研 究

モルモット内耳における内リンパ pH について

辻川 覚志・山下 敏夫・張 久幸
熊澤 忠躬・K.-H. Vosteen*

Endolymph pH in the Inner Ear of Guinea Pigs

Satoshi Tsujikawa, Toshio Yamashita, Hisayuki Cho and Tadami Kumazawa
(Kansai Medical University)K.-H. Vosteen
(Düsseldorf University)

The pH values of endolymph in the inner ear of guinea pigs were studied with the use of H^+ selective double-barreled microelectrodes. The pH in the endolymph was similar in the cochlea (7.54 ± 0.06 , $n=12$), in the saccule (7.54 ± 0.04 , $n=7$) and in the utricle (7.53 ± 0.06 , $n=7$) under different DC potentials in each endolymphatic space. The intravenous injection of ethacrynic acid resulted in a significant increase of pH value in the cochlea but not in the saccule and the utricle. The possibility that different mechanisms producing the endolymph pH may exist in different parts of the inner ear is discussed.

Key words: endolymph pH, ethacrynic acid, inner ear, guinea pig

はじめに

pH が変動すると酵素活性など生体にとって重要な活動が大きな影響を受ける¹⁾ことが知られており、細胞内液ならびに細胞外液の pH は、複数の調節機構によって制御されていると言われている。内耳においては、蝸牛内リンパ pH が外リンパ pH ならびに血液 pH と近似した値をとるとされ、蝸牛の内リンパ内の高い静止電位 (80 mV) に抗して 1 価の陽イオンであるイオン化水素イオンの濃度、すなわち pH 値を保つため、酸または塩基の能動輸送の存在する可

能性が蝸牛において論じられてきた²⁾³⁾。一方内耳各部位の内リンパ静止電位は異なっており、それぞれの部位で特有のイオン環境を維持していることが推測されている⁴⁾。したがって、各部位で内リンパ静止電位が内リンパ水素イオンに及ぼす影響は異なっていることが予想される。そこで内リンパ pH 維持機構を研究していく一環として、蝸牛、球形嚢、卵形嚢における内リンパ pH を測定し、さらにループ利尿剤の一つであるエタクリン酸並びにアノキシアの負荷による影響を検討した。

関西医科大学耳鼻咽喉科学教室（主任：熊澤忠躬教授）

* デュッセルドルフ大学医学部耳鼻咽喉科学教室

対象と方法

正常ブライエル反射を示す有色モルモット30匹(200 g~400 g)を使用し, 25%ウレタン麻酔(6 ml/kg, i. p.) 下にて気管切開を施行し室内空気にて自然呼吸下とした. H^+ 選択性二連型微小電極は先端径2~5 μm とし, イオン測定側の微小ガラス管は内壁をシアン化した後, 先端にイオン選択性キャリア(Fluka 社製82500)を充填し, その残りの空間をバッファ液(0.04 M KH_2PO_4 , 0.023 M NaOH, 0.015 M NaCl, pH 7.0)⁵⁾にて満たし, シリコンゲルで封じた. また静止電位測定側の微小ガラス管には160 mM KCl 溶液を満たした. それぞれを差動型アンプ(Model FD223, WPI)に接続し, 不関電極(Ag-AgCl 線)は頸筋に固定した. 校正液ならびに実験動物は保温器にて37°Cに保持した. このpH電極は市販の緩衝液(pH 6~8)に対して直線的応答を示し, 勾配は 53.8 ± 2.4 mV ($\pm$ SD, $n=25$)であった. 静止電位およびpHは平均 $\pm$ 標準偏差にて表した. 測定に際しては, 本電極を蝸牛では正円窓より基底回転に, 球形囊では卵円窓より耳石器のある方向に, 卵形囊では卵円窓を後方に拡大した後, 色素沈着のみられる方向に向かって刺入した. 各部位において電極刺入後, 動物を一過性に N_2 のみを呼吸させ, アノキシアに置くことにより静止電位の変化をみて内リンパ腔留置を確認した. その後静止電位およびpHが再び安定した時点で, エタクリン酸(60 mg/kg)を頸静脈に留置したカテーテルより2分間にて静脈投与した. 永続性アノキシアは致死量のネブプタールを急速に静

注することによって負荷した.

結 果

蝸牛, 球形囊, 卵形囊の各部位における内および外リンパのpHは近似した値であり, さらに外リンパpHは内リンパpHに比べ僅かにアルカリであったが有意差は認められなかった(表1). 永続性アノキシア後の内リンパpHは各部位(それぞれ $n=3$)とも同様の変化を示し, アノキシア直後より最初の約5分間は急速に, その後20分間はさらに徐々に酸性となっていた(図1). 一方, エタクリン酸投与後の内リンパpHの変化はこれと異なり, 蝸牛においてはエタクリン酸投与開始3分後に一過性と思われるアルカリ側への有意の変動が認められた

図1 内耳各部位の内リンパpHにおけるアノキシアの影響(各代表例)

表1 内耳各部位における内リンパ静止電位ならびにpHと外リンパpH

	内リンパ腔		
	蝸 牛	球形囊	卵形囊
静止電位	84.7 $\pm$ 4.4 (n=12)	0.9 $\pm$ 3.2 (n=7)	2.0 $\pm$ 3.1 (n=7)
pH (内リンパ)	7.54 $\pm$ 0.06 (n=12)	7.54 $\pm$ 0.04 (n=7)	7.53 $\pm$ 0.06 (n=7)
pH (外リンパ)	7.56 $\pm$ 0.07 (n=12)	7.60 $\pm$ 0.06 (n=7)	7.58 $\pm$ 0.05 (n=7)

図2 蝸牛の内リンパ pH と静止電位におけるエタクリン酸 (60 mg/kg) 静脈内投与の影響

図3 球形囊の内リンパ pH と静止電位におけるエタクリン酸 (60 mg/kg) 静脈内投与の影響

図4 卵形囊の内リンパ pH と静止電位におけるエタクリン酸 (60 mg/kg) 静脈内投与の影響

(paired t-test, $p < 0.05$). また蝸牛内リンパ静止電位は pH のピーク後に時期を同じくして急速な低下が始まり、エタクリン酸投与後 9 分で最低値 (-38.5 ± 6.7 , $n=8$) を示した (図 2). 球形囊, 卵形囊ではエタクリン酸投与後に明らかな pH の変動が認められなかったが, エタクリン酸投与後の静止電位の変化は, 球形囊ではわずかな低下を示す一方, 卵形囊では測定時間 (20 分) 内では明らかな変化を示さなかった (図 3, 4).

考 察

本実験における内耳各部位の外リンパの pH 値は, わずかに内リンパ pH に比べアルカリ側にあったが, 両者に有意差はなく, さらに各部位間にも有意差が認められなかった. 蝸牛内リンパ pH は人工呼吸下で吸入する CO_2 濃度や中耳腔の CO_2 濃度を変化させると影響を受けることが知られている⁶⁾⁷⁾. 本実験はウレタン麻酔下の安定した呼吸下とはいえ自発呼吸下で行われており, さらに中耳腔は室内空気であることから, 個々の pH 値の個体間にばらつきが認められたことや軽度のアルカリであったことは, あるいはこれらの実験条件に起因するものかも知れない. しかしながら本実験において蝸牛の内外リンパの pH 値に有意の差を認めなかったことは, その高い内リンパ静止電位を考慮すると, すでに諸家²⁾³⁾⁸⁾によって論じられているエネルギーを使った内リンパ pH 維持機構が蝸牛に存在することを支持する結果と思われる.

アノキシアに対する内リンパ pH の反応は, 蝸牛, 球形囊, 卵形囊ともにアノキシア直後より酸性に傾いたが, 酸の一つであるエタクリン酸の経静脈投与では, 蝸牛においてエタクリン酸投与後数分間の一過性のアルカリ側への変化が見られた. この現象の解釈には 2 通りあるものと思われる. まず第一に, 本実験は自発呼吸下にて行われており, エタクリン酸の経静脈投与は実験動物の呼吸に過呼吸等の変化がしばしば現れた. このことは血中 pH の変化を生じせ

しめ、ひいては蝸牛内リンパの pH をも変化させた可能性が考えられる⁹⁾。もし血中の PCO_2 の変動が内リンパ pH に影響を及ぼすとするならば、球形嚢や卵形嚢ではエタクリン酸投与が内リンパ pH になんら影響を及ぼさなかったことから、これらの部位では蝸牛と異なり血中 pH は内リンパ pH に影響を及ぼさないこととなる。Misrahy ら⁶⁾は吸入ガス中の CO_2 濃度が蝸牛内リンパ pH に影響することから、蝸牛内リンパでは重炭酸塩緩衝系の存在を推定している。球形嚢や卵形嚢では内リンパ pH 維持機構が蝸牛とは異なっている可能性があるものと思われる。一方、第二の可能性として、エタクリン酸はすべての薬理作用が解明されたわけではないが、生体膜におけるイオン輸送やミトコンドリアの阻害作用、細胞における糖代謝に影響したりする作用など多くの薬理学的作用を持つことが知られており^{9)~11)}、これらの一つまたは複数の作用が想像上の蝸牛内リンパ pH 維持機構に作用してエタクリン酸投与後に内リンパ pH の変動がみられたのかも知れない。Forge¹²⁾は蝸牛においてエタクリン酸がまず最初に蝸牛内リンパ静止電位を産生しているといわれている血管条の上皮細胞内の pH や Ca 濃度の変化を引き起し、そしてこのことにより蝸牛内リンパ静止電位を低下せしめる可能性を推測している。本実験では細胞内 pH は測定していないが、あるいはエタクリン酸による蝸牛内リンパ pH の変化は、この血管条における細胞内 pH 変化と関連しているかも知れない。

エタクリン酸 (60 mg/kg) 全身投与の内リンパ静止電位における影響は、蝸牛、球形嚢では投与後低下を示したが、卵形嚢では測定した20分間においては著変を認めなかった。球形嚢内リンパ静止電位は蝸牛の静止電位の影響下にあると言われている¹³⁾¹⁴⁾。もしそうであればエタクリン酸投与後の球形嚢静止電位の変化はエタクリン酸が球形嚢上皮に作用したためでなく、エタクリン酸投与後の蝸牛内リンパ静止電位の変化を反映していることになる。また卵形嚢静

止電位はエタクリン酸の全身投与に対しては早期には影響を受けにくいことが知られている¹⁵⁾。したがって本研究でみられたエタクリン酸投与に対して球形嚢や卵形嚢での内リンパ pH の変化の欠落は、各々の部位で全身投与のエタクリン酸に対する感受性が蝸牛とは異なっていることを意味するものかも知れない。

結 語

1. 蝸牛、球形嚢、卵形嚢各部位で内リンパ静止電位は異なっていたが、内リンパおよび外リンパの pH 値は近似していた。

2. 蝸牛において内外リンパの高い静止電位差を考慮すると、内リンパ pH 維持機構の存在が推測された。

3. 内耳の各部位において想像上の内リンパ pH 維持機構に差がある可能性が考えられた。

本論文の要旨は、平成3年(仙台)の第38回日本基礎耳科学会において口演した。

文 献

- 1) Kuijpers W and Bonting SL : Studies on (Na^+ - K^+)-activated ATPase XXIV, localization and properties of ATPase in the inner ear of the guinea pig. *Biochim Biophys Acta* **173** : 477~485, 1969.
- 2) Ikeda K, Kusakari J, Takasaka T, et al : Early effects of acetazolamide on anionic activities of the guinea pig endolymph ; evidence for active function of carbonic anhydrase in the cochlea. *Hear Res* **31** : 211~216, 1987.
- 3) Sterkers O, Saumon G, Tran Ba Huy P, et al : Electrochemical heterogeneity of the cochlear endolymph ; effect of acetazolamide. *Am J Physiol* **246** : F47~F53, 1984.
- 4) Morgenstern C, Amano H and Orsulakova A : Ion transport in the endolymphatic space. *Am J Otolaryngol* **3** : 323~327, 1982.
- 5) Ammann D, Lanter F, Steiner RA, et al : Neutral carrier based hydrogen ion selective microelectrode for extra- and intracellular studies. *Anal Chem* **53** : 2267~2269, 1981.
- 6) Misrahy GA, Hildreth KM, Clark LC, et al :

- Measurement of the pH of the endolymph in the cochlea of guinea pigs. *Am J Physiol* **194** : 393~395, 1958.
- 7) Kusakari J, Ohyama K, Inamura N, et al : Gas analysis of the middle ear cavity in normal and pathological conditions. *Auris Nasus Larynx* (Tokyo) **12** Suppl : 114~116, 1985.
- 8) Arakawa E, Marcus DC and Thalmann R : Dependence of endocochlear potential on vascular pH. *Hear Res* **31** : 1~8, 1987.
- 9) Bosher SK : The nature of the ototoxic actions of ethacrynic acid upon the mammalian endolymph system. *Acta Otolaryngol* (Stockh) **89** : 407~418, 1980.
- 10) Gordon EE and Hartog M : The relationship between cell membrane potassium ion transport and glycolysis. *J Gen Physiol* **54** : 650~663, 1969.
- 11) Steen PA, Milde JH and Gronert GA : Inhibition of mitochondrial function is not the diuretic mechanism of ethacrynic acid in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* **224** : 594~597, 1982.
- 12) Forge A : Gap junctions in the stria vascularis and effects of ethacrynic acid. *Hear Res* **13** : 189~200, 1984.
- 13) Sellick PM, Johnstone JR and Johnstone BM : The electrophysiology of the utricle. *Pflugers Arch* **336** : 21~27, 1972.
- 14) Kusakari J, Kobayashi T, Arakawa E, et al : Saccular and cochlear endolymphatic potentials in experimentally induced endolymphatic hydrops of guinea pig. *Acta Otolaryngol* (Stockh) **101** : 27~33, 1986.
- 15) Mori N, Ninoyu O and Morgenstern C : Cation transport in the ampulla of the semicircular canal and in the endolymphatic sac. *Arch Otorhinolaryngol* **244** : 61~65, 1987.

(原稿受付：平成4年1月9日
原稿採択：平成4年2月3日
別刷請求先：辻川覚志
〒570 守口市文園町1
関西医科大学耳鼻咽喉科学教室)