

## Cl<sup>-</sup> free solution の蝸牛電気現象に及ぼす作用

吉 弘 剛, 佐藤 幸弘\*, 東川 康彦, 松村 幹郎, 折田 洋造\*

Endocochlear DC potential (EP) および Cochlear microphonics (CM) の形成における陰イオンの影響を検討するために, 外リンパ腔を Cl<sup>-</sup> free solution で灌流した. NaCl の Cl が methanesulfonate によって置換された Cl<sup>-</sup> free solution を灌流するとき, EP は  $75.0 \pm 3.56$  mV から  $55.0 \pm 5.63$  mV まで低下した. 同時に測定した CM も EP と同様の低下を示した. Cl<sup>-</sup> free solution によって EP, CM が低下した後, 標準人工外リンパ液にて再灌流を行ったが, EP, CM の回復は認められず, Cl<sup>-</sup> free solution による作用は非可逆性と考えられた. 本実験における EP, CM の低下は, 外リンパ液中の Cl<sup>-</sup> を減少させることによって血管条辺縁細胞の basolateral membrane に存在するであろうと考えられる Na-K-2Cl 協同輸送が減少し, 辺縁細胞の細胞内 Na<sup>+</sup> 濃度が低下した結果, EP を維持している Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ポンプの活性が低下したものと判断された. (平成6年2月14日採用)

## Effects of Chloride Removal on the Endocochlear DC Potential in Guinea Pigs

Tsuyoshi Yoshihiro, Yukihiro Sato\*, Yasuhiko Higashikawa, Moto Matsumura and Yozo Orita\*

The effects of chloride removal on the endocochlear DC potential (EP) and cochlear microphonics (CM) were investigated by perfusion through the perilymphatic space in guinea pigs. NaCl in artificial perilymph was replaced by Na-methanesulfonate.

When the perilymphatic space was perfused with Cl<sup>-</sup> free solution, the EP level decreased from  $75.0 \pm 3.56$  mV to  $55.0 \pm 5.63$  mV and the CM amplitude decreased with a similar time course to the change in EP. After the EP and CM reached final steady levels, immediate washing out with control solution did not produce restoration from the fall of EP and CM for at least 30 min. Therefore, the effect of Cl<sup>-</sup> free solution on the EP and CM was not reversible within the period examined.

The production of EP has been shown to involve the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump located at the basolateral membrane of the marginal cells in the stria vascularis. Perfusion with Cl<sup>-</sup> free solution may bring about inhibition of the Na-K-2Cl cotransport located on the same side of the marginal cells as the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump. As a result of this inhibition, a decline in the Na<sup>+</sup> level in the marginal cells causes inactivation of their Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> pump and the resulting fall in EP and CM. (Accepted on February 14, 1994)

川崎医科大学 生理学教室

〒701-01 倉敷市松島577

\* 同 耳鼻咽喉科学教室

Department of Physiology, Kawasaki Medical School :

577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-01 Japan

Department of Otorhinolaryngology

*Kawasaki Igakkaishi* 20(2): 61-66, 1994

- Key Words** ① Endocochlear DC potential ② Cochlear microphonics  
 ③ Na-K-2Cl cotransport ④ Chloride removal  
 ⑤ Na-methanesulfonate

## はじめに

蝸牛管の内リンパ液では  $[K^+]$  が高く、しかも蝸牛内直流電位は  $K^+$  の濃度差から予測される値とは正負が逆転し +80 mV の値を示している。主たる陰イオンである  $Cl^-$  に関して、Mori and Konishi<sup>1)</sup> は内リンパ液の  $[Cl^-]$  が 132 mM, 外リンパ液の  $[Cl^-]$  が 121 mM であるという値を報告しており、Ikeda and Morizono<sup>2)</sup> は内リンパ液の  $[Cl^-]$  が 143 mM, 外リンパ液の  $[Cl^-]$  が 110 mM であるという値を報告している。もし  $Cl^-$  が内外のリンパ液に受動的に分布しているとすれば、蝸牛内直流電位 (EP) = +80 mV とすると、Nernst の式から、

$$80 \text{ mV} = \frac{RT}{F} \ln \frac{[Cl^-]_e}{[Cl^-]_p}$$

となることが期待される。ここに、R は気体のガス常数  $1.987 \text{ cal} \cdot \text{deg}^{-1} \cdot \text{mole}^{-1}$ , T は絶対温度で体温では  $310^\circ\text{C}$ , F はファラディ常数  $23,062 \text{ cal} \cdot \text{Volt}^{-1} \cdot \text{equivalent}^{-1}$  であり、 $[Cl^-]_p$  は外リンパ液の、 $[Cl^-]_e$  は内リンパ液の  $Cl^-$  濃度である。これらの値を代入し、常用対数に書き直すと、

$$80 \text{ mV} = 61 \log \frac{[Cl^-]_e}{[Cl^-]_p}$$

となる。

したがって、 $[Cl^-]_e$  は  $[Cl^-]_p$  の約20倍に達するはずである。このことは、内外のリンパ液間にある細胞の  $Cl^-$  透過性はきわめて低く、また、蝸牛管から、鼓室階、前庭階、血管条のいずれかに向かう  $Cl^-$  の輸送が存在することを示唆している。そこで本実験においては、外リンパ腔を無  $Cl^-$  液で灌流し内外リンパ液間の細胞の  $Cl^-$  透過性および  $Cl^-$  輸送機序の EP 生成への関与を検討することを試みた。

## 実験方法

プライエル反射正常のハートレー系モルモット (250~350 g) を用いた。pentobarbital sodium 30 mg/kg を腹腔内に注入し麻酔した後、suxamethonium chloride にて不動化した。体温は自家製の保温器を用いて一定に保ち、動物を背位に固定し、気管切開後カニューレを気管内挿管し人工呼吸器によって呼吸を維持した。蝸牛の露出方法や EP・CM の測定は Sato<sup>3)</sup> の方法に順じて行った。3M-KCl を充填した硝子毛細管微小電極を蝸牛基底回転中央階に作製した小孔より刺入し、電極は高入力抵抗増幅器 (AVZ-8, 日本光電) に接続した。不感電極を頸筋に置き EP はペンレコーダー (R-102, 理化電気) で記録した。CM は 2000 Hz, delay time 2.0 msec, duration 20 msec の tone burst にて刺激し、オシロスコープ (VC-10, 日本光電) に表示し、記録した。外リンパ灌流は、基底回転鼓室階に灌流液の注入孔を開き、基底回転前庭階に流出用の小孔を開いて行い、灌流速度は  $10 \mu\text{l}/\text{min}$  とした。人工外リンパ液は 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4 に調整した。

薬液は人工外リンパ液中の NaCl のすべてを Na-methanesulfonate によって置換した。KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$  はそのままとし、それらの  $Cl^-$  は微量であるためこれを無視することにした。

## 結 果

硝子毛細管微小電極を蝸牛基底回転中央階に作製した小孔より刺入し、血管条經由にてその

先端が内リンパ腔に達すると EP が記録される。EP は +70 mV 以上得られた例のみを採用し、ここで CM がシリコン tube を通しての音刺激に反応して測定されることを確認した。灌流用の小孔から鼓室階より前庭階を通して人工外リンパ液の灌流を行い、約10分間 EP・CM に変化のないことを確認した後、灌流ピペットを抜去し、薬液を充満させた別のピペットに交換し再度挿入した。

以下の図において Time 0 は薬液にて灌流を開始した後 EP が低下した時点を示しており、灌流前および人工外リンパ液灌流時の EP レベルの一部は省略してある。

NaCl のすべてを Na-methanesulfonate によって置換した薬液における灌流を行ったところ EP は初期値 +75 mV から、約 4 分後より低下し始め10分後に +65 mV、20分後に +61 mV、そして最終値 +60 mV まで 15 mV 低下した (Fig. 1)。

さらに別の症例にて EP レベル及び CM 振幅を比較したところ、EP は初期値 +75 mV から、約 7 分後より低下し始め10分後に +58 mV、20分後に +51 mV、そして最終値 +51 mV まで 24 mV 低下し、CM は初期値を 100% とすると、10

分後に 90%、20分後に 80%、最終値 78% まで減少した (Fig. 2)。

次に別の例にて EP レベルが最終値まで低下した後、対照人工外リンパ液を灌流し wash out を試みた。EP は初期値 +71 mV から最終値 +48 mV まで 23 mV 低下し、ピペット交換時に数 mV 上昇したものの、その後約 20 分間の対照人工外リンパ液の灌流によってもほとんど変化を示さなかった (Fig. 3)。

上記 3 例を含む総数 7 例の結果を Table 1 にまとめた。EP は初期値  $75.0 \pm 3.56$  mV、10分後  $59.6 \pm 5.77$  mV、20分後  $55.3 \pm 5.77$  mV、最終値  $55.0 \pm 5.63$  mV と有意に低下した ( $p < 0.0001$ )。

## 考 察

本研究においては、人工外リンパ液の NaCl を Na-methanesulfonate で置換して外リンパ腔を灌流するとき、EP 約 20 mV 低下することを明らかにした。内リンパ液の [Cl<sup>-</sup>] が 143 mM とし、外リンパ液の [Cl<sup>-</sup>] が 110 mM とするときは Cl<sup>-</sup> の平衡電位は +7 mV であり、外リンパ液の [Cl<sup>-</sup>] を 10 mM にするとき平衡電位

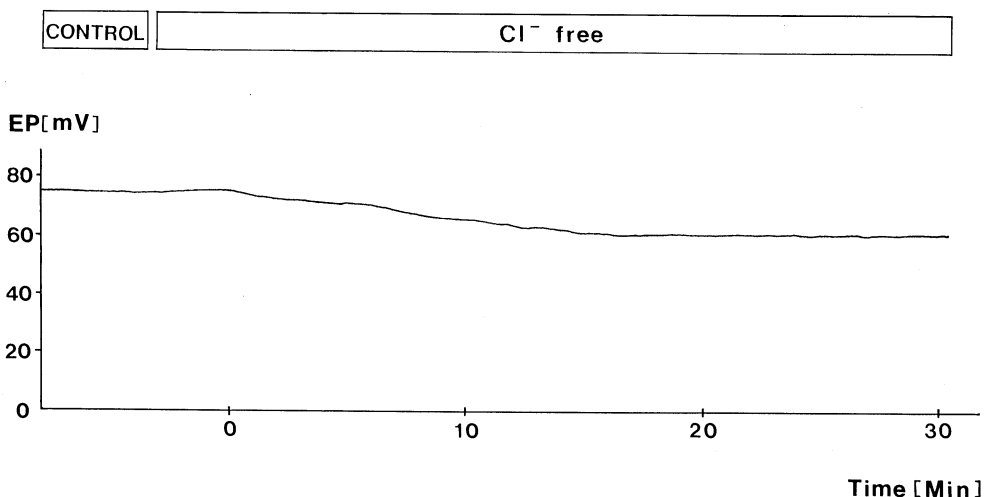


Fig. 1. Changes in EP during perfusion with Cl<sup>-</sup> free solution. EP started to fall after a latent period of 4 min and attained +60 mV in 30 min. Time 0 indicates the beginning of the fall of EP, not the start of perfusion of the test solution.

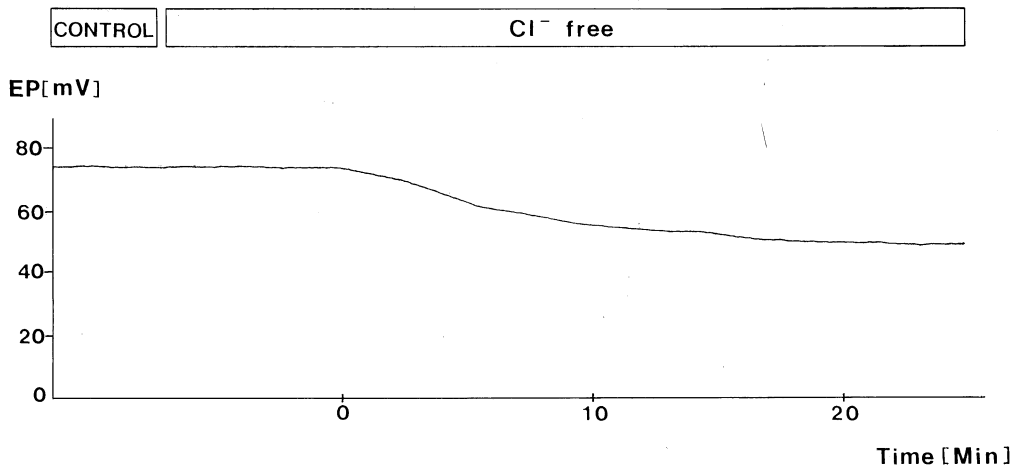


Fig. 2. Changes in EP and CM during perfusion with  $\text{Cl}^-$  free solution. EP started to fall after a latent period of 7 min and attained +51 mV in 30 min. The CM amplitude decreased with a similar time course to the change in EP and attained a minimum value of 78% of the control. Time 0 indicates the beginning of the fall of EP.

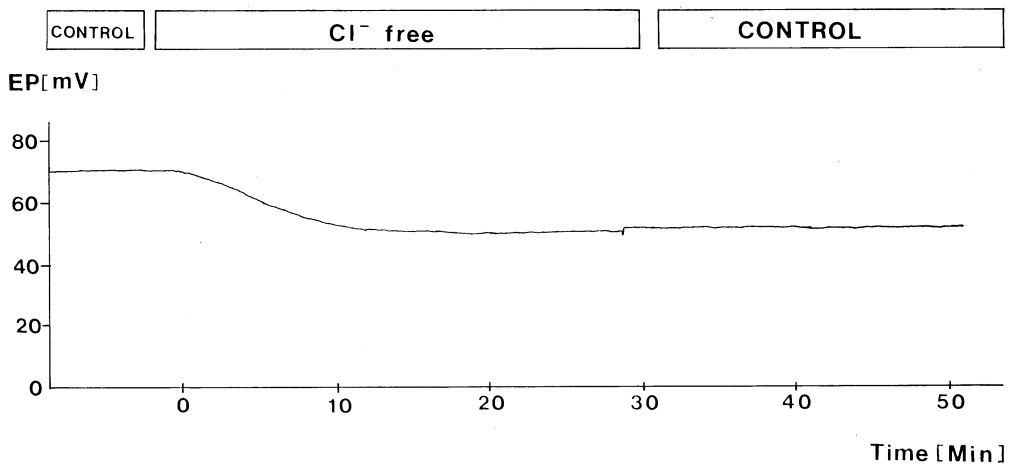


Fig. 3. Changes in EP during perfusion with  $\text{Cl}^-$  free solution and following washing out with control solution. EP started to fall after a latent period of 3 min and attained +48 mV in 30 min. The fall of EP was not restored by simple washing out with the control solution. Time 0 indicates the beginning of the fall of EP.

は+70 mVである。したがって、無Cl液で灌流するときはEPは上昇することが予想されたが、実際には反対に低下する結果を得た。内リ

ンバ腔をとりまく組織の $\text{Cl}^-$ 透過性は極めて低く、EP生成に対する $\text{Cl}^-$ の関与は極めて小さいと結論できる。

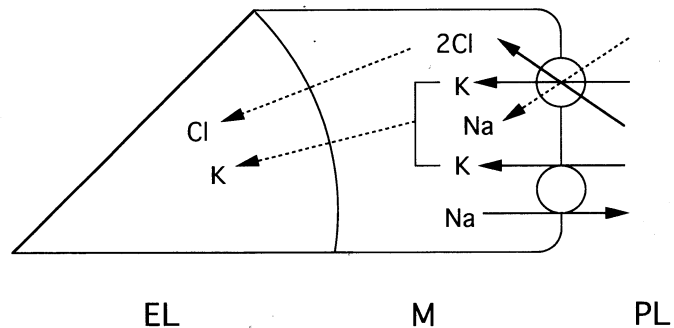
**Table 1.** Time course of the changes in EP during perfusion with Cl<sup>-</sup> free solution. Records of experiments No 1, 2, and 7 are shown in **Figs. 1, 2, and 3,** respectively.

No.	Initial EP (mV)	The time when EP began to decline (min)	EP after 10 min (mV)	EP after 20min (mV)	Final EP (mV)	ΔEP (mV)
1	75	4	65	61	60	-15
2	75	7	58	51	51	-24
3	80	4	62	60	60	-20
4	76	3	54	50	50	-26
5	70	5	58	55	54	-16
6	78	9	68	62	62	-16
7	71	3	52	48	48	-23
Mean±SD	75.0±3.56		59.6±5.77	55.3±5.77	55.0±5.63	-20.0±4.43

p<0.0001

内リンパ液の Cl<sup>-</sup> は血液よりもむしろ外リンパ液からとり込まれるとして説明されてきた<sup>4)</sup>。この Cl<sup>-</sup> 輸送に関して Sellick and Johnstone<sup>5)</sup> は蝸牛のイオン輸送に NaCl 協同輸送が存在する可能性を示唆しており、機能的・組織学的に辺縁細胞と類似している卵形囊や三半規管においては Na-K-2Cl 協同輸送阻害剤であるループ利尿剤が作用することが報告されている

(Marcus et al<sup>6)</sup>, Ferrary et al<sup>7)</sup>, Garvin et al<sup>8)</sup>). Kusakari et al<sup>9)</sup> はループ利尿剤が EP を低下させることを報告し, Rybak and Morizono<sup>10)</sup>らはさらに, ループ利尿剤が EP を低下させる時, 内リンパ液の K<sup>+</sup> 濃度が減少することを, Boshier<sup>11)</sup>は K<sup>+</sup> 濃度の減少および Na<sup>+</sup> 濃度の上昇することをそれぞれ報告している。それに加えて Rybak and Whitworth<sup>12)</sup> がループ利尿剤が EP を低下させるとともに Cl<sup>-</sup> 濃度も減少させることを報告し, 血管条辺縁細胞における Na-K-2Cl 協同輸送の存在が強く示唆されるようになった。Marcus et al<sup>13)</sup> は人工外リンパ液中の Cl のすべてを gluconate によって置換した液による血管灌流によって EP が低下したことも含めて, 血管条辺縁細胞への Na<sup>+</sup> の再循



**Fig. 4.** Model for transport of Na, K, and Cl.

EL : endolymph, M : marginal cell, PL : perilymph  
Solid lines indicate the opposing transport to the electrochemical potential; interrupted lines indicate passive transport.

環には Na-K-2Cl 協同輸送の関与があるのであろうと述べている。これらの結果から想定されるイオン輸送の機構を模式的に **Figure 4** に示す。Na-K-2Cl 協同輸送によって marginal cell に流入した Na<sup>+</sup> は, Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 能動輸送により細胞外へ流出する。Na-K-2Cl 協同輸送により流入した K<sup>+</sup> は Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 能動輸送により流入した K<sup>+</sup> とともに内リンパ腔に分泌され, 内リンパ液の [K<sup>+</sup>] を高い値に維持するとともに, 正の EP を形成する。Cl<sup>-</sup> もまた内リンパ腔に流出し内リンパ液の Cl<sup>-</sup> を高い値に維持するが, その透過性は極めて低いので EP の値に影響を与えないと仮定する (**Fig. 4**)。無 Cl<sup>-</sup> 液で外リンパ腔を灌流するとき, Na-K-2Cl 協同輸送が减弱し, その結果 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 能動輸送が抑制され,

同時に  $K^+$  の内リンパ腔への分泌も抑制されて、EP の低下がもたらされたと推測される。協同輸送による  $Cl^-$  の流入は、水の移動を伴うので、輸送の抑制は辺縁細胞および内リンパ腔の容積の減少をもたらすであろう。無  $Cl^-$  液灌流の効果が少なくとも調べられた時間内で回復しない事実の一因となっていると考えられる。

Kuijpers<sup>14)</sup> は外リンパ腔を  $Cl^-$  を  $SO_4^{2-}$  で置換した無  $Cl^-$  液で灌流しても EP には著変が

なく、 $Cl^-$  は EP の生成にあまり関与していないと報告している。しかしながら  $Cl^-$  の代替物として、 $SO_4^{2-}$  は 2 価イオンでイオン強度や浸透圧を変えるであろうし、 $HCO_3^-$  は pH を変化させると予測され適当な代替物 substitute とは考えられない。methanesulfonic acid は  $Cl^-$  に比して透過性が極めて低く<sup>15)</sup>、 $Cl^-$  を置換した陰イオンの種類が実験結果の差の原因であるとする。

## 文 献

- 1) Mori H, Konishi T: Permeability to chloride ions of the cochlear partition in normal guinea pigs. *Hear Res* 17: 227-236, 1985
- 2) Ikeda K, Morizono T: Electrochemical profiles for monovalent ions in the stria vascularis: Cellular model of ion transport mechanisms. *Hear Res* 39: 279-286, 1989
- 3) Sato Y: Effects of a calcium channel blocker and calcium chelating agents on cochlear electrical activity in the guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 108: 76-82, 1989
- 4) Sterkers O, Ferrary E, Tran BH, Amiel C:  $K^+$ ,  $Cl^-$ , and  $H_2O$  entry in endolymph, perilymph, and cerebrospinal fluid of the rat. *Am J Physiol* 243: F173-F180, 1982
- 5) Sellick PM, Johnstone BM: production and role of inner ear fluid. *Prog Neurobiol* 5: 337-362, 1975
- 6) Marcus DC, Marcus NY, Greger R: Sidedness of action of loop diuretics and ouabain on nonsensory cells of utricle: A micro-Ussing chamber for inner ear tissues. *Hear Res* 30: 55-64, 1987
- 7) Ferrary E, Bernard C, Sterkers O, Amiel C: Sodium transport across the epithelium of the frog semicircular canal. *Abstr Assoc Res Otolaryngol* 11: 236, 1988
- 8) Garvin JL, Spring KR, Santi PA: Secretion of endolymph by semicircular canals of the shark. *Am J Physiol* 255: F711-F719, 1988
- 9) Kusakari J, Ise I, Comegys TH, Thalmann I, Thalmann R: 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
- 10) Rybak LP, Morizono T: Effect of furosemide upon endolymph potassium concentration. *Hear Res* 7: 223-231, 1982
- 11) Boshier SK: The nature of the ototoxic actions of ethacrynic acid upon the mammalian endolymph system. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 89: 407-418, 1980
- 12) Rybak LP, Whitworth C: Changes in endolymph chloride concentration following furosemide injection. *Hear Res* 24: 133-136, 1986
- 13) Marcus DC, Rokugo M, Thalmann R: Effects of barium and ion substitutions in artificial blood on endocochlear potential. *Hear Res* 17: 79-86, 1985
- 14) Kuijpers W, Bonting SL: The cochlear potentials. II. The nature of the cochlear endolymphatic resting potential. *Pflügers Arch* 320: 359-372, 1970
- 15) Thorens S, Endo M: Calcium-induced calcium release and "Depolarization" induced calcium release: Their physiological significance. *Proc Japan Acad* 51: 473-478, 1975