Anoxia-sensitive Negative EP の動物種差に 関する検討

小林 俊光*・草刈 潤*・R. Thalmann**

Anoxia-sensitive Negative Endolymphatic Potentials (EP) in Mammals other than the Guinea Pig

Toshimitsu Kobayashi and Jun Kusakari

(Tohoku University)

Ruediger Thalmann

(Washington University)

It has previously been shown in the guinea pig that the negativity of the EP induced by systemic or perilymphatic application of the "loop" diuretics (such as ethacrynic acid, furosemide and bumetanide) is sharply reduced by ischemia or other types of anoxia.

Recently Boshier [J. Physiol. 293 (1979)] reported that he could not detect the anoxia-sensitive negative EP following application of ethacrynic acid in the rat.

In a systematic series of experiments we have found that this potential is present to a comparable degree in the rat and guinea pig, following both systemic and perilymphatic application of "loop" diuretics. Moreover the potential is present in chinchillas and dogs. The anoxia-sensitive negative EP thus appears to be a generalized response to "loop" diuretics in mammals.

In addition we have found that this potential is also present following application of a new "loop" diuretic, piretanide.

は じ め に

蝸牛内リンパ電位 (EP) は蝸牛内リンパ腔で記録される正の直流電位で、その大きさはモルモットの蝸牛基底回転では、約 80~90 mV である。現在最も広く受け入れられている説¹⁾によると、EP は約 100~120 mV の正の電位と約 -30~-40 mV の負の電位の和であるとされる (図 1)。正の電位は血管条から内リンパ腔への K⁺ イオンの能動輸送によるものである²⁾と考えられており、負の電位は K⁺ イオンの diffusion potential であるという説³⁾が有力である。この正の電位は、anoxia⁴⁾ (図 1) やその他の酸化⁵⁾ および解糖代謝⁶⁾ の阻害やエタクリン酸、フロセミド、ブメタニドなどのループ利尿剤⁷⁾ (図 2) およびウアバイン^{8) 9) 10)} などに極めて感受性が高い。一方、EP の負の電位はこれらに対して感受性が低い。その結果、上記のいずれの場合にも EP は負に極性が変化する

*東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 河本和友教授)

**ワシントン大学耳鼻科

図 1 EP の構成に関する Kuipers の説.

図 2 フロセミド静注による EP の変化 (モルモット).

る(図1)。

以上の2つの電位に加えて、EPの第3の成分というべき電位の存在が、モルモットを用いた実験で、Thalmann et al (1973)¹¹⁾, Sellick and Johnstone (1974)¹²⁾ によって報告された。この電位は、anoxia-sensitive negative potential あるいは negative electrogenic potential と呼ばれる。すなわち、エタクリン酸(EA)の静注または外リンパ灌流に際し、EPが最も抑制されたときに、anoxia とすると、EPの上昇(負値の減少)をみる。この現象は、EAに対しては抵抗性があり、かつ anoxia に感受性の高い負の電位の存在を示唆するものと解釈される。さらに、Sellick and Johnstone(1974)¹²⁾ は、卵形嚢でも同様の電位がみられると報告している。以来、今日までわれわれは、エタクリン酸の他、フロセミド(FU)⁷⁾、ブメタニド(BU)¹³⁾¹⁴⁾ などのループ利尿剤で、同様の現象を観察している。

一方、Bosher (1979)³⁾ は、anoxia-sensitive negative potential がラットにはみられないとし、この電位に動物種差が存在すると提唱している。

従来、この電位はループ利尿剤の研究の副産物的に扱われ、大きな注目を集めることが少なかった。しかし、われわれは、この電位が従来考えられた程小さくなく、蝸牛の電気生理、イオンの動きなどを考えるとき無視できないと考え、この電位の動物差について詳細な検討を行った。さらに、従来のループ利尿剤EA、FU、BUに加えて最近開発されたループ利尿剤、ピレタニド(Piretanide)で、この電位がみられるかどうか検討した。

実験方法

有色モルモット(体重約300g)50匹、ラット(Sprague-Dawley 種、体重約300~400g)25匹、チンチラ(体重約400~600g)4匹、イヌ(体重約10kg)3匹を用いた。

モルモット、ラット、チンチラはネンブタールで麻酔後、気管切開、筋弛緩後、人工呼吸を行なった。イヌはネンブタールで麻酔し自発呼吸下に管理した。

EPの記録は、150mM KClを満したガラス管微小電極(先端1~2 μ m)を用い、Ag-AgCl線を介してDC増幅器(Grass P-18)にて増幅後、デジタル電圧計ならびにX-Yレコーダで測定記録した。不関電極は、150mM NaClに浸したAg-AgCl線を用い、頸筋群上に置いた。

電極の刺入は、モルモットでは蝸牛基底回転のみのときは正円窓経由で、基底回転と第2回転のEPを同時に記録するときは蝸牛側壁血管条上に小孔を開けてラセン靱帯血管条経由で行なった。ラットではラセン靱帯血管条経由で側壁から基底回転、中回転のEPを、チンチラお

よびイヌは正円窓経由で基底回転のEPを記録した。

実験に用いた利尿剤はエタクリン酸(EA)、フロセミド(FU)、ピレタニド(PI)である。薬剤の静注は、モルモット、ラット、チンチラではEP測定耳と反対側の内頸静脈、イヌでは下腿の静脈に、あらかじめ留置したプラスチック・チューブから行なった。薬剤の注入は、約1~1.5分間かけてゆっくり行なった。外リンパ灌流により薬剤を投与する場合は、モルモットでは基底回転の鼓室階(ST)に開けた小孔(径約100 μ)を入口とし、前庭階(SV)に作製した小孔を出口とした。どちらか一方の外リンパ腔を選択的に灌流する場合には、蝸牛頂に作製した小孔を出口とし、基底回転のSTあるいはSVから蝸牛頂へと灌流した。ラットの外リンパ灌流は基底回転から中回転へとSVのみを灌流した。いずれの場合もEP測定部位が十分に灌流されるように入出口を設置した。灌流速度は毎分6.8 μ lとした。

anoxia は、モルモット、ラット、チンチラ

では上行大動脈を切断して行ない、イヌでは筋弛緩後 air を静脈内に注入した、利尿剤の i. v. 投与後に anoxia とした時の EP の上昇 (anoxia-sensitive negative potential) のコントロールとしては、利尿剤投与のみで anoxia

を負荷せず経過を観察した群 (“control 1”) と利尿剤投与により EP が最低値に達した後も少量ずつ持続的に静注を続けた群 “control 2”) の条件の異なる 2 群のコントロールを作製した。その理由は実験結果の項に述べる。

結 果

1) モルモット

図 3 の実線は FU (100mg/kg) 静注時にみられる EP の anoxia-sensitive negative potential の代表例を示す。FU により EP が最低値 -48mV に達した時に anoxia (ischemia) とした時の EP の変化を示している。ischemia 後、短い潜時ののちに EP は、約 12mV/分 の速度で上昇を開始し 3 分後には、約 30mV 上昇し、 -16mV に達した。その後、EP はゆっくりした速度で徐々に低下したが、再び約 15 分後には緩徐に上昇を開始し、基線に向かった。この ischemia に対する EP の変化は、一緒に示した 2 つのタイプのコントロール実験、すなわち

①同量の FU 投与後に動物を ischemia とせずに EP を観察したもの (“control 1”), ② ischemia とすることなく、FU を持続的に静注したもの (“control 2”) のいずれと比較しても急峻である。ここで “control 1” は血中 (恐らくは同様に FU の作用部位である血管条) の薬剤濃度の経時的低下の影響を受けているはずであるので、ischemia 下では circulation の停止により薬剤が局所にとどまることを考えると、コントロールとして完全とはいえない。その点、“control 2” は薬剤の血中濃度が比較的一定に保たれることから ischemia 時の状態と近く、より妥当なコントロールといえ

図 3 フロセミド静注後にみられる、anoxia-sensitive negative potential (実線) (モルモット). “control 1” “control 2” については、本文参照。

る。結果的には、どちらのタイプのコントロールと比較しても、ischemia 負荷後のEPの上昇は、より急峻であり、この反応は ischemia によりもたらされたものであると結論できる。

図4は、モルモットにPI (30mg/kg) を静注後、一方は ischemia とし、他方は ischemia とせずEPの自然経過を観察したものである。PI でも明らかな anoxia-sensitive negative potential がみられる。

2) ラット

図5はラットの外リンパ腔をEAで灌流した時のEPの変化ならびにその ischemia に対する反応を示す。 $10^{-2}M$ ($n=2$; 1例のみ図示) ではEPは減少し基線に近づくが負値を示さない。 $3 \times 10^{-3}M$ ($n=3$; 1例のみ図示) ではEPは小さな負値を示すにすぎず、ischemia としてもEPは不変であり、anoxia-sensitive negative potential がみられない。 $10^{-3}M$ ($n=2$; 図示せず), $3 \times 10^{-4}M$ ($n=2$; 1例のみ図示) ではEPが大きな負値を示し(図では約-40mV) ischemia に反応して

明確に上昇(負値が減少)した。なお、 $10^{-2}M \sim 3 \times 10^{-4}M$ のいずれの濃度を用いても、EPが最も抑制されたのち、ischemia にした時EPがさらに低下することはなかった。

図6は、ラットにおいて、EAおよびFUの静注後、EPが最低値に達した時に ischemia とした時のEPの変化を示す。いずれも ischemia に反応して、EPの急激な上昇がみられる。さらにFUを用いて、EPの変化を基底回転、中回転両方から同時に記録したものでは基底回転、中回転ともEPの変化は基本的には同じであった。EAでは、EPの最低値となるのに要する時間に個体差が大きいため、EA静注後の自然経過のときのEPの上昇速度との比較だけから、anoxia-sensitive negative potential ありと判定することは難しい場合が多い。しかしながら ischemia に反応して常にEPがただちに上昇を開始することから(自然経過の場合には上昇を始める迄に多少なりとも潜時がある) ischemia に対する反応であることは明らかであった。これに加えて、FUの持続的静

図4 ピレタニド静注後にみられる、anoxia-sensitive negative potential (実線) (モルモット)。

図5 ラットの外リンパ腔を各濃度のエタクリン酸で灌流した時のEPの変化. 低濃度 ($3 \times 10^{-4} M$) の灌流で, anoxia-sensitive negative potential がみられる.

図6 ラットにエタクリン酸またはフロセミドを静注した時にみられる anoxia-sensitive negative potential.

図7 チンチラおよびイヌの anoxia-sensitive negative potential.

注(図6 — —)と比較すると, anoxia-sensitive negative potential は, 一層明瞭であった.

3) チンチラおよびイヌ

図7の実線はチンチラにFU (100mg/kg)を静注後, EPが最低値に達した時に ischemia

とし, その後のEPの変化を観察したものである. 図7の— —はイヌにEA (50mg/kg)を静注後, ischemia としたものである. いずれの動物でも ischemia に反応してただちにEPが上昇し, 典型的な anoxia-sensitive negative potential がみられた.

考 察

われわれはモルモットにみられる anoxia-sensitive negative potential がラット, チンチラ, イヌでも存在することを発見した. このことは, この電位が哺乳類に共通の電位であることを強く推定させる. また, PIでも他のループ利尿剤同様, この電位がみられることもわかった.

これに対して, Boshier³⁾ (1979) は, この電位がモルモットには存在するが, ラットには存在しないとしている. Boshierの実験結果を図8に示した. 彼は, EA $10^{-3}M \sim 3 \times 10^{-2}M$ を外リンパ灌流した. $10^{-2}M$ 以上では, われわれの結果と同様にEPは大きな負値を示していな

い. この理由は彼も述べているように, 高濃度のエタクリン酸が蝸牛の膜透過性を変化させたためであろう. しかし, $10^{-3}M$ では, 比較的大きな負値が得られているにもかかわらず, ischemia に対してEPはさらに減少(負値の増大)するという結果が得られており, ischemia に反応し明確なEPの上昇(anoxia-sensitive negative potential)をみとめた, われわれの結果とは違っている. 彼はこの所見に基いて, ラットには anoxia-sensitive negative potential が存在しないとした. そして, このことから, Boshier¹⁵⁾ は, ラットにはこの電位が存在しないので, ラットを用いる方がモルモットを

図8 Boshier (1979) による, エタクリン酸を外リンパ灌流した時のEPの変化. モルモット(破線)では, anoxia-sensitive negative potential があるが, ラット(実線)ではそれがない, と報告している. (Boshier (1979), 一部改変)

用いるよりも, イオンの透過性に関する実験結果の解釈が単純であると考えた. しかしながら, 今回の結果によると, このような単純化は適当でないことになる. さらにわれわれは, チンチラ, イヌにもこの potential が存在することを発見した. このことからこの potential は, 広く哺乳類に存在するものと考えられる.

anoxia-sensitive negative potential は, モルモットでもラットでも静注にくらべ, 外リンパ灌流のときに小さい. その理由は, 今のところ明らかでない. 最大負値が静注にくらべ外リンパ灌流のときに小さいこと, 灌流液の濃度が非常に高くなると最大負値は逆に小さくなること, 外リンパ灌流法では最大負値を得るまでの所用時間が長いことなどから推論すると, 外リンパ灌流では anoxia-sensitive negative potential も徐々に障害されて, EP値が最大負値に達するまでにその大きさを減じてしまうためとも考えられる.

今回, anoxia-sensitive negative potential の有無の判定に2種のコントロールを用いた. 結果の項にも述べたように, 血流の有無による薬剤の kinetics の相違を考慮したためである. すなわち“control 1”では, 薬剤の血中ならびに局所濃度の減少があるため, 薬剤を持続的に静注する“control 2”の実験を行なった. その結果 ischemia 後のEPの上昇は, いずれのコントロールよりも有意に急峻であり, ischemia によって生じる反応であることが証明された.

さらにわれわれは, ischemia とすることなく Na cyanide をFU投与後に外リンパ腔へ灌流することによっても, 全く同様の反応がみられることを観察している. 従ってこの反応には血流の遮断 (ischemia) が必要なのではなく, anoxia (その形は ischemia でも histotoxic anoxia でもよい) があれば起こることが明らかとなっている.

この電位に関しては、その発生のメカニズム、蝸牛内責任部位、常在するものかどうかなど未だ不明の点が多い。Sellick and Johnstone¹²⁾は、ループ利尿剤投与により marginal cell の Na が上昇し、正常下では marginal cell の Na が低いので不活性化である Na-K ATP ase 系が活性化されて、この電位が生ずると考えている。しかしながら近年 Marcus et al¹⁶⁾, Morgenstern et al¹⁷⁾ (1981) によれば、血管条の marginal cell の Na は正常下でも充分高く Na-K ATP ase 系の活性化に充分な濃度である。従って Sellick and Johnstone の説も現象を十分に説明するに足りない。

さらに最近われわれは、解糖阻害剤モノヨード酢酸 (Iodoacetic acid: IAA) 中毒時にも、類似の potential がみられることを発見した¹⁸⁾。モノヨード酢酸がエネルギー産生を強力に阻害するのに対し、ループ利尿剤はエネルギー

利用の障害が主作用⁷⁾と考えられる。従って、両者にみられる anoxia-sensitive negative potential は全く別の機序で、それぞれによる中毒時に生じているのかもしれない。あるいは、この電位が正常の蝸牛内でも存在し、ループ利尿剤やモノヨード酢酸などによる anoxia-sensitive な正の電位の抑制に際し、unmask されて明らかとなるのかもしれない。後者の考えに従って図1を書き直すと、図9のようになる。この場合、anoxia-sensitive negative potential はEPの positive component よりも、ループ利尿剤やモノヨード酢酸に対して感受性が低いと考えることになる。

いずれにしても、anoxia-sensitive negative potential は無視できるほど小さくなく、従来考えられたような動物種差もみられない。よって、この電位の重要性が再認識されるべきだろう。

図9 われわれの、EPの構成に関する仮説。図1に、anoxia-sensitive negative potential を加えたもの。

ま と め

1) anoxia-sensitive negative potential は Boshier の報告に反して, モルモットのみでなくラット・チンチラ・イヌなど, われわれの調べた全ての動物にみられた. よって, この電位は動物種を問わず, 哺乳類に普遍的に存在する可能性が強い.

2) この電位はエタクリン酸, フロセミド, ブメタニドの他, 新しいループ利尿剤ピレタニド中毒時にもみとめられる.

河本和友教授の御校閲を深謝致します.

文 献

- 1) Kuipers, W. and Bonting, S. L. : The cochlear potentials. II. The nature of the cochlear endolymphatic resting potential. *Pflügers Arch.* 320 : 359~372, 1970.
- 2) Sellick, P. M. and Bock, G. R. : Evidence for an electrogenic potassium pump as the origin of the positive component of the endocochlear potential. *Pflügers Arch.* 352 : 351~361, 1974.
- 3) Boshier, S. K. : The nature of the negative endocochlear potentials produced by anoxia and ethacrynic acid in the rat and guinea-pig. *J. Physiol.* 293 : 329~345, 1979.
- 4) Konishi, T., et al. : Effect of anoxia on cochlear potentials. *Jour. Acoust. Soc. Amer.* 33 : 349~356, 1961.
- 5) Konishi, T. and Kelsey, E. : Effect of cyanide on cochlear potentials. *Acta Otolaryngol.* 65 : 381~390, 1968.
- 6) Thalmann, R. et al. : Noxious effects upon cochlear metabolism. *Laryngoscope* 87 : 699~721, 1977.
- 7) Kusakari, J. et al. : Effect of ethacrynic acid, furosemide, and ouabain upon the endolymphatic potential and upon high energy phosphates of the stria vascularis. *Laryngoscope* 88 : 12~37, 1978.
- 8) Kuipers, W. : Cation transport and cochlear function. Thesis, University of Nijmegen, 1969.
- 9) Konishi, T. and Mendelsohn, M. : Effect of ouabain on cochlear potentials and endolymph composition in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 69 : 192~199, 1970.
- 10) Boshier, S. K. : The effect of inhibition of the strial Na-K activated ATP ase by perilymphatic ouabain in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 90 : 219~229, 1980.
- 11) Thalmann, R. et al. : Dysfunctions of energy releasing and consuming processes of the cochlea. *Laryngoscope* 83 : 1690~1712, 1973.
- 12) Sellick, P. M. and Johnstone, B. M. : Differential effects of ouabain and ethacrynic acid on the labyrinthine potentials. *Pflügers Arch.* 352 : 339~350, 1974.
- 13) Kusakari, J. et al. : Reduction of the endocochlear potential by the new "loop" diuretic, bumetanide. *Acta Otolaryngol.* 86 : 336~341, 1978.
- 14) 六郷正曉, 他 : ループ利尿剤投与時にみられるいわゆる "negative electrogenic potential" の検討. *Audiology Japan* 22 : 100~104, 1978.
- 15) Boshier, S. K. : The nature of the ototoxic actions of ethacrynic acid upon the mammalian endolymph system. I. functional aspects, *Acta Otolaryngol.* 89 : 407~418, 1980.
- 16) Marcus, D. C. et al. : Changes in cation contents of stria vascularis with ouabain and potassium-free perfusion. *Hearing Res.* 4 : 149~160, 1981.
- 17) Morgenstern, C. E., et al. : Formation of inner ear fluids-permeability of inner ear membranes. In : *Proc. Sixth Shambaugh Int. Workshop on Otomicrosurgery and Third Shea*

Fluctuant Hearing Loss Symp. Editors : G. Shambaugh and J. J. Shea. Strode Publishers, Huntsville, Ala., 1980.

- 18) Kobayashi, T. et al. : Effect of iodoacetic acid upon cochlear potentials. Jour. Acoust.

Soc. Amer. Suppl. 70 : s28, 1981.

原稿到着：昭和57年8月26日

別刷請求先：小林俊光

〒973 いわき市内郷御厩町久世原16
いわき共立病院耳鼻咽喉科