

A STUDY ON RESPIRATORY ENZYMES IN THE STRIA VASCULARIS OF THE COCHLEA

By

K. KAWAMOTO & I. KAKIZAKI

From the Department of Oto-rhino-laryngology, Tohoku University School of Medicine, Sendai (Director. Prof. Y. Tsuiki)

The authors measured the activity of respiratory enzymes, mainly of the succinodehydrogenase system, in the stria vascularis in each turn of the cochlea by using a Cartesian-Diver. Then we observed the effect of KCN on the succinodehydrogenase system.

The result was as following.

1) The activity of succinodehydrogenase system was strongest in the basal turn of the cochlea, gradually weaker in the second turn and third turn and weakest in the apical turn.

2) After addition of 0.01 Mol KCN to the reactive solution.

The activity of the succinodehydrogenase system in each turn very apparently weakened in comparison with normal state, but still it was strongest in the basal turn and weaker in the second, third turn and weakest in the apical turn.

The difference of activity in each turn, however, was smaller than in the normal state.

血管帯における呼吸酵素に関する研究

(主としてコハク酸脱水素酵素系を中心にして)

東北大学医学部耳鼻咽喉科教室 (主任: 立木豊教授)

河 本 和 友 柿 崎 一 郎
カワ モト カズ トモ カキ サキ イチ ロウ

1. 緒 言

内耳の複雑微妙なる機能を維持遂行する上に必要なエネルギーに関する研究は、現在まで電気生理学的に、あるいは組織化学的に種々検索されてきたが、最近特に生化学的方面よりの研究はめざましいものがある。

又特に Tasaki¹⁾, Smith²⁾, Davis³⁾ 等の指摘する DC Potential (DC) の発生源とみなされる血管帯に関しては、漸く内外の研究者の注目する所となり、各方面より追求されつつある。

既に組織化学的には、血管帯に多糖類、蛋白質、各種の酵素等の存在が Wittmaack 以来多数の研究者により証明せられ、内リンパ液の組成に関しても、血管帯が撰択

的にこれの吸収あるいは分泌を司どるという研究が電子顕微鏡的観察及び組織化学的に、Ruedi⁴⁾, Engström⁵⁾, 渡辺⁶⁾, 高橋⁶⁾, 中山⁷⁾ 等により行われている。

このように血管帯の機能が次第に解明されるに従い、この部におけるエネルギー代謝が問題になるのは当然で、その様相を追求することは内耳代謝機構の一断面をのぞき得る点から大いに意義あるものと考えらる。

Vosteen^{8,9)10,11)}は既に蝸牛迷路の各種呼吸酵素群を組織化学的に検索し、コハク酸脱水素酵素及びチトクロームオキシダーゼが共に有毛細胞、血管帯、外螺旋韧带等に分布しており、特に血管帯において最も強い活性度を示すと報告している。又 Diaphorase の存在をも証明し、TCA

サイクルとの関連性を示唆している。このように漸次血管帯のエネルギー代謝は明るみに出されるようになった。かつて日比野¹³⁾は血管帯の呼吸は相当活潑であると報告し、小出¹⁴⁾は蝸牛組織の酸素消費量を測定し、水越¹⁵⁾は種々の内耳破壊による呼吸量の変化等の測定を行っているが、組織呼吸を特に血管帯における呼吸に関する酵素系の分析的検索及び定量的な活性度の測定等の面より追求せんとしたものは、未だ全く報告せられていない。

そこで我々はカーテンダイバー超微量検圧計を使用し、海狸血管帯のコハク酸脱水素酵素系を目標にして、その正常時における活性度を酸素消費量から定量的に測定することにより、この部における呼吸代謝様相の一端を窺うと共に、更に進んで刺激負荷時における代謝の様相を追求する基礎としたく本実験を企てた。

特にこの測定方法の特長を生かして、血管帯を各廻転別に摘出し測定したが、これは Cochlear frequency localisation から考えて、毛細胞の要する物理化学的エネルギーが各部位によりかなり差違があるものと推察され、かくすれば当然これに対応する血管帯のエネルギー代謝状態も廻転別に均等であるとは考え難い点に立脚している。又更にチトクローム系を阻害する KCN の効果をもあわせ検索し、若干の知見を得たので報告する次第である。

2. 実験方法

実験動物としては、体重 300gr 前後の海狸でブライン反射正常な健康なる動物を使用した。断頭後可及的に速かに側頭骨より中耳骨胞を分離し、双眼実体顕微鏡下に蝸牛膜様迷路を露出する。かゝる後、血管帯を螺旋靱帯と共に廻転別に分離採取するが、螺旋靱帯は血管帯の支持組織として緊密不離の状態にあるので、該靱帯を含めて血管帯を広義に解釈し、実験材料とした。この操作は蒸留水中において行つたが、これに要する時間は一耳につき 5～10 分間である。

酵素活性度測定法、血管帯組織中の主としてコハク酸脱水素酵素系による酸素消費量をもつて、その活性度の示標とした。この超微量の酸素消費量測定には Cartesian diver respirometer を使用した。この respirometer の理論及び操作の詳細は成書¹²⁾にゆづるが、これは μ -diver と云われ $10^{-3}\mu$ l の精度で反応室内のガス消費の測定が可能である。反応容器である diver 中には、極く少量の細胞組織片又は酵素標品と、その反応試薬の一定量をマイクロピペットを使用して充填し

た。更に diver 頸部にはガス拡散防止のためのパラフィンオイルシールをほどこす。diver の型は Carsberg-laboratory で用いているような有尾プラスチック型の標準型を使用した。diver 口部に加わる圧力が一定であるならば、頸部に封填されている空気のメニスカスが、diver 反応室中の微量のガス量変動により上下に移動する。即ちガス発生によつて上方に、ガス消費によつて下方に移動する。測定時には diver を浮かせてある浮遊液容器 (flotation vessel) に刻んである環状刻線にこの空気の上部メニスカスが一致するように、口部の圧を調節する。この圧の調節には flotation vessel に接続してあるマノメーターで行い、液柱差は 0.1cm まで読みとる。diver 内のガス量変化に対応して、10 分毎にこのマノメーターの液柱差を記録する。この液柱差からガス量変動を計算する。なおマノメーターの液はブローディ氏液を使用した。

今 diver が所定の位置に flotation medium (我々は硫酸アンモニウム比重 1.225 液使用) の中で浮いている場合この diver の口部に加わる圧力を P, diver 内の気相の量を V とし、次にガスの消費又は発生により充填された diver 全体の比重が変化した場合、外から diver に圧力を加減して、diver を上記の所定位置に浮かばせた時、この変化量を ΔP , 気相の変化を ΔV とすると、次の式が成立する (但し温度は一定)

$$\Delta V = \frac{\Delta P}{P} V$$

しかるに P はブローディ氏液なので一気圧の場合 1000cm であり、 ΔP もブローディ氏液液柱差で測定しているので

$$\Delta V = \frac{h}{1000} V$$

但し h は液柱差 (cm) である。

又 V は各 diver において次の計算式で求められる。

$$V = \frac{G_D + V_0\psi_0 + V_W\psi_W - V_0\psi_M - V_W\psi_M - G_D\psi_M/\psi_{gl}}{\psi_M}$$

G_D : diver のガラス全重量

V_0 : パラフィンオイルの容量

V_W 反応液の容量

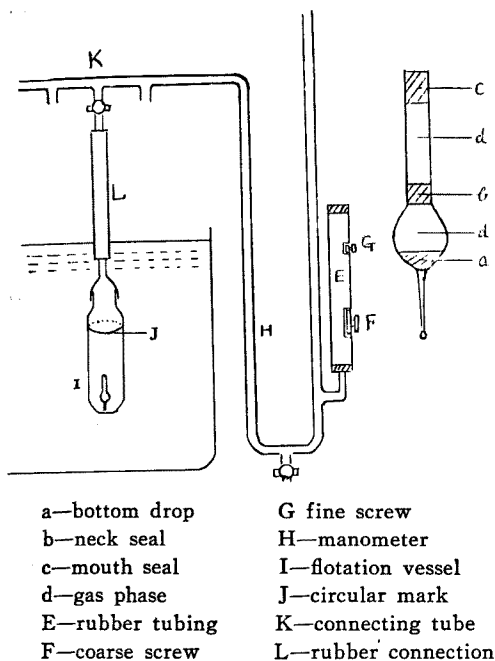
$\psi_0, \psi_W, \psi_M, \psi_{gl}$

パラフィンオイル, 反応液, 浮遊液, ガラス各々の比重

反応液組成

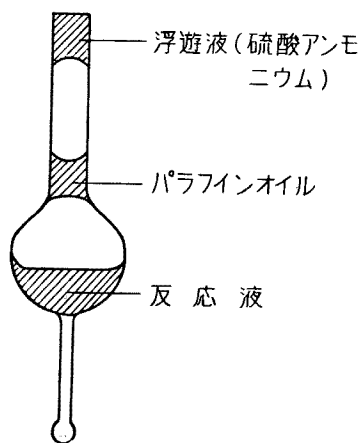
PH 7.4	0.1mol 磷酸緩衝液	2.3ml
	0.1mol メチレン青	0.3ml
	0.5mol コハク酸ソーダ	0.3ml
	蒸留水	1.0ml

第1図 Schematic drawing of measuring apparatus and diver



上記反応液を血管帯組織片と共に diver 反応室に 3 μ l 注入し、パラフィンオイル 6 μ l で diver 頸部を充填した。なお我々の使用した diver の V は約 20 μ l 前後のものである。

第2図



反応条件

25°C の恒温槽中に、flotation vessel を入れ diver を flotation medium 中に浮かばせてから 5 分後に測定を開始し、10 分毎に測定記録し約 90 分間観察した。

反応原理

反応液中のコハク酸ソーダに血管帯に存在するコハク酸脱水素酵素が作用して脱水素し、その一部の H_2 はチトクローム b を経て反応液中のメチレン青に伝達される。又一部の H_2 は, slater factor を経てチトクローム c にも伝達されるものと考えられるが、メチレン青の酸化還元電位はチトクローム c より低いので、diver 反応室中の気相の酸素は一部分還元メチレン青により消費される。又メチレン青より酸化還元電位の低い乳酸、焦性ブドウ酸等の代謝機構からの水素もメチレン青によりとられるものと考えられるので、コハク酸脱水素酵素のみの働きをみていると断定することは困難である。しかし、細胞内の諸基質によつて行われる代謝は、外から十分なコハク酸を与えられているコハク酸脱水素酵素による代謝より代謝活動は少ないものと想像されるが、この点については次の実験にゆだねることにした。又 25°C という特殊な状態では、細胞内呼吸がほとんど抑制されていると考えられるので、細胞内呼吸をほとんど考慮に入れずに、還元メチレン青の自酸化による酸素消費量を測定できると考えたが、この点に関しては、なお 37°C における自家呼吸及び還元メチレン青の自家酸化と比較する必要がある。又 TCA サイクルに関係する代謝がこの温度条件及びメチレン青を添加することにより、どのように変化するかという事は検討を要することで、これらの問題に関しては今後の実験において解決することにした。

次に基質液に KCN を添加すると、 CN^- はチトクロームオキシダーゼを可逆的に阻害するので、 CN^- の充分存在している条件ではチトクローム系を通じての酸素消費量を殆んど完全に除外できるが、同時に重金属イオンの関与している TCA サイクルの代謝機構をも阻害してしまうので、この系からメチレン青を通じて消費される酸素も除外することができる。そこで我々は 0.01 mol の KCN を基質液に加えた実験を行つてみた。

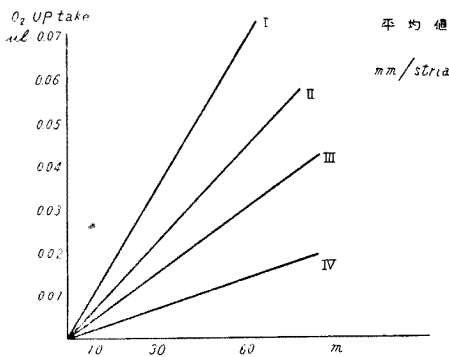
3. 実験成績

血管帯組織片による酸素消費量は全て血管帯の長さ 1mm につき換算し比較検討した。

その結果各廻転により酸素消費量に差異のある事を認めた。即ち基礎廻転がもつとも多くの酸素を消費し、第2廻転、第3廻転、先端廻転に行くに従い、順次その酸素消費量が低下して行く所見を第3図の如く認めた。反応はいづれの廻転においても最初は殆んど直線的に進行し、約60分以内では大体その傾向をとり、それ以上時間がたつと、反応室内気相の酸素喰い切り現象のためか

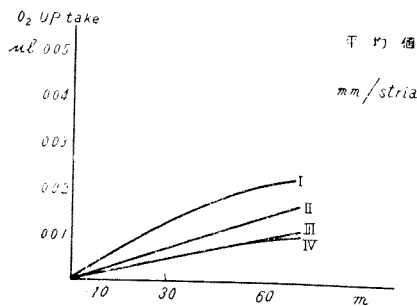
第3図

	10 分 後	30 分 後	60 分 後
(I)基礎廻転	0.012 μ l	0.035 μ l	0.07 μ l
(II)第2廻転	0.0075 μ l	0.022 μ l	0.045 μ l
(III)第3廻転	0.005 μ l	0.015 μ l	0.03 μ l
(IV)第4廻転	0.002 μ l	0.007 μ l	0.014 μ l



第4図

	10 分 後	30 分 後	60 分 後
(I)基礎廻転	0.005 μ l	0.013 μ l	0.021 μ l
(II)第2廻転	0.0025 μ l	0.007 μ l	0.014 μ l
(III)第3廻転	0.002 μ l	0.005 μ l	0.010 μ l
(IV)第4廻転	0.002 μ l	0.005 μ l	0.010 μ l



反応状態は不規則な乱れを生じてくる。

次に KCN を反応液に添加した場合における回転別の酸素消費量は第4図の如くで、前図と比較して回転別の差は少いが、やはり基礎回転より、第2、第3、先端回転への順に酸素消費量は低下を示している。

4. 総 括 及 び 考 按

血管帯における細胞エネルギー代謝状態を観察するのに、特に生化学的手段を用いる場合には、当然生体内での状態を十分考慮におかねばならない。特に組織片として取り出して、これを生化学的に研究する場合には、勿論 *in vivo* と同じ状態ではないから、*in vitro* の結果をもつて直ちに *in vivo* の状態を推測することは危険である。例えば血管帯は生体内では内耳液圧を受け、内リンパ液の特殊な成分に接し、更に細胞膜電位、滲透圧等物理化学的にみても、生体の他の組織器官と異なつた特異な状態にあり、その本来の解剖学的構造を破壊してエネルギー代謝を検索するということは、あるいは冒険であるかも知れない。しかしながら一方でき得る限り実験条件、手段等を同一にして、内耳の種々の病的状態における血管帯のエネルギー代謝を比較することは、細胞機能の様相を知る上に寄与する点が多いと思われる。又少なくとも *in vivo* の状態の何等かの反映をとらえる事は可能と思われる。偕て血管帯は先に述べた如く、様々の機能を有すると思われるが、特に最近 DC が血管帯に蓄積されたエネルギーに基づくと言われており、DC と CM との間には緊密な関係があるとされている。即ち Békésy¹⁰⁾ は mechanical なエネルギーが蝸牛において electrical なエネルギーに変換される際に、そのエネルギーにかなりの増幅が認められ、単に音の物理的な振動エネルギーのみが、electrical なエネルギーに変換するのではないと報告し、この機構に DC エネルギーが関与すると述べている。更に Gisselsson¹⁰⁾ は KCN を海馬の頸動脈内に注射して、DC、CM 共に低下することを認めているが、Vosteen¹⁷⁾ も同様に KCN を使用し、その影響を観察し、血管帯における呼吸酵素活性度が著明に低下していることを組織化学的に証明している。しかしながら毛細胞の酵素活性度は障害されず、この事より推察して、CM の発生源とされている毛細胞が無変化であるにもかかわらず CM の低下をみたことは、このエネルギー供給源である DC エネルギーの低下即ちそれは血管帯のエネルギー代謝の障害に帰因するものとしており、CM と DC 及び血管帯のエネルギー

代謝との間には相互に緊密な関係のあることを記載している。このように毛細胞と血管帯との間には相互に密接な関連性が存在すると共に又一面においては、これら各部位における代謝機構に種々なる特異性もあるものと推察される。しかしてかかる問題を生化学的に検討する場合、先づ毛細胞と血管帯とを別々に分離し、その各々の代謝機能を追求することは大いに興味あることを考える。特に先に述べたような種々の考慮の下に、カーテシヤンダイバーといった如き超微量測定装置の特長を生かして、これを活用することは意義ある事のように思える。次に Cochlear frequency localisation から推測して、毛細胞が各部位でその機能を遂行するためには、そのエネルギーの消費量が部位により異なる筈であり、この事は結局それに対応する部位の血管帯のエネルギー代謝にも関係するものと考えられる。高橋⁶⁾は組織化学的に各種の物質が血管帯において、基礎回転で高濃度に分布し、上方回転程それが減少していることを認めている。又中山⁷⁾の電子顕微鏡所見より、血管帯細胞の微細構造が基礎回転程密であり、上方回転程粗となつている事からも血管帯の機能は回転別に、ある程度差異あるものと考えられる。一方 Beck¹⁸⁾は核酸代謝の研究より、やはり蝸牛基礎回転において、最高のエネルギー代謝を営んでおり、先端回転はそれが低下している事を認め、更に Davis, Weber 等の蝸牛電気現象の観察にもとづけば、基礎回転は純音、複合音の別なく、高音低音共に明らかなる CM の発生を認め得ることからおして、基礎回転は常に刺激を感受し、これに伴うエネルギーの消費も他回転に比して大であり、細胞の代謝も活潑であろうと推察している。

本実験において得られた所見でも、上方回転より下方回転に行くに従つて酸素消費量が大きく、基礎回転で最大であることが認められた。本実験においては先に述べたように基質にメチレン青を入れてあるので、チトクローム c 以下の呼吸による酸素消費は一応ないものと考えてもよいが、メチレン青の還元要素としては、コハク酸酸化酵素の他に DPN Diaphorase, TPN Diaphorase につながる TCA サイクルの酸化還元系が存在するかも知れないので本実験における酸素消費量から決定的な事は勿論云えない。又基質に KCN を与えた場合には、どの酸化還元系が障碍されたか不明であるけれども先の結果より酸素消費量は減少し、しかも上方回転、下方回転での差が少なくなっている。これらの事は回転別に呼吸を介しての代謝機構に差異のある事を示唆すると共に、KCN により阻害される機構にも回転別の差異のあるものと考えることができる。

以上血管帯における呼吸、特に酸化還元機構に関する 2, 3 の実験結果を述べたが、多元方程式の僅か一式を

作り得ただけで、解を得るまでには残された問題が多い。今後細胞内呼吸の問題、チトクローム系の解明、TCA サイクルの酸化還元の様相の解明、又これらが各種刺激により、どのように変化するかなど、一步一步検索しなければならないが、ともあれ回転別に相当に呼吸代謝の様相が異なることが本実験により明らかになったのであり、今後のこの方面の努力もなされねばならない。

5. 結 語

我々は海猿内耳血管帯における呼吸酵素系を活性度観察する目的で、カーテシヤンダイバー超微量検圧計を使用して酸素消費量を測定した。なお基質液としてはメチレン青添加コハク酸液を使用すると同時に、一部には KCN を添加してその影響もみた。

1. KCN 非添加例、KCN 添加例両者とも、基礎回転において酸素消費量が最大で、第 2, 第 3, 先端回転に行くに従い、その量は低下する。その回転相互の差はかなり明白であるけれども、KCN 添加例では非添加例に比してその差が小さい。

2. KCN 添加例では非添加例に比して、各回転共酸素消費量は低下している。又上方回転より下方回転の方が低下が大である。

以上のことより血管帯の呼吸代謝は基礎回転程活潑で上方に行くに従い低下していると推論してもよいと思う。

文 献

- 1) I. Tasaki.: J. Neurophysiol 22, 149 (1959)
- 2) Smith, C.A., H. Davis., B.H. Deatherage and C.F. Gessert.: Laryngoscope 68, 595 (1958)
- 3) Ruedi, L.: Ann. otol. 60, 993 (1951)
- 4) Engström, H., F.S. Sjöstrand u. H. Spoendlin.: Pract. oto-rhino-laryng 17, 69 (1959)
- 5) 渡辺: 日耳鼻, 63, 227, 1960.
- 6) 高橋: 日耳鼻, 64, 226, 1961.
- 7) 中山: 掲載予定
- 8) Vosteen, K.-H.: Archiv. Ohrenheilk 168, 295 (1956)
- 9) Vosteen, K.-H.: Archiv. Ohrenheilk 171, 368 (1958)
- 10) Vosteen, K.-H.: Zbl. allg. path. Anat 67, 66 (1957)
- 11) Vosteen, K.-H.: Laryngoscope 70, 351 (1960)
- 12) Holter.: Technology of the Cartesian Diver
- 13) 日比野: 日耳鼻, 58, 563, (1955.)
- 14) 小出: 日耳鼻, 63, 620, 1960
- 15) 水越: Audiology Vol 3 No 2 (1960)
- 16) Gisselsson, L.: Acta. otr-leiyng 44, 101 (1954)
- 17) Vosteen, K.-H.: Archiv. Ohrenheilk 169, 415 (1955)
- 18) Beck, C.L.: Archiv. Ohrenheilk 167, 262 (1955).
- 19) Von Békésy, G.: J. Acoust. Soc. Am. 24, 399. (1952).

本論文の要旨は日本耳鼻咽喉科学会東北地方会 111 回, 113 回において発表した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導及び御校閲を賜つた恩師立木豊教授に心から感謝致します。

(原稿到着 = 昭和 36. 9. 4 日)