EFFECT OF IODOACETIC ACID UPON COCHLEAR POTENTIALS AND THE MECHANISM OF CM₂ PRODUCTION

TOSHIMITSU KOBAYASHI, M. D.

Department of Otolaryngology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

IKUO ISE, M. D.

Kogota, Miyagi

RUEDIGER THALMANN, M. D.

Department of Otolaryngology, Washington University School of Medicine, St. Louis, USA

The effect of iodoacetic acid (IAA), a potent inhibitor of glycolysis, upon the cochlear potentials of the guinea pig was studied. And subsequently the mechanism of the second order cochlear microphonics (CM₂) production was investigated by introducing IAA into either perilymphatic scala (scala tympani or scala vestibuli) before the initiation of ischemia.

The results obtained can be summarized as follows.

- 1) Both the endocochlear potential (EP) and the cochlear microphonics (CM) declined drastically following perilymphatic or intraarterial application of IAA. When 5×10^{-3} M IAA was applied perilymphatically, the EP started to decline at about 2 to 3 minutes after the initiation of perfusion and approached a minimal value (first turn: 44.1 ± 4.5 (n=8) mV, second turn: 56.0 ± 5.0 (n=8) mV) at about 8 to 10 minutes after the start of perfusion. While the EP and CM were severely suppressed both in the first and second turns, the organ of Corti potential (OCP) recorded in the first turn underwent only minor change during the early stage of intoxication with IAA.
- 2) The duration of the CM₂ was shortened markedly by the pretreatment of scala tympani with 5×10^{-4} M (0.5 mM) IAA prior to the induction of ischemia. The same pretreatment in scala vestibuli had little effect upon the duration of the CM₂. These findings, together with the fact that the hair cells bathe in the fluid having good communication with the perilymph in scala tympani, strongly suggest that the CM₂ originates in the hair cells of the anoxic cochlea supported by the glycolytic energy production.

A86—0749—23020

解糖阻害剤モノヨード酢酸の蝸牛電気現象への 影響および CM_2 の発生機序

東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：河本和友教授）

小 林 俊 光

宮 城 県 小 牛 田 町

伊 勢 郁 夫

ワシントン大学耳鼻科

R・トールマン

第1節 モノヨード酢酸のモルモット蝸牛電気現象 に及ぼす影響

目 的

蝸牛における音受容には活発なエネルギー代謝が関与している。蝸牛電気現象を指標とした幾多の実験がこれを証明している。1例を挙げると、血管条の機能を表わすと考えられる蝸牛直流電位 (EP)、血管条および有毛細胞が正常であることにより維持される蝸牛マイクロフォン電位 (CM)、さらにこれらの電位に続く蝸牛神経活動電位 (AP) のいずれもが、無酸素 (anoxia) 状態では急激に低下する¹⁾。これらの電位の低下に一致して、生化学的にはアデノシン三リン酸 (ATP)、リン酸クレアチンなどの高エネルギーリン酸化化合物の減少がみられ²⁾、エネルギー産生障害による内耳機能の低下を裏付けている。

蝸牛の中で、音受容のためのエネルギー変換に重要な部位は血管条とコルチ器（有毛細胞）であるが、両者のエネルギー代謝の様式には違いがあることが指摘されてきた。

血管条は EP を生成する巨大な“発電所”である。それに必要な膨大なエネルギーは、当然のことながら好気条件下に呼吸作用により産生される。ここでは解糖系は単に呼吸系の前段階として必要であるにすぎない。実験動物を無酸素状態にすると、前述のように EP はすぐに最低値となり、血管条の高エネルギーリン酸化化合物も減少する。すなわち、嫌気解糖は EP で代表される血管条の機能を維持し得ない。しかしながら、① EP が一過性の無酸素状態の後に完全回復しうる無酸素状態の最長

時間が極めて長い¹⁾³⁾ ② 血管条のグリコーゲン含量も比較的大きい²⁾ などの事実から血管条でも無酸素状態下には嫌気解糖が、その機能の維持には全く不十分であるものの、血管条の生存力の保持に重要である可能性が示唆される²⁾。

一方、コルチ器（有毛細胞）では、① 有毛細胞のグリコーゲン含量が非常に大きい ② 乳酸脱水素酵素 (LDH) をはじめとする解糖系酵素の活性が高いなどから解糖作用によるエネルギーが嫌気条件下のみならず好気条件下でも、その機能ならびに生存力の維持に果たす役割が大きいと推定されている。さらに、この考えを支持する事実として Thalmann et al.²⁾ (1977) は ① コルチ器の呼吸率が低い ② コルチ器の ATP 含量が無酸素状態でも驚く程長く高い値を維持する ③ 無酸素状態下のコルチ器内負電位 (OCP) の低下が緩やかであるなどを挙げている。

このように、解糖は呼吸の前段落として内耳のエネルギー代謝に不可欠であるのみならず、無酸素状態下には血管条・コルチ器の生存力およびコルチ器の機能の維持に重要であると考えられる。以上のように考えてくると、解糖阻害剤が内耳に及ぼす影響を研究することは非常に興味深いことと思われる。

モノヨード酢酸 (iodoacetic acid: 以下 IAA) は CH_2ICOOH なる構造式をもつ古典的解糖阻害剤であり、その Na 塩 $CH_2ICOONa$ とともに解糖系のグリセリンアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素を阻害して強力な解糖阻害作用を示す。

表 1 に示すように、モノヨード酢酸あるいはその Na

表 1 IAA の内耳の影響に関する文献^{5)~8)}

報 告 者	実験動物	IAA 投与法	投与量 (濃度)	CM への影響
Wing (1959)	ネコ	静注	致死量未満	不変～軽度低下
Bornschein und Thalmann (1963)	ネコ	外リンパ灌流	約 1 mM	高度低下
Chou and Vosteen (1971)	モルモット	外リンパ灌流	0.5 mM	中等度低下
Lotz et al (1977)	モルモット	外リンパ灌流	5 mM	不変

塩 (IAA) の蝸牛電位に対する影響に関する報告は既にいくつかみられる。Wing⁵⁾ (1959) は、ネコに IAA を致死量未満静注したが、好気条件下の CM に明確な影響を認めなかった。Bornschein und Thalmann⁶⁾ (1963) は、ネコの 外リンパ腔を約 1 mM の IAA で灌流し、 CM が強く抑制されると報告した。続いて Chou and Vosteen⁷⁾ (1971) は、 $5 \times 10^{-4} M$ の IAA をモルモットの 外リンパ腔に短時間注入し中等度の CM 低下を認めた。これに対して、Lotz et al⁸⁾ (1977) は $5 \times 10^{-3} M$ の IAA をモルモットの 外リンパ腔に灌流しても CM は全く影響を受けないと発表した。一方、彼らはより高濃度 ($5 \times 10^{-2} M$) の IAA を用いた実験で IAA の投与により CM_2 が早期に消失すると報告し、この結果に基づいて CM_2 の発生には解糖作用が重要であるという興味ある仮説を提唱している。次節で著者らは CM_2 の発生機序について検討するが、以上のように IAA の作用に関しては好気条件下では全く影響なしとする Lotz et al⁸⁾ の報告と、 CM の低下をみた他の報告⁶⁾⁷⁾ との間に際立った不一致がみられる。したがって、 CM_2 の発生機序に関する Lotz et al の仮説を検定するためにも IAA の蝸牛への作用を確立しておく必要がある。ところが、これまでに IAA の作用に関する体系的な報告はみられない。表 1 の各報告は、いずれも CM のみを指標として、限られた濃度の IAA について観察している。

そこで著者らは、最初に血管条由来の電位である EP に着目した。その理由は、EP は正常の CM 発生に不可欠の直流電位であり、その低下は CM の低下を来すと一般的には考えられるからである。IAA による EP の抑制曲線を作成し詳細な検討を行ない、そののちに CM について検討することとした。加えてコルチ器内負電位 (OCP) の変化も記録し、コルチ器支持細胞 ひいては有毛細胞の IAA による障害を推定しようと試みた。

方 法

実験には有色モルモット (体重約 300g) を用いた。バントバルビタールナトリウム塩 30mg/kg 腹腔内投与による麻酔後、gallamine triethiodide にて不動化し気管切開のち人工呼吸を行い、中耳骨胞を腹外側から開放し蝸牛に達した。

外リンパ灌流：大半の実験では鼓室階・前庭階の両外リンパ腔を、蝸牛第 1 回転の鼓室階に入口を、前庭階に出口を作製し灌流した。一部の実験ではいずれかの外リンパ腔を蝸牛第 1 回転から蝸牛頂へと灌流した。コントロール外リンパ灌流液の組成は、K: 4, Na: 150, グルコース: 3, 尿素: 2, PO_4 : 0.75, Mg: 1, Ca: 1, HCO_3 : 25, Cl: 131 (いずれも単位 mM) から成り、95% O_2 ・5% CO_2 の混合ガスにて飽和させた。このコントロール外リンパ液の pH は約 7.4 であった。また、 $5 \times 10^{-3} M$ IAA を含む外リンパ灌流液も、混合ガスによる飽和後 pH は約 7.4 であった。灌流速度は 6.8 $\mu l/min$ あるいは 13.6 $\mu l/min$ を用いた。

脳底・前下小脳動脈灌流：IAA の血管内投与の影響を知るために (IAA の通常の静注では全身状態への影響が大きいので)、左前下小脳動脈よりの灌流を行った。灌流液は人工的 O_2 , CO_2 担体である perfluorotributylamine (FC 47) を超音波処理により生理的塩溶液に乳濁。乳剤化したものである。この液はさらに Pluronic F-68 (高分子ポリオール) を乳化剤かつ膠質浸透圧調整剤として含む。使用に際してはこの液体を 95% O_2 ・5% CO_2 により飽和した。この乳剤に代謝基質として 5.6 mM (100mg%) グルコースを加えてコントロール灌流液とした。著者らは、この灌流液 (“人工血液”) を用いて EP および CM を 3 時間以上にわたりほぼ正常に保ちえる。コントロール灌流液の他に IAA を $5 \times 10^{-3} M$ または $10^{-2} M$ となるように加えた灌流液を調製し、コントロール灌流液によって EP および CM が安定していることを確認したのち IAA を含む灌流液に切り替

えた。実験方法の詳細ならびにこの方法を応用した研究は、既発表の論文⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾に詳述されている。

蝸牛電気現象の記録法: EP は 150mM KCl を充填した先端約 $2\mu\text{m}$ のガラス管微小電極により記録した。微小電極を DC 増幅器 (Grass P-18) の入力に銀塩化銀電極を介して接続し、DC 増幅器の出力はデジタル電圧計およびペンレコーダー (Narco physiograph) に表示した。蝸牛窓から基底膜経由で内リンパ腔に電極を挿入した。コルチ器内負電位 (OCP) の記録も同様のアプローチで、EP 測定に用いたものより小さい先端 (約 $0.5 \sim 1\mu\text{m}$) のガラス管微小電極を用いて行い、電極が基底膜・コルチ器を通過するとき記録される負の電位の大きさを測定した。電極刺入による障害を最小限とするため、同一蝸牛からは灌流前のコントロール値の他、1～2 測定のみにした。蝸牛第 2 回転からの EP の記録には、血管条上の骨壁に小孔を開け、ラセン靱帯経由で電極を内リンパ腔に挿入した。いずれの場合も不関電極は露出した頸筋上に置いた。

EP と CM の同時記録は先端 $4 \sim 5\mu\text{m}$ のガラス管微小電極により、第 2 回転で行った。Grass P-18 による増幅後、CM は波形分析器 (General Radio 1900-A 型) にて測定した。これをさらにオシロスコープおよびレベルレコーダー (General Radio 1521-B 型) にて観察あるいは記録した。また、少数の実験では、CM を差動電極法 (田崎) により蝸牛窓より約 2.5mm 上部の位置で記録した。

音刺激は Norelco dynamic transducer により閉鎖回路にて行った。音圧は鼓膜面 (中耳骨胞開放) で Bruel and Kjaer 音圧計を接続したプローベチューブにより測定した。刺激音周波数は、第 1 回転からの CM 記録には 2300 Hz、第 2 回転の場合には 1300 Hz を用いた。IAA 投与時に過大音圧による蝸牛傷害を防止するために、IAA 投与開始後は最大音圧は 60dB SPL re 0.0002 dyne/cm² とした。同じ理由から断続音 (持続 500 msec) を使用し、CM が急激に変化する時点では 15 秒に 1 度ずつ、より長時間の観察には 1 分間に 1 度ずつ計測を行った。このシステムの雑音レベルは約 $1\mu\text{V}$ (peak to peak) であり、これは多くの場合、元の CM の約 0.5% に相当した。

実験結果

図 1 および図 2 は、蝸牛外リンパ腔 (前庭階と鼓室階) を数種類の濃度の IAA で灌流した時の第 1 回転 (図

図 1

蝸牛外リンパ腔 (前庭階および鼓室階) を各濃度の IAA で灌流した時の第 1 回転の EP ならびに OCP の変化。EP は、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$; 8 例、 10^{-3}M ; 8 例、 $5 \times 10^{-4}\text{M}$; 8 例、 10^{-4}M ; 4 例の (平均値 ± 標準偏差) で示した。OCP は、●; $5 \times 10^{-3}\text{M}$, ○; 10^{-3}M , ■; $5 \times 10^{-4}\text{M}$, □; 10^{-4}M を表す。時間軸 (横軸) は EP と OCP に共通であるが縦軸は異なることに注意。

1) ・第 2 回転 (図 2) の EP の変化を示す。 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ (5mM) では EP は灌流開始後 2～3 分で低下し始め、約 8～10 分後最低値に達した。最低値に達した時の EP の絶対値 (以下、最大負値と略す) は、第 1 回転: $44.1 \pm 4.5\text{mV}$ ($n=8$)、第 2 回転: $56.0 \pm 5.0\text{mV}$ ($n=8$) であった。虚血後の EP の最大負値が第 1 回転: $38.7 \pm 3.7\text{mV}$ ($n=7$)、第 2 回転: $38.9 \pm 5.9\text{mV}$ ($n=11$) であるのと比較して、IAA によって得られる最大負値は特に第 2 回転で有意に大きかった。 ($p < 0.001$)

これより低い濃度では、最大負値は濃度の低下とともに小さくなった。しかし、いずれの濃度に対しても最大負値は第 2 回転の方が第 1 回転より有意に大きかった。第 2 回転では、 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ でも EP の平均値 ($n=3$) は 60 分後には 0mV 付近まで低下した。

図 3 は、図 2 の各々の値を IAA に対する EP の抑制曲線に書き直したものである。EP の I_{50} (第 2 回転) は約 $3 \times 10^{-5}\text{M}$ であった。

図 1 はまた、異なるいくつかの濃度の IAA に対する OCP の変化を示している。全体としてみると、EP が

図 2

蝸牛外リンパ腔（前庭階および鼓室階）を各濃度の IAA で灌流した時の第 2 回転の EP の変化。 $5 \times 10^{-3} M$; 8 例, $5 \times 10^{-4} M$; 3 例, $10^{-4} M$; 3 例, $5 \times 10^{-5} M$; 3 例, $10^{-5} M$; 3 例の（平均値 $\pm$ 標準偏差）で示した。

図 3

第 2 回転の EP の最低値と IAA の濃度の関係（IAA による EP の inhibition curve）。

最大負値に達する時点では OCP の変化は小さい。以後 OCP は基線に向かって小さくなるが、この過程は EP が基線に向かって上昇（負値の減少）するのに多少とも相伴っている。しかしながら、 $10^{-4} M$ では OCP は、

EP が灌流 40 分後には約 0 mV, 60 分後には約 -10 mV へと低下したのに非常にわずかな変化にとどまっております。EP に比較して OCP は IAA に抵抗性であった。

図 4 は、 $5 \times 10^{-3} M$ IAA を灌流しつつ第 2 回転の CM

図 4

$5 \times 10^{-3} M$ IAA の外リンパ灌流による第 2 回転の EP・CM の変化の代表例

図 5

$5 \times 10^{-3} M$, $10^{-3} M$ IAA を前下小脳動脈より灌流した時の EP の変化。矢印は灌流の停止を示す。EP; 第 1 回転。

と EP を同時記録したものの代表例である。CM および EP は、灌流開始の約 2.5 分後から代下し始め約 10 分後にはそれぞれ 6% および $-54 mV$ に達した。EP

はしばらくこの最低値に留まったが、約 10 分後に上昇を開始し、この EP の上昇にはほぼ一致して CM は約 5% から約 10% へと増加した。しかし、EP の上昇（負値の

減少)の速度が鈍る頃から CM は再び急速に減少し始め、灌流開始の45分後には雑音レベル(元の振幅の約0.5%)に減少した。この一連の変化、すなわち一過性の CM の増大とこれに続く CM の急速な減少は、この代表例の他の4例の実験でも同様に観察された。これらの実験の平均値を示さなかったのは、平均により EP と CM の相関が不明確になるためである。

図5は、IAA $5 \times 10^{-3} \text{M}$ ($n=2$)、 10^{-3}M ($n=1$) を左前下小脳動脈より灌流した時の第1回転より記録した EP の変化を示す。 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ では EP の初期の低下の速度は外リンパ灌流により IAA を投与した時よりも少し遅いのみであったが、 10^{-3}M では外リンパ灌流よりも顕著に緩かであった。いずれの濃度によっても EP は低下し、その極性はマイナスとなったが、最大負値は同濃度の IAA を外リンパ灌流した場合にくらべ小さかった。

考 按

本研究は、EP および CM がきわめて IAA に鋭敏に反応することを明確にした。この結果は、CM を指標とした Bornschein und Thalmann⁶⁾、Chou and Vosteen⁷⁾ の実験結果を支持するが、好氣的条件下では $5 \times 10^{-3} \text{M}$ IAA によっても CM が変化しないとした Lotz et al⁸⁾ の結果とは全く一致しない。EP の I_{50} は $3 \times 10^{-5} \text{M}$ (第2回転)(図3)というきわめて低い濃度であり、血管条が IAA により好気条件下に強い影響をうけることがわかる。さらに EP に関して注目し値するのは、第2回転で $5 \times 10^{-3} \text{M}$ 、 10^{-3}M IAA による最大負値が虚血による最大負値より著明に大きいことである。加えて、いずれの濃度の IAA に対する最大負値も第2回転が第1回転より大きいことも興味深い。しかしながら、第1回転では IAA と虚血による最大負値の差は明確でなく、また虚血による最大負値は第1回転、第2回転で差がないので、蝸牛管の電気的抵抗の回転別の差違を考えてみても納得できる説明とならない。現在のところこれらの理由は不明である。

EP がこのように IAA により、その初期から強い影響をうけるのに対して、IAA のコルチ器内負電位への影響は初期には小さい。このことは、血管条の少なくとも EP によって代表される機能にくらべてコルチ器の支持細胞は、IAA に対してかなり感受性が低いといえる。 10^{-4}M ではコルチ器内負電位は EP がゆっくりと基線へ近づくにもかかわらず、60分間の観察時間内にはほとんど

変化を示さない。コルチ器内負電位により有毛細胞の状態をただちに類推することは妥当でない。しかし、別に行った一連の実験で CM の減少率がその初期には、IAA の前庭階のみへの灌流でも、鼓室階のみへの灌流でもほぼ等しい²⁹⁾ ことと考え併せると、IAA による CM 低下の初期の部分は、有毛細胞の障害というよりも EP の低下に伴う二次的なものであると考えられる。

EP と CM の同時記録においては、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ IAA による灌流で EP が最低値となったとき、CM は投与前の値の 5~7% に低下する。これに続いて CM が EP の負値の減少(EP の上昇)時に増大することは、Davis¹²⁾ のバッテリー説やその発展型である Honrubia¹³⁾¹⁴⁾ らの等価回路を用いた説によれば CM の起電力の増加と解釈可能である。その後 EP の負値がさらに減少するにもかかわらず CM が減少するのは、IAA により有毛細胞の解糖が極度に低下したためと考えられる。しかしこの実験では $5 \times 10^{-3} \text{M}$ という高濃度の IAA を用いているため、IAA の解糖抑制以外の非特異的作用、たとえば膜透過性の変化や呼吸作用の抑制がコルチ器やその他の蝸牛組織におこり、CM を低下させた可能性も否定できない。第2節の実験は、この点を考慮し、実験条件を工夫した。

前下小脳動脈灌流でも EP および CM の低下をみたことは、IAA が外リンパ灌流のみならず血管内投与でも濃度が十分高ければ EP・CM を抑制することを示す。Wing⁵⁾ が IAA の静注で明確な CM の低下をみることができなかったのは、致死量未満(ネコで 25mg/kg 未満)の静注では内耳障害をおこすに足る血中 IAA⁵⁾ 濃度を達成しえなかったためといえよう。

結 論

IAA の EP・CM およびコルチ器内負電位(OCP)への作用を詳細に検討した。IAA は外リンパ灌流でも血管内投与でも EP ならびに CM を強く抑制した。外リンパ灌流では、 $5 \times 10^{-3} \text{M}$ で既に強い抑制作用が認められた。IAA 灌流の初期に EP および CM が急速に低下するのは、血管条が早期に強く抑制されるためと考えられる。これに対して、コルチ器内負電位(OCP)の変化は緩かであり、コルチ器は血管条よりも IAA に抵抗性があると考えられる。

第2節 CM_2 の発生機序

目 的

Wever and Bray¹⁵⁾ (1930) による蝸牛マイクロフォン電位 (CM) の発見から間もなく実験動物を無酸素状態 (anoxia) にすることにより CM が低下することが知られるようになった (Davis¹⁶⁾ (1934), Hallpike and Rawdon-Smith¹⁷⁾ (1934) など. その後, Wever, Bray and Lawrence¹⁸⁾ (1941) は, 動物の死後にも CM が長時間にわたって観察しうることを詳細に報告した. すなわち, CM は動物の死(または内耳血流の遮断¹³⁾)により急激にその大きさを減じ, 約 10~20% 程度に減少する. しかし, その後の減少は非常に緩徐であり数時間にわたり観察される. Békésy¹⁹⁾ (1952) は正常下の CM を primary CM (CM_1), 死後の CM を secondary CM (CM_2) と名付け, 今日ではこの呼称が広く用いられている. しかし, CM_2 の発生機序に関する納得できる説明は今日までなされていない.

本研究は, 第1節でその作用を詳細に研究した解糖阻害剤 IAA を用いて, CM_2 が有毛細胞の解糖作用により発生するものであるという Lotz et al⁹⁾ の仮説の真偽を厳密な実験により判定するために行った.

方 法

モルモットを用いた. 蝸牛電気現象 (EP・CM) の記録法・外リンパ灌流法など, 実験方法は基本的に第1節に述べた方法と同じである.

1) 蝸牛第1回転(蝸牛窓より約 2.5mm 上方)および第2回転より CM を記録したのち, モルモットの

行大動脈を切断し虚血とした. 虚血後の CM (CM_2) の振幅を経時的に測定した. CM の記録は, 第1回転では田崎の差働電極法, 第2回転では蝸牛中央階に挿入したガラス管微小電極によって行った. 実験中, 室温を約 37°C に維持した.

2) 中耳腔の酸素分圧の高低が CM_2 に影響を及ぼすかどうか知るため, 以下のごとき実験を行った. 第1回転で前庭階と鼓室階に挿入した2本の電極による差働電極法により CM_2 を記録した. 続いて, 削開した中耳骨胞の骨を元に戻して電極の周囲を除いて中耳骨胞を閉鎖し, 別に刺入した18ゲージ注射針から各種ガスを約 30ml/min の流量で持続的に注入しつつ, CM_2 の変化を観察した. 使用したガスは, 純酸素, アルゴン, 空気である.

3) 蝸牛第2回転より EP と CM を同時記録し, 以下の a)~c) の3つの異なる条件下における CM_2 の持続時間を比較した.

a) IAA を鼓室階に7分間灌流し, その直後に虚血とする.

b) IAA を前庭階に7分間灌流し, その直後に虚血とする.

c) IAA を灌流せずに虚血とする.

なお, IAA の濃度は $5 \times 10^{-4}M$ (0.5mM) とし, IAA の灌流は虚血になると同時に停止した.

実験結果

図6は, 第1回転 ($n=5$) および第2回転 ($n=7$) から記録した CM の虚血による変化 (CM_2) を示す. 第2回転では CM_2 が雑音レベルになる迄を示したが, 第1

図 6

第2回転から記録した CM の虚血による変化 (CM_2). CM_2 の振幅を虚血前の値に対する%で表示したのち, 7例の(平均値±標準偏差)を求め図示した. 第1回転については5例の(平均値±標準偏差)を虚血後50分まで図示した.

図 7

第1回転上部から記録した CM_2 に対する中耳骨胞内酸素濃度の影響に関する実験の代表例。中耳骨胞の酸素濃度は CM_2 の経過に影響を与えていない。

図 8

$5 \times 10^{-4} M$ (0.5mM) IAA で、a) 鼓室階 (ST) または b) 前庭階 (SV) を 7 分間灌流後に虚血とした時の CM_2 の経過の代表例。c) IAA を灌流せず虚血とした場合をコントロールとして示す。

回転では虚血後の50分間のみを示した。第2回転の CM_2 を虚血前の CM に対する百分率で表示すると、その(平均値±標準偏差)は虚血後 5分: 14.1 ± 5.9 , 10分: 13.2 ± 5.5 , 20分: 8.7 ± 2.6 , 30分: 4.7 ± 0.8 , 40分: 5.1 ± 3.1 , 50分: 5.4 ± 3.4 , 60分: 6.7 ± 4.5 , 70分: 6.2 ± 4.9 , 80分: 6.2 ± 4.9 , 90分: 4.2 ± 3.0 , 100分: 3.2 ± 2.4 , 110分: 2.2 ± 1.5 , 120分: 1.1 ± 0.7 であった。 CM_2 が雑音レベルに減少する時間

は虚血後平均 122 ± 14 分であった。

図7は中耳骨胞内の酸素濃度の、 CM_2 の持続時間・振幅への影響に関する実験の1代表例を示す。第1回転上部(蝸牛窓から約2.5mm上方)から記録した CM_2 の経過は、中耳骨胞が純酸素で充満されても、アルゴンで充満されても相違なかった。

図8はa)~c)の異なる3つの条件下で CM_2 の変化をデシベルで表示したものの代表例である。EPの経過

は3つの条件下で大きな相違はないが、 CM_2 の経過は根本的に異なっている。鼓室階が $5 \times 10^{-4}M$ (0.5mM) の IAA によって前処置されたもの (a) では、 CM_2 は18分で雑音レベルに低下した。 CM_2 の低下は進行性で明確な CM_2 のプラトーの形成はみられない。これと対照的に前庭階を IAA で前処置したもの (b) では、無処置のもの (c) と同様な典型的な CM_2 プラトーが形成され、虚血約40分後頃迄元の振幅の約23dB下(約7%)で安定した。その後、 CM_2 は徐々に減弱し虚血後約70分で雑音レベルとなった。しかし、c) では CM_2 の低下はさらに遅く、この例では虚血後106分で雑音レベルとなった。図8に示した代表例以外に行った2組の実験でも同様の結果であった。また、両外リンパ腔をコントロール外リンパ液で7分間灌流後虚血としても、 CM_2 の持続は灌流せず虚血した時と比較して変化がなかった ($n=2$)。

考 按

Wever, Bray and Lawrence¹⁸⁾ (1941) は CM_2 (CM_2 と呼ばれるようになったのは後年 Békésy¹⁹⁾ (1952) によってであるが、便宜上以下 CM_2 と統一する) を詳細に観察した。彼らによると CM_2 は5時間以上も観察されたという。著者らの観察では CM_2 の持続は約2時間程度であり彼らの報告より短い。Lotz et al²⁰⁾ や Wing²¹⁾ らの報告は著者らの結果に近い。Wever, Bray and Lawrence¹⁸⁾ と他の報告の違いの原因は雑音レベル、記録方法、動物の体温の維持などの差を考慮しても十分な説明はできず現在のところ不明である。

Wever, Bray and Lawrence¹⁸⁾ はまた、 CM_2 が徐々に減少の一途をたどるのでなく途中にいくつかの増減があり、その経過は比較的变化に富むことも観察している。これは、今回の実験でも確認された(図6)。特に、虚血後約70分付近でそれまで減少していた CM_2 が一過性に増大し、緩やかなピークを作って再び減少、ついには雑音レベルとなることは、ほとんど常に観察された興味ある所見である。Wever, Bray and Lawrence¹⁸⁾ はこの現象に興味を持ちこれを死後の CM の後期回復相 (late recovery phase) と記載したが、その成因を究明するに到らなかった。今回、著者らが EP を CM と同時に記録したところ、この CM_2 の一過性の上昇は一度最低値に達した EP が基線に向けて上昇を開始する(換言すれば負の EP が減少し始める) 時期に一致してみられることが多いことが判明した。EP の上昇による一過

性の、CM の起電力の増加による現象と考えられる。しかし、この現象の完全な解明にはより詳細な検討が必要である。

上述のように、Wever, Bray and Lawrence¹⁸⁾ により CM_2 は詳しく観察されたが、その発生機序に関する研究は少なく、純物理的作用によって発生していると考えるのが今日まで支配的であった¹⁸⁾²⁰⁾²¹⁾。

CM_2 の発生機序を明確に生物学的機構に求めようとしたのは、Wing²¹⁾ (1959) の報告に始まるといえよう。Wing はネコの蝸牛窓から CM を記録し、 CM_2 は有毛細胞の代謝によって発生するものであり、そのエネルギーの大部分は中耳腔の酸素が蝸牛窓を透過し有毛細胞に達することによる呼吸作用 (aerobic respiration) によって発生すると結論した。彼は IAA 静注の CM_2 に及ぼす影響から嫌気解糖 (anaerobic respiration) も CM_2 の発生に一部関与していると考えたが、あくまでも呼吸が主体であると結論した。彼のいうように蝸牛窓を透過し酸素が蝸牛窓に近い有毛細胞に到達する可能性は、Maass et al²²⁾ (1978), Morgenstern and Kessler²³⁾ (1978) などの実験成績からも十分考えられる。しかし、蝸牛窓から遠く離れた有毛細胞には中耳腔の酸素が到達しうる可能性は極めて少ないと考えられる。したがって著者らは蝸牛上方回転の CM_2 の発生機序は Wing の説では説明することができないものと考えた。この点を結論するために、第1回転上部(蝸牛窓より約2.5mm上方)で記録した CM_2 に対する中耳腔酸素濃度の影響を調べた。CM の記録は差動電極法で行った。差動電極法(田崎)は蝸牛の比較的狭い範囲の有毛細胞からの CM を記録するとされており、遠隔部位の反応を除外(この場合は蝸牛窓付近の有毛細胞からの CM の混入の防止)することが可能で、この実験の目的にかなうものである。結果は図7のごとく中耳腔を純酸素で満たしても、アルゴンガスで満たしても CM_2 の振幅・持続時間に差は認められなかった。このことから、蝸牛窓を通しての酸素の透過により CM_2 が発生しているという Wing の説は蝸牛窓から2.5mm上方へ離れただけで既に正しくなく、 CM_2 の発生機序の蝸牛全体のレベルの説明には別の機序が考えられねばならない。

Wing が CM_2 の大部分のエネルギーは呼吸によって考えたのに対し、Lotz et al²⁰⁾ (1977) は解糖が CM_2 のエネルギー源と考えた。彼らは、 $5 \times 10^{-3}M$ IAA をモルモット外リンパ腔に好気条件下に灌流しても全く CM に影響をみないが、 5×10^{-2} (50mM) という高濃度の

IAA で外リンパ腔を灌流したのちに動物を虚血にすると死後の CM (CM_2) が早期に消失するとした。彼らはこの所見に基づき、好気条件下では解糖は蝸牛のエネルギー代謝に関与せず、嫌気条件下に急速かつ強力に活性化され、 CM_2 を維持するとした。そして、コルチ器(有毛細胞)のグルコースおよびグリコーゲン貯蔵が枯渇すると CM_2 は減少し、代謝によらず物理的過程によって生ずる CM_3 となるとした。この仮説は興味深い以下の点が問題である。

① 彼らの IAA を用いた実験では、IAA は $5 \times 10^{-3}M$ (5mM) でも好気条件下の CM を全く変化させなかった。

② 彼らが CM_2 が抑制されたとした $5 \times 10^{-2}M$ (50 mM) という極めて高い濃度では、IAA の解糖阻害剤としての特異性が全く期待できない。

③ 彼らは IAA の外リンパ灌流に際し前庭階・鼓室階を区別して灌流していない。よって、IAA が有毛細胞以外の部位に作用て CM_2 を抑制したという可能性を否定できない。

などから、彼らの実験結果はこの仮説の証明にはほとんど無効であり、新たに厳密な実験が必要と考えられた。

著者らは第1節で IAA の EP および CM に及ぼす影響を確立した。IAA は EP および CM を強く抑制し、その作用は $5 \times 10^{-5}M$ (0.05mM) で既に明らかであった。この濃度は Lotz et al⁸⁾ が全く影響を認めないとした濃度の 100分の1である。彼ら以外の報告⁶⁾⁷⁾ は IAA が CM を抑制(外リンパ灌流のとき)するという点で一致しており、彼らの用いた IAA 自体に何らかの問題があったものと考えられる。

本研究では IAA の濃度に注意を払い $5 \times 10^{-4}M$ (0.5 mM) を用いた。Lotz et al⁸⁾ の用いた 50mM の 100分の1である。Webb²⁴⁾ (1966) によれば、1 mM を越す IAA は解糖阻害剤としての特異性がほとんど期待できない。すなわち、解糖系以外の各種の酵素を抑制するという。そこで著者は EP ならびに CM を十分に抑制するが比較的低い濃度ということで $5 \times 10^{-4}M$ (0.5mM) を CM_2 実験のときの IAA 濃度とした。

また、著者らは前庭階と鼓室階を別々に灌流した。その目的は、IAA がコルチ器(有毛細胞)以外の部位に作用し CM_2 を小さくしている可能性を除外するためである。すなわち、IAA による前庭階あるいは鼓室階のいずれの灌流でも同程度に CM_2 が抑制されるならば、それはコルチ器(有毛細胞)に IAA が作用したためと

はいえない。蝸牛管の膜透過性を非特異的に障害しても CM_2 は消失しうるからである。IAA が有毛細胞に作用して解糖作用を抑制し CM_2 が早期に消失したと結論するにはコルチ器(有毛細胞)が浴している鼓室階外リンパへの IAA の投与によって前庭階への投与にくらべ CM_2 が著明に抑制されることを証明する必要があった。

本実験では蝸牛窓から十分遠い第2回転から CM を記録し IAA を投与した。鼓室階に IAA を投与してから虚血とすると CM_2 の持続時間が著しく短縮した。前庭階への投与でもコントロールに比較して CM_2 が軽度には短縮したが、これは鼓室階へ IAA が漏洩したためであろう。前庭階への投与では CM_2 への影響が軽微であったことは、IAA を鼓室階へ投与し虚血としたときの CM_2 の早期消失は蝸牛管膜透過性の変化などによるものでないことを示している。また、負の EP の経過がいずれの条件下でも大差がなかったことも蝸牛膜透過性の変化が生じていないことを間接的に支持する所見である。以上の事実から IAA がコルチ器(有毛細胞)に作用して解糖作用を阻害し CM_2 が早期に消失したものと考えられ、 CM_2 の発生にはコルチ器(有毛細胞)の解糖作用が主要な役割を果たしているものと考えられる。

結 論

$5 \times 10^{-4}M$ (0.5mM) の IAA を鼓室階へ投与し虚血とすると CM_2 の持続時間が著明に短縮した。前庭階への IAA の投与では CM_2 の短縮は軽微であった。このことから、 CM_2 の発生にはコルチ器(有毛細胞)の解糖作用が主要な役割を果たしていると電気生理学的に結論した。

参 考 文 献

- 1) Konishi T, Butler R A and Fernandez C: Effect of anoxia on cochlear potentials. J Acoust Soc Amer 33: 349-356, 1961.
- 2) Thalmann R, Thalmann I, Ise I and Palohelimo S: Noxious effects upon cochlear metabolism. Laryngoscope 87: 699-721, 1977.
- 3) Kusakari J, Kambayashi J, Kobayashi T, Rokugo M, Arakawa E, Ohyama K and Kaneko Y: The effect of transient anoxia upon the cochlear potentials. Auris Nasus Larynx 8: 55-64, 1981.
- 4) Chou J T -Y and Rodgers K: Respiration of

- tissues lining the mammalian membranous labyrinth. *J Laryngol Otol* 76: 341-351, 1962.
- 5) Wing K G: Studies of basic cochlear physiology and the energy-metabolism of the cochlear response in the cat. *Acta Oto-laryng Suppl* 148: 9-97, 1959.
 - 6) Bornschein H und Thalmann R: Die Beeinflussung der Mikrophonpotentiale durch endocochleare Applikation von Jodacetat. *Experientia* 19: 413-414, 1963.
 - 7) Chou J T -Y and Vosteen K -H: The effect of ionic concentration, metabolic inhibitors and high energy phosphate compound on the microphonic potential. *Arch klin exp Ohr- Nas -u Kehlk Heilk* 200: 300-317, 1971.
 - 8) Lotz P, Haberland E -J and Kuhl K -D: The effect of glycogen in the cochlea metabolism. *INSERM* 68: 233-242, 1977.
 - 9) Wada J, Paloheimo S, Thalmann I, Bohné B A and Thalmann R: Maintenance of cochlear function with artificial oxygen carriers. *Laryngoscope* 89: 1457-1473, 1979.
 - 10) Kambayashi J, Kobayashi T, DeMott J E, Marcus N Y, Thalmann I and Thalmann R: Effect of substrate-free vascular perfusion upon cochlear potentials and glycogen of the stria vascularis. *Hearing Res* 6: 223-240, 1982.
 - 11) Kambayashi J, Kobayashi T, Marcus N Y, DeMott J E, Thalmann I and Thalmann R: Minimal concentrations of metabolic substrates capable of supporting cochlear potentials. *Hearing Res* 7: 105-114, 1982.
 - 12) Davis H: A mechano-electrical theory of cochlear action. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 67: 789-801, 1958.
 - 13) Honrubia V, Strelhoff D and Sitko S T: Physiological basis of cochlear transduction and sensitivity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 85: 697-710, 1976.
 - 14) Sitko S T, Strelhoff D and Honrubia V: Source and maintenance of the endocochlear potential. *Trans. Am Acad Ophth Otol* 82: 328-335, 1976.
 - 15) Wever E G and Bray C W: Action currents in the auditory nerve in response to acoustical stimulation. *Proc Nat Acad Sci U S* 16: 344-350, 1930.
 - 16) Davis H, Derbyshire A J, Lurie M H and Saul L J: The electric response of the cochlea. *Am J Physiol* 107: 311-332, 1934.
 - 17) Hallpike C S and Rawdon-Smith A F: The "Wever and Bray phenomenon". A study of the electrical response in the cochlea with especial reference to its origin. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 46: 976-990, 1934.
 - 18) Wever E G, Bray C W and Lawrence M: The nature of cochlear activity after death. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 50: 317-329, 1941.
 - 19) von Békésy G: Gross localization of the place of origin of the cochlear microphonics. *J Acoust Soc Amer* 24: 399-409, 1952.
 - 20) Bornschein H und Krejci F: Elektrophysiologische Untersuchungen über Temperatureffekte in der Schnecke. *Acta Oto-laryng* 45: 467-478, 1955.
 - 21) Dallos P: The auditory periphery. Academic Press, New York, San Francisco and London, 1973.
 - 22) Maass B, Baumgärtl H und Lübbers D W: Lokale pO₂- und pH₂- Messungen mit Mikrokoaxialnadelektroden an der Basalwindung der Katzencochlea nach akuter oberer zervikaler Sympathektomie. *Arch Otorhinolaryngol* 221: 269-284, 1978.
 - 23) Morgenstern C and Kessler M: Oxygen consumption and oxygen distribution in the inner ear. *Arch Oto-Rhino-Laryng* 220: 159-162, 1978.
 - 24) Webb J L: Enzyme and metabolic inhibitors. Vol. 3. Academic Press, New York and London, 1966.
 - 25) Kobayashi T and Thalmann R: 未発表
- 本研究は米国セントルイス市, ワシントン大学耳鼻科にて行った。
東北大学教授河本和友先生, 同講師草刈潤先生のご校閲を深謝します。
- (原稿受付 昭和58. 3. 25日)
別刷請求先 〒973 いわき市内郷御厩町久世原 16
磐城共立病院耳鼻咽喉科 小林 俊光