カエル卵形囊の phasic components に関する 検討および耳毒性抗生物質による影響について

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：原田康夫教授）

白 根 誠

PHASIC COMPONENTS OF ISOLATED FROG UTRICLE AND THE EFFECT OF OTOTOXIC DRUGS

MAKOTO SHIRANE, M. D.

Department of Otorhinolaryngology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

The action potential of an isolated frog utricle was recorded using a suction electrode. The utricle was stimulated with iron sand which was spread evenly on the macula. A magnetic force was employed to induce the iron sand to depress the macula lightly. From this experiment, two kinds of action potentials were recorded from the utricular nerve. One was the phasic component with adaptation and the other was the tonic component without adaptation.

The phasic component adapted in 5-8 seconds after the onset of the stimulus. When two stimuli were superimposed, amplitudes of the potential evoked by the second stimulus were almost the same, regardless of the timing of the second stimulus. In addition, the amplitudes of the potential evoked by the second stimulus varied exactly in accordance with the intensity of the second stimulus. These results indicated that the utricle has two kinds of receptors with different thresholds. Furthermore, it is suggested that receptors of the phasic components accurately monitor the changes of the stimulus intensity.

Streptomycin (SM) or 3', 4'-dideoxykanamycin B (DKB) were added to the frog Ringer's solution in order to examine the effect of these drugs on the phasic component of the frog utricle. Action potential completely disappeared with the concentration of 600 γ /ml of SM and 300 γ /ml of DKB.

The ototoxicity of these drugs on the vestibular sensory cells possibly depends on the efficacy of the drug itself as well as on the affinity of the drug to the sensory cells.

Key words: 卵形囊, phasic component, 砂鉄, 閾値, receptor

A88—0651—24020

前庭耳石器は、解剖学的特殊性のため、単独で摘出し刺激することが難しく、末梢受容器としての刺激感受様式に関して生理学的に明解な結論の得られていない部分が数多く残されている。

そこで、生体より摘出後も比較的長時間にわたって安定した反応を得ることの出来る、カエル前庭器に着目

し、卵形囊を単独で刺激し、その末梢受容器としての生理学的特性に関して検討することを試みた。

すなわち、カエル摘出卵形囊の平衡斑上に砂鉄を一樣に留置し、この砂鉄を平衡斑直下に設定した電磁石で牽引することによって、これまで諸家が用いてきた加速度などの刺激方法とは異なり、平衡斑感覚毛を直接偏位さ

Fig. 1 Original a.c. recording (upper trace) and the integrated recording (lower trace) of the utricular nerve action potential. Fast adaptation of the on-response is obviously seen in the integrated recording.

Note off-responses which appeared immediately after the end of the stimulus.

せて刺激を行う方法を考えた。

この刺激方法によって、既報 (Equilibrium Res, Vol. 42)¹⁵⁾ のごとく、カエル卵形囊一次ニューロンには、adaptation を有する phasic component と、adaptation を有しない tonic component の2種類の活動放電を認めることができた。また、刺激開始時と終了時に phasic な反応が認められ、いわゆる ON-OFF 反応として記録することが可能であった (図 1)。この ON-OFF 反応は平衡斑上の striola を境とした片側ずつからの感覚細胞群の活動放電を記録したものと考えられ、平衡斑感覚毛配列における形態的極性と機能的極性が一致することを示唆するところとなった。

さらに、この phasic な反応は、刺激の増大に対し指数函数的な反応の増加を示した。

phasic な反応を示す前庭一次ニューロンの刺激の強さに対する関係が、刺激の対数に比例することは、Katsuki, et al (1950)¹⁰⁾, Shimazu and Precht (1965)¹⁷⁾, Precht, Llinas and Clarke (1971)¹⁶⁾ らによってもすでに報告されている。従って、砂鉄によって感覚毛を直接偏位させて刺激を行う方法も、加速度などを利用する純生理的的刺激方法と同様に、耳石器の生理機能を検討する上で、十分活用し得ることが判明した。

今回は、こうした方法によって、卵形囊一次ニューロンより得られる phasic component に関する特性をより詳細に検討すると同時に、耳中毒性抗生剤の耳石器機能へおよび直接障害の追求も試みた。

PB power box ; FG function generator ; EM electro-magnet ; ME microelectrode ; A1 amplifier ; INT integrator ; OS oscilloscope ; A2 amplifier ; PR pen recorder ; is iron sand ; uc utricle .

Fig. 2 A block diagram of the experiment settings.

実験方法

平均体重 30g 前後のトノサマガエル (*Rana nigromaculata*) を断頭後、頭部を Frog Ringer 液内に浸し、実体顕微鏡下に口蓋側より迷路骨胞を除去して膜迷路を一塊として摘出した。さらに、球形囊、lagena、後半規管、下前庭神経を慎重に切り離し、前・外側半規管および卵形囊に上前庭神経が付着するのみの状態とした。また、半規管からの影響を除くため、前・外側半規管膨大部への神経付着部を切り離した。この結果、上前庭神経から記録される活動放電は、卵形囊平衡斑に由来するもののみとすることが可能となった。

この後、平衡斑全体に一樣に砂鉄を留置し、平衡斑直下に挿入した電磁石へ矩形波直流電流を通电することで刺激を行った (図 2)。なお、活動放電は、内外二本の Ag-AgCl ガラス吸引電極を用いてオシロスコープへ誘導記録 (A.C. 記録) すると同時に、electric pulse counter で刺激開始直後 1 秒間の $50\mu\text{V}$ 以上の放電数を計算した。

一部の実験では、phasic component の反応の推移を明確にする目的で、吸引電極より誘導された A.C. 電位と全波整流後積分し、D.C. 増幅を行い Pen Recorder で記録した (D.C. 記録) (図 1)。

実験結果

図 1 の D.C. 記録でわかるように、phasic component は、0.8A の持続刺激に対し 5 秒から 8 秒の時間経過で adaptation を示す。図 3 には、phasic component の刺

Fig. 3 Stimulus-response relationship of the phasic component.

left side: the integrated recordings of the phasic components responded to various stimulus intensity.

right side: stimulus-response curve of the phasic component. Abscissa: square of the stimulus current; Ordinate: amplitude of the phasic component. The amplitude of the phasic component increased monotonically with the stimulus intensity.

激・反応関係を示してあり、刺激の強さの対数に比例して反応が増大することがわかる。なお刺激の強さは通電量の二乗に比例するため、通電量の二乗値を対数目盛にとってある。

1) phasic component の追加刺激に対する反応の検討

初回 0.6A の持続刺激を与えた後、さらに、0.3A または 0.6A の追加刺激を任意の時間に加重し、反応を Pen Recorder で記録した。

図4, 5 には、初回 0.6A の持続刺激 1 秒後、2 秒後、3 秒後および 4 秒後に、0.3A または 0.6A の追加刺激を行った際の記録を示してある。これより、追加刺激に対しても反応はほぼ同程度であることがわかる。また、追加刺激の大きさが初回刺激と等しい 0.6A の場合、初回刺激と追加刺激に対する反応量はほぼ一致した。

phasic component は持続刺激に対し 5 秒から 8 秒の時間経過で adaptation を示すが、かりに初回 0.6A 刺激によりすべての receptor が反応するのであれば、adaptation の時期に応じて追加刺激に対する反応も変化

するはずである。しかし、いずれの時期の追加刺激に対する反応もほぼ同程度であったことは、初回刺激によって反応しなかった閾値の異なる receptor が追加刺激に対して新たに反応で示したものと考えられる。さらに、初回刺激と追加刺激の大きさが等しい場合、その反応の大きさも等しくなったことは、閾値の異なる receptor においても刺激の変化量は正確に monitor されているものと思われた。

2) phasic component の同一反復刺激に対する反応の検討

刺激の強さ 0.8A 持続 1 秒間の同一刺激を、刺激間隔を 1 秒から 8 秒まで種々に変化させて 6 回反復して加え検討を行った。図 6 には、それぞれの刺激間隔において 5 例の実験結果の平均値をグラフに示してあり、初回刺激時の活動放電数を 100% として表示した。

刺激間隔が 8 秒の場合、反復刺激による放電数には全く変化を認めていない。しかし、刺激間隔が 8 秒以下になると、刺激の反復に従い漸次放電数の低下を認め、刺激間隔の短縮とともにその傾向はより著明となっている。図 1 に示すように、phasic component は 0.8A の

Fig. 4 The effect of the additional stimulus of 0.3A. (D. C. recordings)

The second stimulus was superimposed 1, 2, 3 and 4 sec following the first stimulus. The amplitudes of the potentials evoked by the second stimulus are almost the same, regardless of the timing of the second stimulus.

持続刺激に対して8秒近い時間経過で adaptation を示すが、0.8A 1秒間の短時間刺激においても、持続刺激の時の adaptation に応じた時期に一致して相対不応期が存在するものと考えられた。

3) 耳毒性抗生物質の卵形囊活動放電へおよぼす影響

耳毒性抗生物質の卵形囊活動放電への影響を調べるため、phasic component を指標として検討を行った。図7, 8は、それぞれ硫酸ストレプトマイシン（以下 SM と略）、および 3' 4'-dideoxykanamycin B（以下 DKB と略）を、Ringer 中へ低濃度より加え、各種濃度下での 0.8A 1秒間刺激時の活動放電数の変化を示してある。両グラフとも5例の結果を示してあり、薬剤作用前

Fig. 5 The effect of the additional stimulus of 0.6A. (D. C. recordings)

The amplitudes of the potentials evoked by the first and the second stimulus are almost the same.

の放電数を100%とした。SM では図7のごとく、600 γ /ml ではほぼ反応の消失が見られている。一方 DKB においては、図8に示すように、300 γ /ml ですでに5例とも完全な活動放電の抑制が生じた。

考 按

1933年、Werner²¹⁾ によって striola の存在が発見され、前庭耳石器の形態的な研究は今日かなり詳細な部分にまでおよんでいる。一方、生理学的な研究に関して見ると、Werner 以来半世紀を経た今日でも、striola の耳石器機能へ果たす役割についてさえ、ほとんど解明されていないのが実状である。

こうした耳石器についての生理学的研究、とりわけ末梢受容器としての刺激感受様式や、形態的特性と生理機

Fig. 6 Response of the phasic component to the same repeated stimulus.

The amplitude of the phasic component decreased in accordance with the shortening of the stimulus interval.

Fig. 7 Action of streptomycin on the phasic components of the utricular nerve.

The action potentials are almost diminished at the concentration of 600γ/ml.

能との関連性についての研究が立ち遅れている原因として、前庭器が持っている解剖学的特殊性があげられる。つまり、他の感覚器管に比べ、前庭耳石器はこれを単独で分離し刺激することが極めて難しく、耳石器単一の刺激反応様式について検討を行った報告はほとんど見あたらない。

原田 (1967, 1971, 1972)⁸⁾⁻⁹⁾ は、生体より摘出後も

Fig. 8 Action of DKB on the phasic components of the utricular nerve.

The action potentials are already disappeared even at the concentration of 300γ/ml.

比較的長時間にわたって反応を得ることのできるカエル迷路を用いて、半規管の刺激感受様式に関して詳細な検討を行っている。つまり、カエル摘出半規管を人工の内リンパ流で刺激することにより、Ewald の法則を電気生理学的に実証すると同時に、各種耳毒性薬物の半規管機能への直接作用についても報告を行っている。

原田のこうした実験をもとに、耳石器を単独で刺激する方法として、カエル摘出卵形囊平衡斑上に砂鉄を留置し、これを磁力で牽引する方法を試みた。その結果、既報 (Equilibrium Res. Vol. 42)¹⁸⁾ のごとく、卵形囊一次ニューロンの活動放電に関して、いくつかの知見を得ることが可能であった。

Precht, Llinas and Clark (1971)¹⁶⁾ は、カエルを用いた single unit の研究で、non-adapting unit は追加刺激に対し重畳現象をみとめ、角速度の大きさを正確に monitor しているが、adapting unit は追加刺激に対し重畳現象を全く認めなかったとしている。今回の、卵形囊一次ニューロン phasic component に関する追加刺激の検討においても、重畳現象は全く見られず、初回刺激・追加刺激に対して閾値の異なる receptor が別個に反応しているものと考えられた。さらに、閾値の異なる receptor においても、刺激の変化速度を正確に monitor していると思われた。

これらの事実より、卵形囊一次ニューロンの phasic component が、重力加速度の変化を正確に認知する上に重要な役割を果たしているものと予測された。

Taglietti, Valli and Casella (1973)¹⁰⁾ は、カエルの半規管活動放電に関して検討を行い、adapting unit はクラブの偏位速度を、non-adapting unit はクラブの位置を認知する上に重要であるとしている。こうした末梢前庭系活動放電に見られる反応様式の相異と生理機能の関連性についての研究報告は諸家によりなされているが、その大部分は半規管ないしは前庭神経核からの記録であり、単一耳石器に関する検討はほとんどない。

卵形嚢一次ニューロン活動放電に見られる phasic component と tonic component が耳石器機能に果たす役割をより詳細に検討すると同時に、striola を代表とする耳石器形態の特殊性が生理機能にいかなる役割を果たしているかを追求することは、今後の課題と思われる。

さて、耳毒性薬剤を卵形嚢平衡斑へ直接作用させ、活動放電におよぼす影響を検討した実験では、SM と DKB の二種類のアミノ配糖体系抗生剤を使用した。その結果 SM では 600 γ /ml において5例中3例はほぼ完全に反応が消失し、残る2例も著明な反応の低下を見た。原田のカエル半規管による実験でも⁹⁾、SM 500 γ /ml 以上ではほぼ完全な反応消失を認めており、同じ平衡器である耳石器も半規管とほぼ同程度の影響を受けるものと思われた。一方 DKB の場合、図8のごとく 300 γ /ml ですでに5例とも完全な反応消失が見られ、SM に比べてかなり強い卵形嚢活動放電への抑制作用が認められた。

各種アミノ配糖体系抗生剤における内耳障害の強弱に関する比較や、コルチ器と前庭器での薬剤間による易傷性の差についての検討は、これまでにかなり多くの報告が見られる。そして、こうした薬剤間での障害程度の相異に対する説明としては、薬剤の内耳移行に際して薬剤間で差があり、さらに内耳での薬剤の量的分布も異なるために障害様式に違いが生ずるという説と、薬剤そのものの感覚細胞に対する作用の差によるという説とがある。

つまり、豊田 (1974)²⁰⁾ は、モルモット鼓室内に SM およびカナマイシン (以下 KM と略) を注入し、内耳毛細胞変性様式を顕微鏡形態学的に検索した結果、SM、KM の両者において毛細胞障害の程度に差はなく、かつ、コルチ器においても前庭器においても、SM、KM に接しさえすれば同程度に障害されるとしている。従って全身投与に際し、臨床的にも実験的にも SM は前庭系障害が優位であり、KM のそれは聴覚系により優位であるという障害様式の差や、薬剤間で認められる障害程

度の強弱は、薬剤そのものの作用の違いによるものではなく、薬剤の内耳への到達量の差異、および内耳での薬剤分布の差によるものだと結論している。吉田 (1977)²³⁾ も限上 (1970)¹¹⁾¹²⁾ らの開発した茎乳突孔部からの顔面神経内注入方式を用いて、モルモット内耳への SM、KM の障害様式について、BSR、温度刺激検査、組織学的観察法で検索を行い、豊田を支持する結果を得ている。さらに Brummett (1978)³⁾ は、種々の薬剤を長期間投与した場合、外リンパ中の薬剤濃度の高いものに障害が強かったことより、やはり、聴器毒性の差は薬剤の内耳移行の多寡に関係するとしている。

こうした考え方に対して、大槻ら (1981, 1982)¹⁹⁾¹⁰⁾ は、家兎に各種アミノ配糖体系抗生剤を全身投与し、蝸牛毛細胞の形態学的検索を行った結果、薬剤間で外毛細胞の障害程度に大きな差が見られたにもかかわらず、外リンパ液中の薬剤濃度に有意差がなかったことより、薬剤間の聴器毒性の差を、薬剤そのものの内耳毛細胞に対する毒性の強さの違いによると報告している。相川 (1984)¹⁾ も、家兎を用いた茎乳突孔注入法による各種アミノ配糖体系抗生剤の聴器毒性評価を行い、各種薬剤間による蝸牛有毛細胞障害の程度は、全身投与による聴器毒性の強さとほぼ一致するにもかかわらず、外リンパ中および中耳腔貯留液中の薬剤濃度に有意の差が見られなかったとしている。Anniko (1983)²⁾ は、胎生16日目のマウス内耳の器管培養法を用いて、培養液中へ、Netilmicin, Gentamicin を加えることで有毛細胞へ薬剤を直接作用させ、障害様式について形態的な検討を行っている。その結果、大槻、相川らと同様に、アミノ配糖体系抗生剤間の聴器毒性の差の説明を、薬剤そのものの毒性の違いに求めている。

従って、卵形嚢感覚細胞に薬剤を直接作用させ活動放電の検討を行った、今回の実験で、薬剤間での作用に相異が認められたことは、障害様式を主に感覚細胞の形態面より捉えた大槻、相川、Anniko らの研究を、生理学的にも支持したものと思われる。

なお、アミノ配糖体系抗生剤の感覚細胞活動放電へおよぼす作用機序として、柳沢 (1981)²²⁾ は聴側線系受容細胞に対する Neomycin の検討を行っている。それによると、これら受容細胞に対するアミノ配糖体系抗生剤の作用は、まず細胞膜の表面で起こる現象であり、組織破壊を伴う不可逆的な作用は遅れて起こってくる第二段の変化と考えたほうがよいとしている。すなわち、側線器の機械的刺激に対する応答が Ca^{2+} によって増強する

一方, Neomycin が Ca^{2+} と拮抗的に作用することより, 細胞膜表面に存在して Ca^{2+} と結合する能力の高い, イノシトールリン脂質の一つの TPI (triphospho inoside) に耳毒性抗生物質が結合することで作用が発現するという。

従って, 薬剤間における耳毒性の差は, 薬剤の持つ感覚細胞への結合力の差によっても左右されるものと考えられる。さらに, 前庭障害の優位が良く知られている SM では, 蝸牛感覚細胞に比べ前庭感覚細胞への結合力がより強いことも推察される。

いずれにしても, 耳毒性抗生物質による内耳感覚細胞障害の程度は, 薬剤そのものの有する毒性の強さと, 感覚細胞に対する親和力との総和によって決定され得るものと思われる。

ま と め

カエル摘出卵形嚢の phasic component に関して検討を行うと同時に, phasic component を指標として, 耳毒性抗生物質の卵形嚢末梢受容器へおよぼす障害について追求し, 以下のような結論を得た。

- 1) 卵形嚢活動放電のうち, adaptation を有する phasic component には, 閾値の異なる receptor が存在した。
- 2) phasic component は, receptor の閾値が異なるものでも, 刺激の強さの変化を正確に monitor していると思われた。
- 3) phasic component は, 持続 1 秒間の単一刺激に対しても, 持続刺激の場合の adaptation に一致した時間経過で, 相対不応期を有するものと思われた。
- 4) SM, DKB の平衡斑感覚毛への直接作用により, SM では $600\gamma/\text{mL}$, DKB では $300\gamma/\text{mL}$ の濃度で, 活動放電のほぼ完全な消失を認め, SM に比べて DKB の方が前庭耳石器へより強い作用を有すると考えられた。
- 5) 耳毒性抗生物質が前庭感覚細胞へおよぼす障害の薬剤間による違いは, 薬剤そのものの有する毒性の強さと, 感覚細胞への親和力とによって決定されるものと考えられた。

参 考 文 献

- 1) 相川 通: 茎乳突孔注入法によるアミノ配糖体抗生剤の聴器毒性評価と毒性発現機序に関する実験的研究 日耳鼻 87: 981-991, 1984。

- 2) Anniko M: Aspects on the ototoxic potential of netilmicin. Acta Otolaryngol 96: 75-89, 1983.
- 3) Brummett RE, Fox KE, Brown RT et al: Comparative ototoxic liability of netilmicin and gentamicin. Arch Otolaryngol 104: 579-584, 1978.
- 4) Ewald JR: Physiologische Untersuchungen über das Endorgan des Nervus Octavus, Wiesbaden, JF Bergman, 1892.
- 5) Harada Y: Action of streptomycin, dihydrostreptomycin, neomycin and kanamycin on the ampullar receptors of the frog. Acta Otolaryngol 64: 327-337, 1967.
- 6) Harada Y: The isolation technique and electrical activity of the posterior semicircular canal of the frog. Equilibrium Res Suppl 2: 27-32, 1971.
- 7) 原田康夫: 蛙摘出後半規管受容器の動作流に関する研究 日耳鼻 74: 825-832, 1971.
- 8) 原田康夫: 蛙摘出半規管受容器の活動電位と Ewald の法則 日耳鼻 74: 1335-1339, 1971.
- 9) Harada Y: Potentials of individual semicircular canals in frogs and the effect of ototoxic drugs. Equilibrium Res Suppl 4: 44-52, 1972.
- 10) Katsuki Y, Yoshino S and Chen J: Action current of the single lateral line nerve fiber of fish. II on the discharge due to stimulation. Jap J Physiol 1: 179-194, 1950.
- 11) 限上秀伯: ウイルス性顔面神経麻痺および内耳障害の実験的研究 耳鼻臨床 63: 919-928, 1970.
- 12) 限上秀伯: 茎乳突孔からの注入法による実験的内耳障害について — とくに内耳への物質滲透経路について 日耳鼻 76: 464-467, 1973.
- 13) 中井義明 山本 馨 五十嵐 真: 鼓室内薬剤による内耳障害 Audiology 17: 190-197, 1974.
- 14) 大槻好正: アミノ配糖体抗生剤による家兎およびモルモットの内耳障害に関する比較研究 日耳鼻 84: 1424-1438, 1981.
- 15) 大槻好正 大谷 敏 相川 通 佐藤洋子 安斉友博 他: 各種アミノ配糖体抗生剤の内耳移行能と聴器毒性との関連性について Ear Res Jpn 13: 85-87, 1982.
- 16) Precht W, Llinas R and Clarke M: Physiological responses of fibers to horizontal angular

- rotation. *Exp Brain Res* 13: 378-407, 1971.
- 17) Shimazu H and Precht W: Tonic and Kinetic responses of cat's vestibular neurons to horizontal angular acceleration. *J Neurophysiol* 28: 991-1013, 1965.
- 18) 白根 誠: カエル摘出卵形囊の活動放電について *Equilibrium Res* 42: 16-20, 1983.
- 19) Taglietti V, Valli P and Casella C: Discharge properties and innervation of the sensory units in the crista ampullaris. *Arch Sci biol* 57: 73-86, 1973.
- 20) 豊田弥八郎: アミノ配糖体抗生物質による内耳障害様式に関する実験的研究 *耳鼻臨床* 67: 481-494, 1974.
- 21) Werner CF: Die Differenzierung der Maculae im Labyrinth inbesondere bei Saugetieren. *z. Anat Entwicklungsgesch* 99: 696, 1933.
- 22) 柳沢慧二: 聴側線器における Neomycin の分子的作用機構 *神経進歩* 25: 849-855, 1981.
- 23) 吉田 肇: 茎乳突孔よりの顔面神経注入による実験的内耳障害 — ストレプトマイシンおよびカナマイシンによる障害の比較 *Audiology Japan* 20: 78-96, 1977.

稿を終わるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師原田康夫教授に深謝いたします。さらに実験にあたり御助言と御教示を戴いた、鈴木衛先生、技官村尾学氏を始め教室員の皆様に謝意を表します。

なお、本論文の要旨は第41・42回日本平衡神経科学会総会、第84回日本耳鼻咽喉科学会総会において発表した。

本研究の一部は、昭和57・58年度文部省科学研究補助金（課題番号 57771048）を受けて行われた。

（原稿受付 昭和 59. 10. 31日）

別刷請求先 〒734 広島市南区霞 1-2-3

広島大学医学部耳鼻咽喉科学教室 白根 誠