻, 63巻, 950頁, 昭35.
- 12) Beck: Verh. dtsh. Ot. Ges., Bd. 23, 1914. Z. OHK.: usw, Bd. 78, 1914, Bd. 83, 1919.
- 13) Bélanger and Leonard, F.: Science, 118: 520, 1953.
- 14) Blohmke: Zschr. f. OHK., 64: 14, 1912.
- 15) Bücher, T., Matzelt, D. and Pette, D.: Klin. Wochschr., 30: 325, 1952.
- 16) Brüel, D., Holter, H., Linderström-Lang, K. and Rozits, K.: (7) より引用.
- 17) Brünner: Monatsschr. f. OHK., 59: 756, 1925.
- 18) Brünner, H., Alexander, G., and Marburg, O.: Handbuch d. Neurologie d. Ohres.
- 19) Chevance, L.G.: Acta Otolaryng., 49: 509, 1958.
- 20) Chevance, L. G.: Acta Otolaryng., 50: 37, 1959.
- 21) Chevance, L. G., Galli, A. and Jeanmaire, Mme: 耳鼻臨, 52巻, 1452頁, 昭34.
- 22) Chevance, L.G., Galli, A. and Jeanmaire, Mme: Annales d'Oto-Laryng., 73: 273, 1956.
- 23) Citron, L., Exley, D. and Hallpike, C. S.: British Medical Bulletin, 12: 101, 1956.
- 24) Claus: Z. Hals-usw., 26: 143, 1930.
- 25) Conway, E. J.: 石坂訳 “微量拡散分析及び誤差論”.
- 26) Cuvelier, R. et al.: Ann. Biol. Chim., 12: 389, 1954.
- 27) Dean, L. W. and Wolff: Ann. of ORL., 43: 702, 1934.
- 28) Denker, A. und Kahler, O.: Handbuch d. HNOHK. 7. 8 Bd.
- 29) Dohlman, G., Ormerod, F. C. and Mc Lay, K.: Acta Otolaryng. 50: 243, 1959.
- 30) Eaton, J. C. and Gardner, M. D.: Biochem. J., 52, XXV. 1953.
- 31) Esser, H. and Heinzler, F.: Klin. Wochschr., 30, 600, 1952.
- 32) Ewerbeck, H.: Klin. Wochschr., 28: 692, 1950.
- 33) Ferri.: (8) より引用.
- 34) Field, M. E., Leigh, O. C., Heim, J. W. and Drinker, C. K.: Am. J. Physiol. 110, 174, 1934~1935.
- 35) Florey, H.: Physiol., 61, 1926.
- 36) Friedrich.: (28) より引用.
- 37) Gale, E. F.: J. P. Folkes Biochem. J. 59. 1955.
- 38) Görke: Z. f. O., 52; 173, 1906.
- 39) Gries, G., Aly, F. W. and Aldershausen, H. F.: Klin. Wochschr., 31; 644, 1953.
- 40) Grünberg: Z. f. O. 58, 67, 1909.
- 41) 後藤修二: 日耳鼻, 55巻, 257頁, 昭27.
- 42) 後藤修二他: 日耳鼻, 60巻, 339頁, 昭32.
- 43) 後藤修二他: 日耳鼻, 61巻, 394頁, 昭33.
- 44) 後藤修二他: 日耳鼻, 62巻, 総会号, 45頁, 昭34.
- 45) Hamberger, C. A. and Hydén, H.: Acta Otolaryng Suppl. 61, 1945.
- 46) Hamberger, C. A., Hydén, H. and Nilsson: Acta Otolaryng. Suppl. 78, 1949.
- 47) Hammer, G.: Acta Otolaryng. Suppl. 127; 1, 1956, and 140; 137, 1957.
- 48) Haugard, G. and Kroner, T.: J. Am. Chem. Soc. 70; 2135, 1948.
- 49) Herzog: Experimentelle Labyrinthitis, Passow Beiträge. 6; 344, 1913.
- 50) Hiller, A., Plazin, J. and van Slyke, D. D.: J. Biol. chem. 176; 1401, 1948.
- 51) Hinshelwood: J. Chem. Soc. 1950.
- 52) Holmgren, G.: Acta Otolaryng. 20: 381, 1934.
- 53) Holmgren, L.: Acta Otolaryng. 28; 587, 1940.
- 54) Hyrtl, J.: vergleichend-anatomische Untersuchungen über das innere Gehörorgan des Menschen und der Säugetiere. Prague. 1845.
- 55) 羽根喜一: 日耳鼻, 21巻, 1209頁, 大4.
- 56) 日比野典男: 日耳鼻, 5⁸巻, 563頁, 昭30.
- 57) 星野: 東京医学会雑誌, 1914.
- 58) 星野伝吉: 満洲医会誌, 第9巻, 1号, 144頁.
- 59) 細谷邦造: 日耳鼻, 29巻, 1号, 6頁, 大12.
- 60) 深沢久夫: 耳喉, 30巻, 169頁, 昭33.
- 61) 藤井暢三: 生化学実験法, (定量編).
- 62) 飯田稔: 耳喉, 30巻, 158頁, 昭33.
- 63) 伊藤利彦: 日耳鼻, 57巻, 983頁, 昭29.
- 64) 伊藤齊他: 臨床の日本, 4巻, 194頁, 昭34.
- 65) 岩崎憲: 生化学, 24巻, 218頁, 昭27.
- 66) 岩田逸夫: 耳喉, 30巻, 240頁, 660頁, 昭33.
- 67) Jeener, R.: Arch. Biochem. Biophys. 43, 1953.
- 68) Kirk, P. L.: Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 8; 223 1936.
- 69) Knapp, A.: Arch. f. Klin. u. Exp. Dermat. 201; 446, 1955.
- 70) Kobrak, F.: Beitr. zur Anat. usw. Ohr. 18,

1922. 71) 海江田純：日耳鼻，34巻，1143頁，昭3. 72) 片桐主一他：日耳鼻，臨，210頁，昭34. 73) 加藤寅二郎：日耳鼻，63巻，1頁，昭35. 74) 河田政一：日耳鼻，56回總會宿題報告別刷，昭30. 75) 香月武人他：生物々理化学，3巻，61頁，昭31. 76) 菊地三通男：耳鼻臨，50巻，508頁，昭32. 77) 菊地三通男：耳喉，27巻，709頁，昭30. 78) 菊地俊雄：日耳鼻，61巻，1757頁，昭33. 79) 菊地庸二：日耳鼻，60巻，1602頁，昭32. 80) 木村謙次：(142)より引用. 81) 小林，森：濾紙電気泳動法の実験. 82) 小出靖他：日耳鼻，58巻，913頁，昭30. 83) 小出靖：日耳鼻，63巻，620頁，昭35. 84) 小出靖：耳鼻臨，50巻，377頁，昭32. 85) 小西尚郎：日耳鼻，56巻，370頁，昭28. 86) 久保浩一他：日耳鼻，61巻，臨，2頁，昭33. 87) 久保正雄他：日耳鼻，62巻，臨，236頁，昭34. 88) *Laborit, H.*: Réaction organique a l'agression et choc. 89) *Landis, E. M.*: Am. J. Physiol. 82; 217, 1927. and 83, 528, 1927~1928. 90) *Ledoux, A.*: Acta Med. Belg. 1950. 91) *Lermoyez, M.*: Ann. des. de L'oreille du Larynx 48; 575, 1929. 92) *Lowry, O. H., Rosebrough, N. J. and Farr, A. L.*: J. Biol. Chem. 193; 265, 1951. 93) *Lucae*: Virchows Arch. f. Pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 88, 1882. 94) *Marx, H.*: Handbuch d. O. H. K. 95) *Mayer*: 3 Fälle v. Labyrinthentzündungen, Versammlung D. Naturforscher und Ärzte in Salzburg, and M. f. O. S. 277, 1908, S. 601, 1909. 96) *Mies, H. J.*: Klin. Wochschr. 31; 159, 1953. 97) *Miller, G. L. and Miller, E. E.*: Anal. chem, 20; 481, 1948. 98) *Miller, R. C.*: J. Exp. Med. 67; 619, 1938. 99) *Mumenthaler, M. and Närkisen, H.*: Klin. Wochschr. 35; 1, 1957. 100) 丸岡省三：京都医大誌，30巻，703頁，昭15. 101) 松生栄治：日耳鼻，60巻，502頁，昭32. 102) 松本弥：耳鼻臨，16巻，215頁，大12. 103) 松尾巖：日本内科学全書，7巻，1. 104) 三宅弘：日耳鼻，63巻，618頁，昭35. 105) 三宅弘：日耳鼻，56巻，907頁，昭28. 106) 三宅弘：日耳鼻，56巻，161頁，昭28. 107) 三宅弘他：日耳鼻，60巻，468頁，昭32. 108) 三好和夫：臨床病態生理学大系，6巻. 109) 水越治：日耳鼻，63巻，622頁，昭35. 110) 水越治：日耳鼻，59巻，33頁，昭31. 111) 森弘：日耳鼻，62巻，臨，214頁，昭34. 112) 森正鶴見：日耳鼻，57巻，661頁，昭29. 113) 本杉雅英：日耳鼻，62巻，1419頁，昭34. 114) 中村登：日耳鼻，22巻，1頁，大5, 6. 115) 中島稔：日耳鼻，57巻，779頁，昭29. 116) 西端駿一他：日耳鼻，63巻，558頁，昭35. 117) *Olderschausen, H. F., Aly, F. W. and Gries, G.*: Klin. Wochschr. 31; 649, 1953. 118) 追川競：日耳鼻，62巻，2410頁，昭34. 119) 大島司馬夫：日耳鼻，59巻，131頁，昭31. 120) *Pause: präparate zur exsudativen Labyrinthentzündung. D. O. G* 1909. 121) *Perlman, H. B. and Kimura, R. S.*: Ann of ORL. 64, 1176, 1955. 122) *Politzer*: Arch. f. O. H. K. Heft 3. 4. S. 237, 1876. 123) *Polizer*: (8)より引用. 124) *Portmann*: Acta Otolaryng. 44; 532, 1954. 125) *Portman, G.*: Rev. de Laryng-etc. 52, 467, 1931. 126) *Rauch, S.*: Zschr. f. Laryng. usw. 39; 16, 1960. 127) *Robinson, H. W. and Hogden, C. G.*: J. Biol. Chem, 135; 727, 1940. 128) *Roth, H.*: Mikrochem. 31; 287, 1944. 129) *Ruedi, L.*: Ann. of ORL. 60; 993, 1951. 130) *Rushton, K.M.*: J. of L. and. O, 71; 100, 1957. 131) *Schales, O., Ebert, R. V. and Stead, E. A.*: Jr, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 49, 1, 1942. 132) *Shambaugh, G. E.*: Z. OHK, 58; 280, 1909. 133) *Shambaugh, G. E.*: (130)より引用, 1922. 134) *Siebenmann, F.*: Die Blutgefäße in Labyrinth des menschlichen Ohres wiesbaden (1894). 135) *Smith, C. A.*: Ann of ORL. 63; 433 1954. 136) *Smith, C. A., Lowry, O. H. and Wu, M. L.*: Laryngoscope, 64; 141, 1954. 137) *Smith, E. R. B., Crawford, T. M., Jetton, M. R., and Durrum, E. L.*: Fed. Proc., 12, 269, 1953. 138) *Speransky, A. D.*: A basis for the theory of medicine, 1947. 139) *Swahn, B.*: Scand. J. clin. Lab. Invest S. Suppl. 9. 1953. 140) 斎藤義寛：精神々経学誌，59巻，614頁，昭32. 141) 佐藤二雄：日耳鼻，61巻，86頁，昭33. 142) 関谷忠雄：日耳鼻，47巻，1156頁，昭16. 143) 仙石照：耳鼻臨，24巻，201頁，昭5. 144) 柴田象太郎：日耳鼻，59巻，176頁，昭31. 145) 菅谷新次：台湾医誌，34巻，7. 8号，昭10. 146) 鈴木安恒：耳喉，30巻，153頁，昭33. 147) *Theorelle, H. and Widström, G.*: Z. ges. exptl. Med. 75; 692, 1931. 148) *Tomph-*

kins, E. R. and Kirk, P. L.: J. Biol. Chem. 142; 477, 1942, 149) 田井稔: 日耳鼻, 42巻, 274頁, 昭11. 150) 高原高三: 日耳鼻, 39巻, 541頁, 昭8. 耳鼻臨, 28巻, 453頁, 昭9. 151) 滝本勲夫: 日耳鼻, 62巻, 1241頁, 昭34. 152) 豊岡俊雄: 日耳鼻, 47巻, 137頁, 昭16. 153) 坪井邦夫: 日耳鼻, 63巻, 697頁, 昭35. 154) 宇野松雄: 日耳鼻, 61巻, 827頁, 昭33. 155) 浦上貞治: 耳鼻臨, 34巻, 908頁, 昭15. 156) *Vilstrup, Th. and Jensen, C. E.*: Ann of ORL. 53; 151, 1954. and 53; 156, 1954. 157) *Vilstrup, Th., Vilstrup, G. and Jensen, C. E.*: Ann of ORL, 52; 159, 1954. 158) *Waltner, J. G.*: Arch Otolaryng. 47; 656, 1948. 159) *Waltner, J. G. and Raymond, S.*: Laryngoscope, 60; 912, 1950. 160) *Weille, F. L., Gargano, S. R., Pfister, R., Martinez, D. and Irwin, J. W.*: Arch. Otolaryng, 59; 731, 1954. 161) *Wieland, T.*: Naturwissenschaften. 35; 29, 1948. 162) *Wittmaack, K.*: Zschr. f. OHK. 54; 37, 1907. 163) *Wollfheim, L. W.*: Arch. Otolaryng. 52; 157, 1950. 164) 鰐

淵源他: 日耳鼻, 37巻, 782頁, 昭6. 38巻, 797頁, 昭7. 165) 吉川博明他: 生物々理化学, 4巻, 43頁, 昭33. 166) 吉川久夫: 日耳鼻, 58巻, 696頁, 昭30. 167) *Zange, J.*: Zschr. f. OHK. 82; 9. 168) *Zange, J.*: Z. f. O. B 66, S. 161, 1912,

搁筆するに当り終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜つた恩師後藤修二教授に深謝し, 併せて種々御助言をいたゞいた三宅弘助教授に感謝する.

本論文の要旨は

日本耳鼻咽喉科学会, 第59, 60回総会,
日本耳鼻咽喉科学会, 第6, 7回中部地方連合会,
日本耳鼻咽喉科学会, 第158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175回東海地方会,
第1回耳鼻咽喉科臨床会総会,
第20, 21回近畿耳鼻咽喉科学会,
名古屋医学会第75, 78回総会において発表した.

(原稿到着＝昭和35.11.28日)