

蝸牛内直流電位と蝸牛マイクロフォン電位に対する Ca^{2+} channel agonist および antagonists の効果

林 琢 巳

Ca^{2+} channel agonist である BayK-8644 と Ca^{2+} channel blocker であるニフェジピン、ベラパミル、ディルチアゼムおよびフルナリジンの Endocochlear DC potential (EP), Cochlear microphonics (CM) に対する作用を検討した。ニフェジピン 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の外リンパ腔灌流により低下した EP, CM に対し同濃度の BayK-8644 を再灌流した場合, EP の低下は抑制されるか, または部分的に回復を認め, CM の低下もまた抑制され, 数%の回復を示した例も認めた。これより血管条辺縁細胞および有毛細胞の Ca^{2+} チャンネルは Ca^{2+} 拮抗剤による抑制に対して可逆性を有することが確認された。また, Ca^{2+} 拮抗剤灌流後に anoxia 負荷を行ったが, EP の negative component は消失もしくは著明に減弱した。低濃度の灌流では EP が正常の場合でも CM は減弱し, コルチ器の Ca^{2+} 拮抗剤による抑制は血管条以上に高度であった。血管条辺縁細胞および有毛細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は EP, CM に強く反映され, 蝸牛電気現象に対する Ca^{2+} の重要性が示唆された。

(平成5年5月25日採用)

Effect of a Ca^{2+} Channel Agonist and Antagonists on Endocochlear DC Potential and Cochlear Microphonics in the Guinea Pig

Takumi Hayashi

The effect of BayK-8644 as a Ca^{2+} channel agonist, and nifedipine, verapamil, diltiazem and flunaridine as Ca^{2+} channel antagonists on endocochlear DC potential (EP) and cochlear microphonics (CM) were investigated by perfusion through perilymphatic space in the guinea pig. Nifedipine was previously shown to cause a fall in EP when it was introduced into the scala tympani. This fall in EP was not reversible, and it proceeded further even though the perfusion solution was simply exchanged from the nifedipine solution to the control solution. In the present study, it was first elucidated that BayK-8644 at 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ led to a recovery, at least in part, of EP, after it was once decreased by nifedipine. Similarly, the fall in EP was prevented if a mixture of nifedipine with BayK-8644 was introduced into the scala tympani. Since BayK-8644 was unlikely to reduce the magnitude of a negative component of EP, the rise in EP caused by BayK-8644 was due not to a decline of negative component but to restoration of the positive component of EP, presumably

through a mechanism of activation of the $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pump located in the basolateral membrane of the marginal cells in the stria vascularis. Secondly, the other Ca^{2+} blockers, verapamil, diltiazem and flunaridine caused a fall in the level of EP and essentially in the amplitude of CM. Perfusion through the scala tympani with the Ca^{2+} blockers at concentrations of more than $10 \mu\text{g/ml}$ decreased the level of EP and, more markedly, the amplitude of CM. It was hypothesized that the fall in EP was due to suppression of $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase on the basolateral side of the marginal cells. This would decrease the Na^+ influx through the luminal membrane because of the alternation in the intracellular Ca^{2+} concentration. The decrease in the CM amplitude was caused not only by the fall in EP but also by the reduced activation of organ of Corti. Inhibition of Ca^{2+} current through the hair cell membrane may be related to the distinct decrease in the CM amplitude. When anoxia was loaded during perfusion with the control solution, the level of EP decreased rapidly at first and then gradually to a steady level of -30 mV . The final level of this negative component was not affected by BayK-8644, but it was raised to around 0 mV by perfusion of three kinds of Ca^{2+} blockers including nifedipine. One possible origin for the decrease in the negative component may have been the increase in the resistance across the basilar membrane. Probably, blocking of Ca^{2+} current caused a decrease in the peak CM on one side and reduced K^+ inflow through the hair cell membrane on other side. Consequently, Ca^{2+} blockers inhibited an increase in the K^+ conductance of these cells resulting in the resistance increase across the basilar membrane.

(Accepted on May 25, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19(2):103-116, 1993

Key Words ① Endocochlear DC potential ② Cochlear microphonics
③ BayK-8644 ④ Ca^{2+} channel blockers

緒 言

蝸牛中央階には $+80\sim 90 \text{ mV}$ の蝸牛内直流電位 (EP) と呼ばれる細胞外静止電位が存在している。また蝸牛中央階は高 K^+ ($150\sim 160 \text{ mM}$)、低 Na^+ ($1\sim 2 \text{ mM}$) の内リンパ液で満たされており^{1), 2)}、これらは生体内の細胞外環境としては非常に特異的である。それ故通常の細胞機構では説明不能の点も多く、EPの存在が報告されて以来³⁾、電気生理学的研究が多数報告されている⁴⁾。

EPはpositiveおよびnegative potentialの2種のcomponentから構成されていると考えられる^{5), 6)}。蝸牛血管条辺縁細胞には $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaseが存在しており⁷⁾、EPのpositive com-

ponentはこの $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPase活性に強く依存した $+100\sim 120 \text{ mV}$ の正電位である。 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpは血管条辺縁細胞のbasolateral sideに存在し、 K^+ を辺縁細胞内に流入させることは明白だが、辺縁細胞から中央階へのイオン移行に関してはluminal sideの K^+ channelを介する受動的流出によるとするone pump theory^{8), 9)}と $\text{Na}^+\text{-K}^+$ pumpに加えluminal sideにelectrogenic K^+ pumpが存在するというtwo pump theory^{10), 11)}の2説がある。他方EPのnegative componentはコルチ器を介する内外リンパ間の K^+ 拡散電位で、 $-20\sim -40 \text{ mV}$ の負電位である。通常の状態では正電位により隠蔽される負電位は、anoxiaやループ利尿剤の投与等によりpositive componentが低下した状態で出現する。EPはpositiveおよびnegative component

の総和で +80~100 mV の電位として計測される。

EP の成因には K^+ , Na^+ , Cl^- 等の動態が重要であるが、同様に Ca^{2+} の関与も以前より重視されている。蝸牛外リンパ Ca^{2+} 濃度が 10^{-3}M オーダーであるのに対し内リンパ Ca^{2+} 濃度は 10^{-5}M のオーダーである^{12), 13)}。これはイオン化 Ca^{2+} 濃度であり、蛋白結合した Ca^{2+} を含めた総 Ca 濃度は内リンパでは 0.5 mM 程度となる¹⁴⁾。 Ca^{2+} の平衡電位は内リンパが正の約 61 mV であり、計測される EP より小さいので Ca^{2+} 輸送は内外リンパ間の電気化学的勾配に逆らって内リンパに向かって行われていることが示唆される^{12), 15)~17)}。その主体である Ca^{2+} ATPase の、辺縁細胞あるいは基底細胞における局在も報告されており^{17)~19)}、蝸牛における音受容機構にとり Ca^{2+} は必須であると考えられる。

当教室では蝸牛電気現象に対する Ca^{2+} channel blocker の作用に着目し、Sato^{20), 21)} はニフェジピンを、Handa et al.^{22), 23)} は 2 価および 3 価重金属イオンを、また山川²⁴⁾ は DMSO を外リンパ腔灌流し EP が低下することを報告し、辺縁細胞に流入する Ca^{2+} をブロックした場合に細胞機能が抑制されると考察した。

本研究では、ニフェジピンと同様にジヒドロピリジン類化合物で、 Ca^{2+} channel agonist である BayK-8644 を外リンパ腔灌流し、EP および蝸牛マイクロフォン電位 (CM) の変化を測定した。実験の内容は以下の通りである。1. ニフェジピンの EP, CM への影響に対する対照液の灌流による可逆性の有無。2. BayK-8644 によるニフェジピンの抑制作用に対する可逆性。3. フェニルアルキルアミン類のベラパミル、ベンゾジアゼピン類のディルチアゼム、ジフェニルアルキルアミン類のフルナリジンの 3 種類の Ca^{2+} 拮抗剤による EP と CM の抑制と anoxia の相互作用、などである。これらの物質の外リンパ腔灌流は正常の条件だけではなく、前以て anoxia 負荷して positive component の減弱ないし消失した条件において薬物を投与することによって、EP の negative component のみの変化を観察し

て辺縁細胞および有毛細胞への影響を考察した。

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 55 匹を使用した。pentobarbital sodium 30 mg/ml を腹腔内に注入し麻酔後 suxamethonium chloride にて不動化した。気管切開後カニューレを気管内挿管し人工呼吸器に接続、呼吸を維持した。体温は自製の保温器を使用し一定に保つようにした。モルモットを背位に固定後腹側経路にて中耳骨胞を開窓、蝸牛を露出した。蝸牛基底回転に小孔を形成し、ここより 3 M KCl を充填した微小ガラス管電極をマイクロマニピュレーターを用いて基底回転中央階に挿入した。電極は高入力抵抗増幅器 (AZV-8, 日本光電) に接続され、EP はペンレコーダー (R-102, 理化電機) に、CM はオシロスコープ (VC-10, 日本光電) にそれぞれ表示した。CM はスピーカーに接続したシリコンチューブを外耳道経路に鼓膜付近に設置し、2000 Hz, rise time および decay time はいずれも duration 20 msec の tone burst にて刺激した。外リンパ腔灌流は蝸牛基底回転鼓室階、前庭階にそれぞれ小孔を形成、ガラス毛細管先端を切断して作製した灌流用ピペットを鼓室階側の小孔に挿入し、マイクロシリンジにて $10 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度で灌流、前庭階側の小孔より流出させた。灌流液の変更は、挿入されたピペットを一度抜去し、他の溶液を満たしたピペットを挿入して行い、薬液が蝸牛に到達するまでの time lag を最小に保ち、灌流条件の変化も可能な限り抑えるようにした。対照となる人工外リンパ液は、130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaHCO_3 , 5 mM Glucose, 10 mM HEPES (N-2-Hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid), pH 7.4 に調整した。各種薬剤については、ニフェジピンおよび BayK-8644 は DMSO に溶解後それぞれ人工外リンパ液で $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に希釈した。ベラパミル、ディルチアゼム、フルナリ

ジンは同様の方法で1, 10, 30 $\mu\text{g/ml}$ の3濃度に希釈した. EPは70 mV以上の例を使用し, まず人工外リンパ液を灌流しEPが安定した後に各種薬剤を含む灌流液に変更した. また anoxia 負荷は, 単に人工呼吸器を停止させることによってなされた.

結 果

1. ニフェジピンのEP, CMに対する作用ならびに対照液による washout の効果

ニフェジピンを外リンパ腔灌流するとき, EPは最初僅かに低下し, 十数分後より速やかに低下して, 60分後には+20~0 mVに達する. EPの最初の僅かな低下の時期においてCMが明らかに低下することは特徴的である. ニフェジピン灌流を開始して, EPが+60~50 mVに達した時点で, 対照人工外リンパ液を灌流し wash-

outを試みたが, EP, CMともに低下し続け回復の経過は認められなかった. 最終的にEPは 18.3 ± 3.8 mV ($n=3$), CMは 12.4 ± 4.8 % ($n=3$)まで低下した. CMは人工外リンパ液灌流時の振幅を100%として%表示を行った. 灌流後に anoxia 負荷をおこなったがEPは0 mVまでの低下に終わり negative componentの完全な消失を認めた (Fig. 1).

2. BayK-8644によるニフェジピンの作用に対する抑制

ニフェジピン30 $\mu\text{g/ml}$ を約10分間灌流し, EPがまだ著明に低下せずCMのみが低下しはじめた時点で, 灌流液をBayK-8644 30 $\mu\text{g/ml}$ を含む液に交換するときは, ニフェジピンの持続的なEP低下作用は減弱ないし消失した. CMについてもニフェジピンを灌流する時は, 振幅の減少が進行するのに対して, BayK-8644に交換後は最初一時的に回復し, 以後漸減するに過ぎ

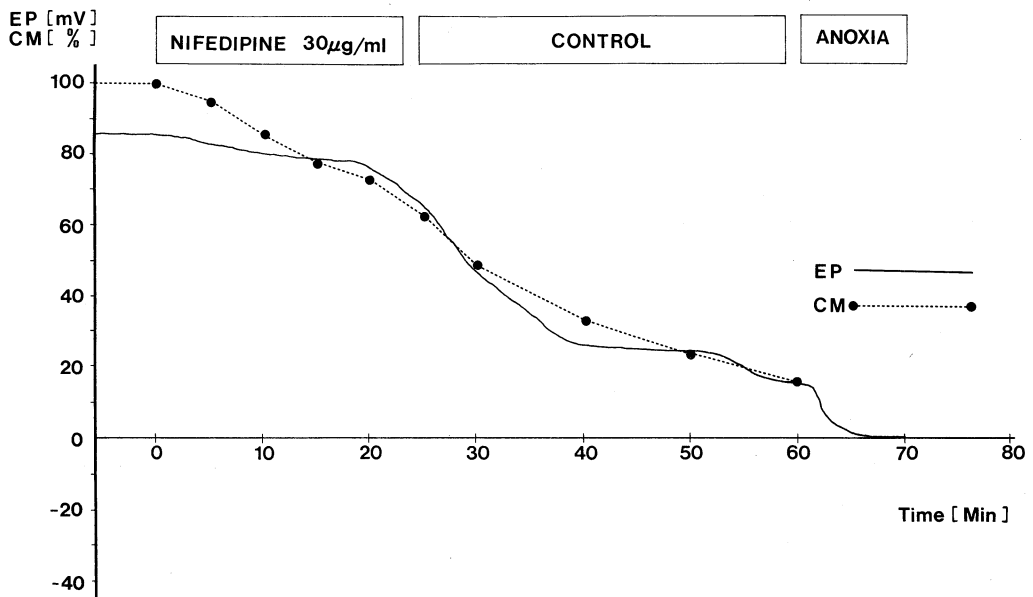


Fig. 1. Changes in EP and CM during perfusion with nifedipine solution and following washing with control solution.

Nifedipine solution was introduced into the scala tympani at 0 min. EP and CM began to decline during perfusion with 30 $\mu\text{g/ml}$ nifedipine and they decreased further even though nifedipine was washed out with the control solution. Anoxia loading produced a rapid fall in EP to 0, but not to negative potential. The EP amplitude during perilymphatic perfusion with the control solution at the start of experiment was taken as 100% and indicated on the ordinate. The EP was also indicated in the same scale on the ordinate.

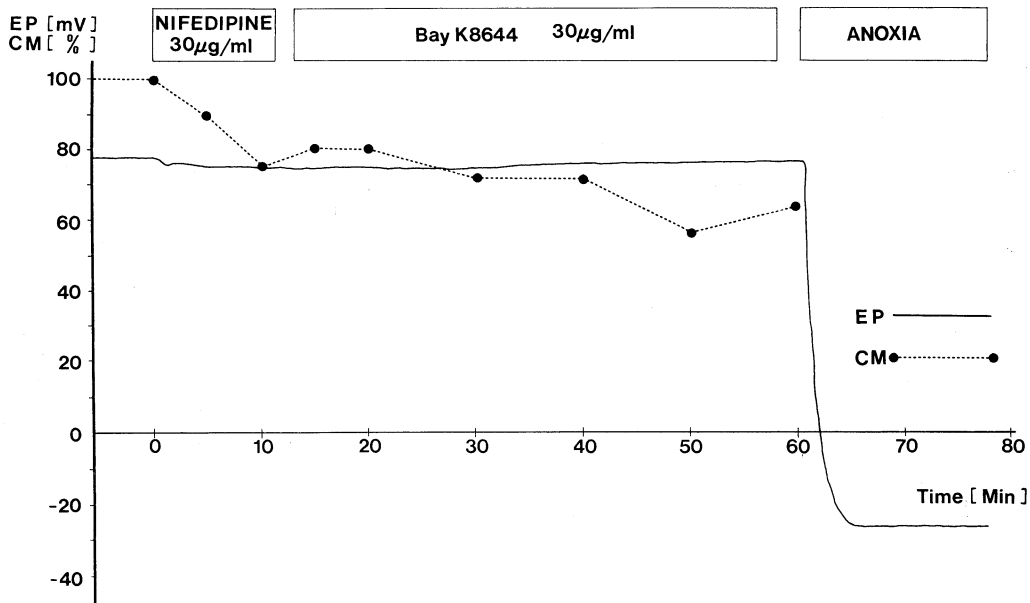


Fig. 2. Changes in EP and CM during perfusion with nifedipine for a short period and following BayK-8644.

Perfusion with $30 \mu\text{g/ml}$ nifedipine started at 0 min. At 15 min, the perfusate was exchanged to $30 \mu\text{g/ml}$ BayK-8644. CM decreased to 61.9 %, whereas EP was maintained at a nearly consistent level. Anoxia loading produced a rapid fall of EP to negative value beyond 0 potential (-23 mV).

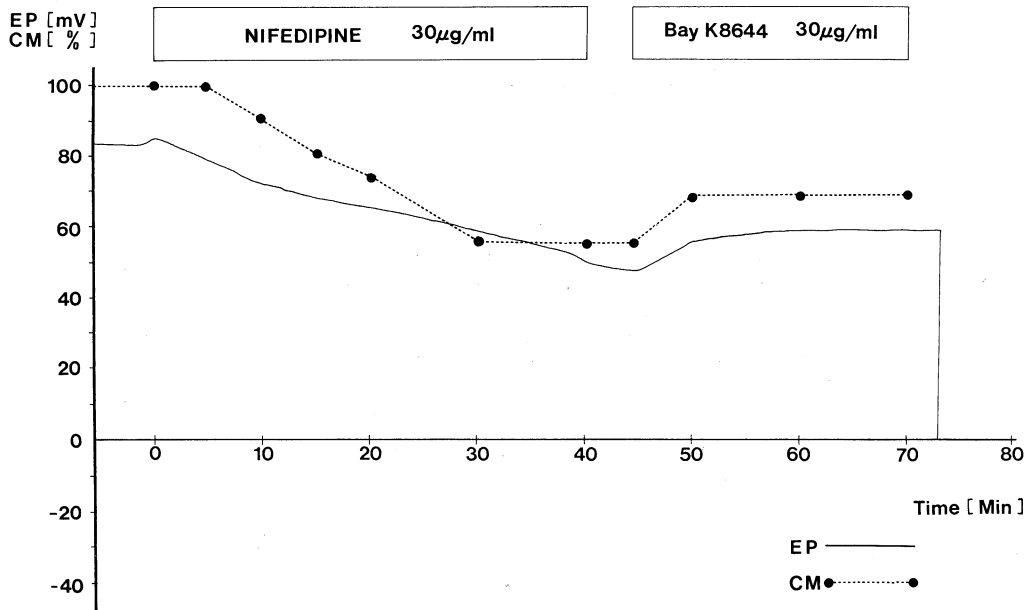


Fig. 3. Changes in EP and CM during $30 \mu\text{g/ml}$ nifedipine for a long period and following $30 \mu\text{g/ml}$ BayK-8644.

Perfusion with nifedipine was started at 0 min. At 45 min, perfusate was exchanged to BayK-8644. The scales on the ordinate are the same as those in Fig. 1.

ず, 61.9%にとどまる (Fig. 2). ニフェジピン灌流の後に BayK-8644液灌流に交換したときの CM 振幅の減少は, 対照液灌流に交換したときに比べて, CM の低下は軽度かつ緩徐であった.

BayK-8644液灌流に変換する時点を遅くして, ニフェジピンにより EP が低下した時 (57.0 ± 12.9 mV) に BayK-8644を灌流するときは, BayK-8644灌流後より EP の低下は抑制されるばかりでなく, 逆に 8.0 ± 2.4 mV と有意に上昇

し ($p < 0.05$), その後定常の値に維持された. 最終 EP は 65.9 ± 14.7 mV であった (Fig. 3). しかし, 低下開始以前の初期値にまで回復した例は認められなかった. CM は灌流後12%の回復を示した例を含め 58.8 ± 15.9 % までの低下にすぎず, 対照液灌流時の CM 低下に比較して有意に ($p < 0.05$) 抑制された (Fig. 3). Table 1 に BayK-8644液を灌流してニフェジピンと拮抗する条件における EP, CM の変化を, 単に正常外

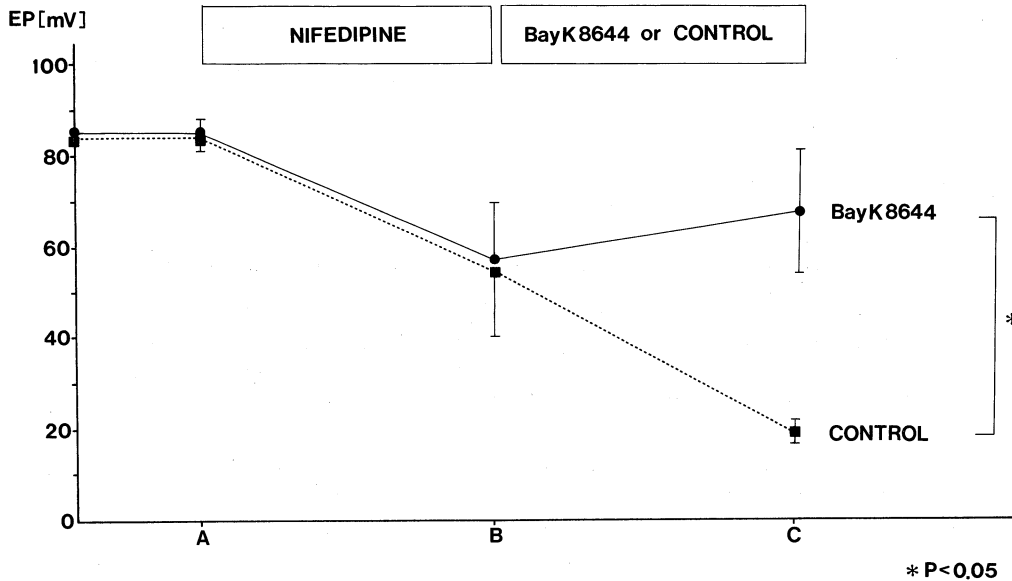


Fig. 4. Recovery of EP by BayK-8644 from a decay caused by preceding perfusion with nifedipine. Nifedipine perfusion was started at point A on the abscissa. Then a switch was made to the control solution (squares, dotted line) or the BayK-8644 solution (circles, continuous line) at point B, where EP fell to about two thirds of the initial level. The experiment ended at point C. The period of nifedipine varied in a range between 15 and 45 min. Each point with a vertical bar indicates the mean \pm SD. A, B and C represent initial EP, EP after perfusion of nifedipine and final EP, respectively.

Table 1. Comparison of effects of BayK-8644 solution on the recovery of EP and CM from nifedipine treatment with those of the control solution.

| Perfusion | Initial EP (mV) | EP after perfusion of nifedipine (mV) | Final EP (mV) | Δ EP (mV) | Final CM (%) | EP on anoxia (mV) |
|-----------|--------------------|--|------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|
| Control | 83.3 ± 4.6 | 53.7 ± 10.9 | 18.3 ± 3.8 | -35.9 ± 19.0 | 12.4 ± 4.8 | 0 |
| BayK-8644 | 84.6 ± 3.6 | 57.0 ± 12.9 | 65.9 ± 14.7 | $+8.0 \pm 2.4^*$ | $58.8 \pm 15.9^*$ | |

(mean \pm S. D.) * $p < 0.05$

リンパ液を灌流してニフェジピンを washout したときの EP, CM と比較して示す。また, BayK-8644 と対照液による washout 時の EP の変化を Figure 4 に, CM 振幅の変化を Figure 5 に示す。ニフェジピンから対照液に交換するときは, その後も CM の低下率は一定であるのに対し, 10~40 分の時点でニフェジピンから BayK-8644 に交換した場合は, 対照液に比べ有意に CM 振幅の低下は抑制されている ($p < 0.05$)。BayK-8644 灌流後に人工呼吸を停止して anoxia を負荷するとき, EP は急速に低下し -22 mV に達した (Fig. 2)。この値は対照液を灌流しつつ anoxia を負荷したときに得られる値と一致しており, BayK-8644 は EP の negative component に影響を与えるものではないといえる。これに対して, ニフェジピンの灌流後に, 単に対照液を灌流して washout した場合には negative

EP は消失した (Fig. 1)。washout されないで残っているニフェジピンが negative component を減弱させるためと推測され, BayK-8644 は少なくともニフェジピン以上に negative component を減少させることはないことが分かる。

3. 各種 Ca^{2+} 拮抗剤の効果

各種 Ca^{2+} 拮抗剤の EP, CM に対する反応は, 濃度による差異を観察するために濃度別にまとめた。

i) $1 \mu\text{g/ml}$ 灌流時の変化

ベラパミルを 30~90 分間外リンパ腔灌流するとき, EP の低下は -8.6 ± 15.9 mV であった (Fig. 6)。また, デルチアゼムでは -0.8 ± 2.3 mV, フルナリジンでは -6.0 ± 5.0 mV の低下を得たのみで有意差は認めなかった ($p > 0.1$)。EP に変化が認められないのに対して, CM は薬剤の種類に如何にかかわらず, 約 40% に低下し

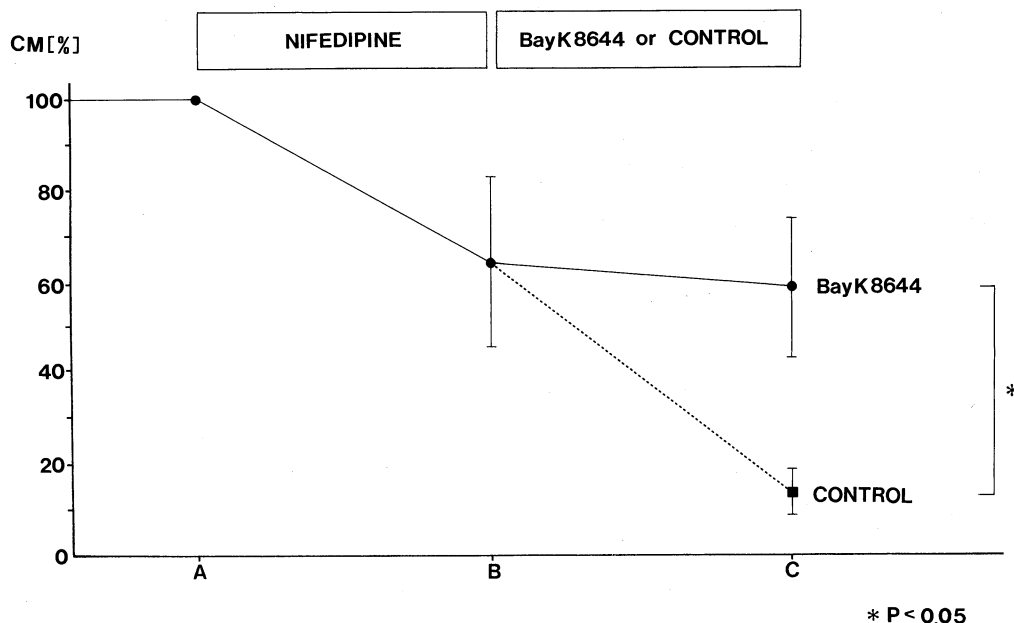


Fig. 5. Preventive effect of BayK-8644 on the fall in CM caused by preceding perfusion with nifedipine. Perfusion with nifedipine was started at point A and then a switch was made to the control solution (square, dotted line) or the BayK-8644 solution (circles, continuous line) at point B, where the peak amplitude decreased to around 60% of the initial value. The period of nifedipine perfusion was between 15 and 45 min. Each point with a vertical bar indicates the mean \pm SD. A, B and C represent initial CM, CM after perfusion of nifedipine, and final CM, respectively.

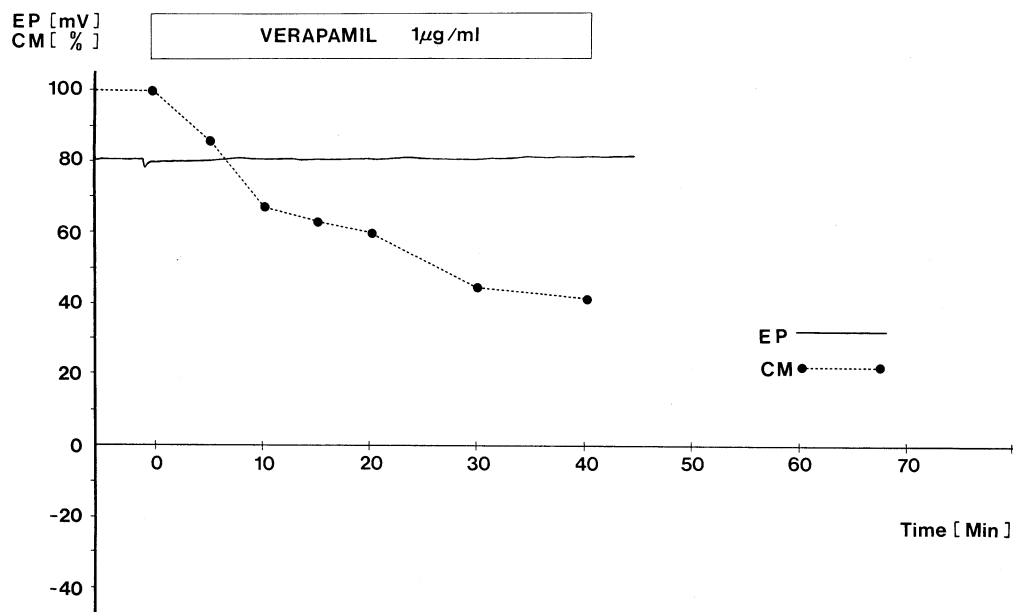


Fig. 6. EP and CM during perfusion with 1 $\mu\text{g/ml}$ verapamil. The amplitude of CM continued to decrease during perfusion, while EP showed no significant changes. The scales on the ordinate are the same as in Fig. 1.

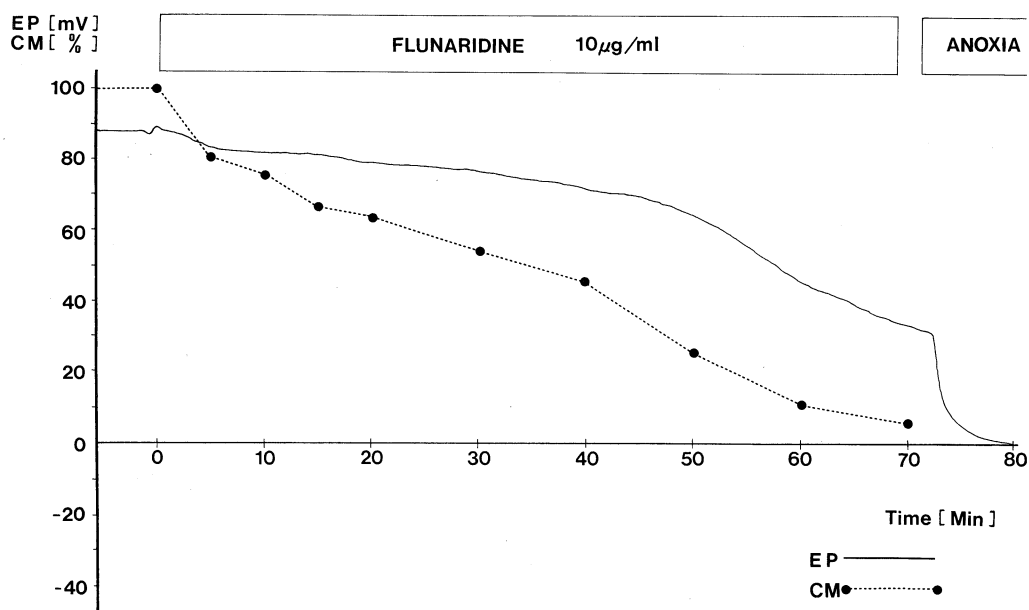


Fig. 7. EP and CM during perfusion with 10 $\mu\text{g/ml}$ flunaridine. CM decreased prior to the fall of EP and more rapidly. The scales on the ordinate are the same as in Fig. 1.

た.

ii) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の灌流時の変化

ベラパミルを30~100分間灌流するとき, EP は $-2.3 \pm 2.7 \text{ mV}$ の低下と有意差は認めなかった ($p=0.05$). これに対してディルチアゼムでは $-69.5 \pm 5.3 \text{ mV}$, フルナリジンでは $-45.6 \pm 12.1 \text{ mV}$ と有意に低下した ($p < 0.05$), CM は各薬剤とも低下した. **Figure 7** はフルナリジン灌流時の変化を示す.

iii) 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 灌流時の変化

ベラパミルを灌流するとき, EP の低下分は $59.3 \pm 12.5 \text{ mV}$, ディルチアゼムの灌流では $69.5 \pm 5.3 \text{ mV}$, フルナリジンの灌流では $18.0 \pm 6.2 \text{ mV}$ とそれぞれ有意に低下した ($p < 0.05$). CM もすべての薬物の灌流に際して低下し, しかも EP の低下に比べて早い時期に減少を開始した. **Figure 8** はディルチアゼム灌流時の変化を示す.

一部 Ca^{2+} 拮抗剤灌流後に人工外リンパ液にて washout を試みたが EP, CM の可逆性あるいは低下抑制は認められなかった. 人工呼吸器を停止して anoxia を負荷すると, ニフェジピンの実験で示したと同様に (**Fig. 1**), EP の negative

component が減少ないし消失した. **Table 2** に各種 Ca^{2+} 拮抗剤による EP の変化をまとめて示してある. ニフェジピンが EP の低下させる最小濃度は $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の濃度であるのに対して²⁰, これら3薬剤が EP の低下を起こすには10倍以上の高濃度を必要とした. 特にベラパミルでは, 最小濃度は $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり, ディルチアゼムおよびフルナリジンが $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であって, 各種 Ca^{2+} 拮抗剤の濃度-反応関係は必ずしも同一ではないことが認められた. また同一薬剤における濃度による影響をみると, ディルチアゼムでは10および $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ での EP の低下分がそれぞれ $69.5 \pm 5.3 \text{ mV}$, $61.5 \pm 9.6 \text{ mV}$ とほぼ同程度の低下分であるのに対し, フルナリジンを灌流するときは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では EP の低下分は $45.6 \pm 12.1 \text{ mV}$ であるのに対し, $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ に濃度を上げた場合は逆に $18.0 \pm 6.2 \text{ mV}$ と低下分は軽度になっている. このことは全ての Ca^{2+} 拮抗剤が必ずしも濃度依存性に EP を低下させるとは限らないことを示している.

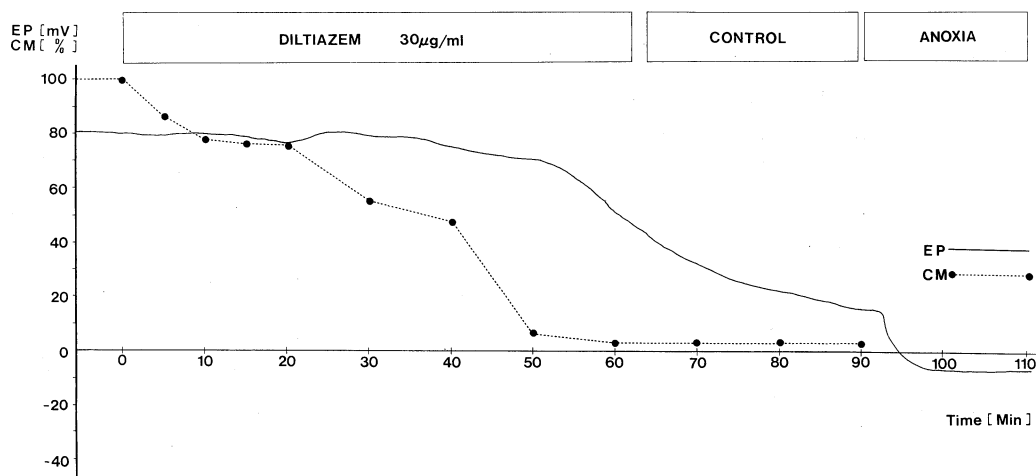


Fig. 8. EP and CM decreased by perfusion with $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ diltiazem.

The fall of EP was not restored by washing out with the control solution. The negative component of EP during anoxia was reduced to -6 mV . The scales on the ordinate are the same as in **Fig. 1**. Time 0 indicates the start of diltiazem perfusion.

Table 2. Changes in EP caused by three kinds of Ca²⁺ blockers and the finally attainable EP level after anoxia loading.

| Perfusion ($\mu\text{g/ml}$) | Initial EP (mV) | Final EP (mV) | Δ EP (mV) | EP on anoxia (mV) |
|-----------------------------------|--------------------|------------------|---------------------|----------------------|
| Flunaridine | | | | |
| 30 | 82.5 \pm 3.0 | 64.5 \pm 4.7 | -18.0 \pm 6.2* | -6.5 \pm 5.5 |
| 10 | 83.6 \pm 3.4 | 38.0 \pm 9.5 | -45.6 \pm 12.1* | -0.6 \pm 0.9 |
| 1 | 84.7 \pm 4.2 | 78.7 \pm 1.5 | - 6.0 \pm 5.0** | -5.7 \pm 4.9 |
| Diltiazem | | | | |
| 30 | 81.5 \pm 1.7 | 21.2 \pm 11.7 | -61.5 \pm 9.6* | -3.0 \pm 3.0 |
| 10 | 86.0 \pm 2.7 | 16.5 \pm 6.6 | -69.5 \pm 5.3* | |
| 1 | 83.3 \pm 5.2 | 82.5 \pm 4.1 | - 0.8 \pm 2.3** | |
| Verapamil | | | | |
| 30 | 83.3 \pm 3.1 | 24.0 \pm 11.4 | -59.3 \pm 12.5* | |
| 10 | 76.5 \pm 1.5 | 73.0 \pm 3.3 | - 2.3 \pm 2.7*** | |
| 1 | 79.2 \pm 6.1 | 71.0 \pm 14.4 | - 8.6 \pm 15.9** | |

 Δ EP=Initial EP-Final EP (mean \pm S. D.)

* P<0.05

** P>0.1

*** P=0.05

考 察

1. BayK-8644の作用機構

BayK-8644はニフェジピンと同じくジヒドロピリジン系化合物であるがCa²⁺ channel agonistとして作用することが知られている。電位依存性Ca²⁺チャンネルに作用しCa²⁺イオンの流入を増加させるが、一般に興奮性細胞における研究に広く使用されている^{25)~29)}。Hess et al.²⁵⁾はニフェジピンあるいはその他のCa²⁺拮抗剤と構造的に類似したBayK-8644がCa²⁺電流を増加させるという全く逆の作用を呈する事実に着目した。彼らは単離心筋細胞を使用しボルテージクランプ法による記録を行い、Ca²⁺チャンネルの開口様式には短時間の開口(モード1)、チャンネルが開かないもの(モード0)、そして長時間の持続開口と非常に短時間の閉口(モード2)の3種類があり、BayK-8644は単に既存の開口時間(モード1)を延長させるのではなく、通常ではほとんど出現することのないモード2を促進させることにより、Ca²⁺電流を増強する、すなわち新しいモードの開口を出現させると結論した。BayK-8644に対してジヒドロピリジン類以外のCa²⁺拮抗剤も非競合的に拮抗することが知られているが、²⁸⁾ 本実験ではニフェジピンによる蝸牛電気現象の影響に対するBayK-

8644の拮抗作用を検討した。

2. ニフェジピンによるEP低下に対するBayK-8644の作用

ニフェジピン30 $\mu\text{g/ml}$ の外リンパ腔灌流によりEPが低下した後、BayK-8644 30 $\mu\text{g/ml}$ 液を再灌流をした場合、ニフェジピンによるEPの低下は停止して、逆に8.0 \pm 2.4 mV上昇し定常に達するという結果を得た(Fig. 3)。一般にEPを上昇させる因子として、positive componentの増強する場合とnegative componentが減弱する増強とが考えられる。positive componentの増強についてはDoi et al.^{30), 36)}がadenylate cyclase stimulatorであるforskolinを外リンパ腔灌流し、Na⁺-K⁺ATPaseが活性化されることによりEPが上昇することを報告している。本実験において見いだされたBayK-8644によるEP上昇は、Ca²⁺流入が抑制されたために機能低下を来した血管条辺縁細胞において、BayK-8644がCa²⁺チャンネルに可逆的に作用しCa²⁺の流入を増加させ、細胞機能を回復させたためと考えられる。negative componentの減少した場合には、vanadateあるいはBa²⁺の灌流によるEPの上昇³²⁾がそれに起因すると考えられる。ニフェジピンを短時間灌流後に、BayK-8644を灌流した後に、anoxia負荷を与えるときはnegative EPは-22 mVと保持されているのに対し(Fig. 2)、ニフェジピンを長時間灌流し

た後対照人工外リンパ液で washout した場合は, anoxia 負荷による EP の低下は 0 mV までで負電位に達することはなかった (Fig. 1). この事実は, ニフェジピンは negative component を減少させるが, BayK-8644 はこれを減弱させないか, あるいはさせるとしても軽度であることを示唆している. したがって BayK-8644 による EP の上昇は negative component の減少によるとは考え難い. 以上の結果より BayK-8644 の外リンパ腔灌流による EP 上昇は positive component の増加作用によるものであって, negative component の減少によるものではないと結論される. 今回, ニフェジピンと BayK-8644 を同濃度で使用したが初期値 EP, CM までの回復を得ることが困難であった. ニフェジピンの作用がより強力であるためか, あるいは Ca^{2+} 欠乏による血管条辺縁細胞の機能低下が不可逆的に低下したためかは不明である. 今後 BayK-8644 をニフェジピン以上の高濃度で使用するか, またはさらに長期間の灌流を行う等の検討が必要である. また両薬剤の明瞭な効果を得るために 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の高い濃度で使用した.

3. 辺縁細胞における Ca^{2+} の役割

近年, 血管条辺縁細胞におけるイオンチャンネルの解析が行われつつある. Liu et al.³³⁾ はパッチクランプ法を使用して辺縁細胞 luminal side における non-specific cation channel の存在を証明し, このチャンネルが辺縁細胞から中央階への受動的 K^+ 流出および Na^+ 流入を制御すると考察した. 内外有毛細胞と異なり血管条における Ca^{2+} チャンネルの存在は現在証明されていないが, 我々のグループでは一貫して Ca^{2+} チャンネルにつき, その存在を示唆するいくつかの実験結果を得ている. 本研究では, ニフェジピンに加えジヒドロピリジン類以外の Ca^{2+} 拮抗剤も同様に EP, CM を減弱させる結果を得た. Ca^{2+} は電位依存性 Ca^{2+} チャンネルを通して辺縁細胞に流入する. Ca^{2+} 拮抗剤はそのチャンネルをブロックする. その結果細胞内 Ca^{2+} の貯蔵は消費され cAMP 依存性機構および Na^+-K^+ ATPase 活性が低下し EP が減弱すると仮定さ

れている^{20)~23)}. これとは別に, Peters³⁴⁾ は細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は膜のイオン透過性を変化させ Ca^{2+} の他 Na^+ 流入も制御すると報告している. 血管条辺縁細胞の Na^+-K^+ ATPase 活性は細胞内への Na^+ 流入に依存している事実⁸⁾ を併せて考慮すると, Ca^{2+} 拮抗剤は Na^+-K^+ ATPase を直接抑制はしないが, 細胞内 Ca^{2+} 濃度の低下により辺縁細胞への Na^+ 流入を抑制し, 二次的にポンプ活性を低下させ EP の減弱を来すという可能性も除外できない.

4. 各種 Ca^{2+} 拮抗剤の作用および種々の薬物の濃度について

前述したようにディルチアゼム, フルナリジンは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で, ベラパミルは 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の外リンパ腔灌流で EP を有意に低下させた (Table 2). ニフェジピンの報告^{20), 21)} と比較して 10 倍以上の高濃度を要した. 各薬剤により EP を低下させる濃度が異なっているが, 例えばディルチアゼムでは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ における EP の低下がほぼ同程度であり, またフルナリジンでは 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での EP 低下分が -45.6 ± 12.1 mV であるのに対し 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では -18.0 ± 6.2 mV と逆に EP 低下は軽度であり, すべての Ca^{2+} 拮抗剤の有効濃度は必ずしも一定であるとは限らないことを示している. これより各 Ca^{2+} 拮抗剤が EP を低下させた濃度が異なっているのは, 個々の薬剤により作用する至適濃度が異なるためではないかと考えられる.

5. Anoxia との関連

通常 anoxia 負荷により血管条の Na^+-K^+ ATPase 活性は抑制され, コルチ器有毛細胞を介する K^+ diffusion potential によって EP は速やかに低下し $-20 \sim -40$ mV に達する.³⁵⁾ しかし, ニフェジピン, フルナリジンおよびベラパミルの灌流後に anoxia 負荷を行うときは, 0 mV か, あるいは僅かに負の値に低下するのみであった. Ca^{2+} 拮抗剤灌流後の anoxia 負荷で EP は 80 mV から速やかに低下を来し, その後緩やかな経過をたどり, 最終的に 0 ~ 数 mV に保たれて持続する (Figs. 7, 8). この EP の低下の様式は, Old Waltzing guinea pig を用

いた anoxia 時の EP 低下様式に類似している³⁶⁾。Konishi³⁶⁾によれば、old Waltzing guinea pig ではコルチ器が変性、消失しているため内外リンパ間の K^+ コンダクタンスが減少して negative EP は消失しているという。血管条と異なりコルチ器については、単離有毛細胞を用いて電位依存性 Ca^{2+} チャンネルの存在が示されている³⁷⁾。特に Fuchs et al.³⁸⁾ はジヒドロピリジン類の Ca^{2+} 拮抗剤が内向き Ca^{2+} 電流をブロックすることを報告しており、これより Ca^{2+} 拮抗剤投与例で negative EP が消失したのは、有毛細胞の Ca^{2+} チャンネルのブロックにより細胞内 Ca^{2+} 濃度が低下し、Waltzing guinea pig の場合と同様に K^+ コンダクタンスが低下したことが要因であると考えられる。この K^+ 拡散電位について Komune et al.³⁹⁾ は、anoxia 負荷前の状態では EP は positive component のみで negative EP は存在しておらず、anoxia 負荷後 K^+ コンダクタンスが増加し negative EP が初めて出現することをカナマイシン処理モルモットを使用して報告しており興味深い。

6. CM に対する各種薬剤の作用

Konishi と Kelsey⁴⁰⁾ は EDTA を外リンパ腔灌流し、Tanaka et al.^{41), 42)} は蝸牛中央階の Ca^{2+} を EDTA でキレートした場合および逆に中央階に過剰の Ca^{2+} を投与した場合にいずれも CM が減弱することを報告し、適度の細胞外 Ca^{2+} 濃度が有毛細胞の音受容機構における高い感受性を維持し、音受容の初期段階に Ca^{2+} の流入が関与していることを示唆した。各種 Ca^{2+} 拮抗剤による CM 振幅の減少は、有毛細胞における Ca^{2+} 流入が抑制されたことに起因すると考えられる。各 Ca^{2+} 拮抗剤とも $1 \mu\text{g/ml}$ の液を外リンパ腔灌流するとき、EP 低下が軽微であるにもかかわらず CM は著明に減少した。 $10 \mu\text{g/ml}$

以上でも CM は EP よりも時間的に早期に灌流直後より減弱した。Konishi et al.⁴³⁾ は anoxia 負荷後 EP が 0 mV に低下した時点でも CM がまだ低下過程にあることより、単に EP が CM の energy source であることは限らない事実を示している。本研究で見いだされた Ca^{2+} 拮抗剤による CM の減弱は、EP の低下に伴う単なる二次的反応ではなく、 Ca^{2+} 拮抗剤に対して有毛細胞が血管条よりも低い濃度において速やかに影響されるためと考えられる。これらの拮抗剤が鼓室階から灌流されるために血管条よりもコルチ器の方に速やかにかつ希釈されないうちに到達するためであろう。

ニフェジピン灌流後、単に対照液を灌流して washout するだけではニフェジピン灌流を継続すると同様に CM 振幅は減少し続けたが、BayK-8644 の灌流を行った場合は CM の減少は有意に抑制された (Fig. 5)。これらの結果は BayK-8644 が血管条辺縁細胞のみならず有毛細胞においても Ca^{2+} 拮抗剤による CM 振幅の減少抑制からの部分的回復に寄与していることを意味している。血管条、辺縁細胞ともにニフェジピンや BayK-8644 の受容体が存在することが確認された。

細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化は EP および CM の生成維持に反映され、蝸牛電気現象に Ca^{2+} が必須であることが結論された。

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室、折田洋造教授および同生理学教室、松村幹郎教授に深謝致します。

なお、この論文の要旨の一部は、日本耳鼻咽喉科学会第18回中国地方部会連合会(平成4年、岡山)および第2回日本耳科学会基礎学会(平成5年、筑波)にて口演した。

文 献

- 1) Konishi T, Kelsey E: Effect of potassium deficiency on cochlear potentials and cation contents of the endolymph. *Acta Otolaryngol* 76: 410-418, 1973
- 2) Konishi T, Mendelsohn M: Effect of ouabain on cochlear potentials and endolymph composition in

- guinea pigs. *Acta Otolaryngol* 69 : 192—199, 1970
- 3) Von Békésy G : DC resting potentials inside the cochlear partition. *J Acoust Soc Am* 24 : 72—76, 1952
 - 4) Sterkers O, Ferrary E, Amiel C : Production of inner ear fluids. *Physiol Rev* 68 : 1083—1128, 1988
 - 5) Kuijpers W, Bonting SL : The cochlear potentials I. The effect of ouabain on the cochlear potentials of the guinea pig. *Pflugers Arch* 321 : 348—358, 1970
 - 6) Kuijpers W, Bonting SL : The cochlear potentials II. The nature of the cochlear endolymphatic resting potentials. *Pflugers Arch* 320 : 359—372, 1970
 - 7) Mees K : Ultrastructural localization of K^+ dependent, ouabain sensitive NPPase (Na-K ATPase) in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol* 95 : 277—289, 1983
 - 8) Offner FF, Dallos P, Cheatham MA : Positive endocochlear potential : Mechanism of production by marginal cells of stria vascularis. *Hear Res* 29 : 117—124, 1987
 - 9) Salt AN, Melichar I, Thalmann R : Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. *Laryngoscope* 97 : 984—991, 1987
 - 10) Marcus DC, Rokugo M, Ge XX, Thammann R : Response of cochlear potentials to presumed alteration of ionic conductance : Endolymphatic perfusion of barium, valinomycin and nystatin. *Hear Res* 12 : 17—30, 1983
 - 11) Marcus DC, Rokugo M, Thalmann R : Effect of barium and ion substitutions in artificial blood on endocochlear potential. *Hear Res* 17 : 79—86, 1985
 - 12) Boshier SK, Warren RL : Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid. *Nature* 273 : 377—378, 1978
 - 13) Ninoyu O, Meyer zum Gottesberge AM : Calcium transport in the endolymphatic space of cochlea and vestibular organ. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 102 : 222—227, 1986
 - 14) Ferrary E, Ba Huy PT, Roinel N, Bernard C, Amiel C : Calcium and inner ear fluids. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* 460 : 13—17, 1988
 - 15) Ikeda K, Kusakari J, Saito Y : The Ca^{2+} activity of cochlear endolymph of the guinea pig and the effect of inhibitor. *Hear Res* 26 : 117—125, 1987
 - 16) Ikeda K, Morizono T : Calcium transport mechanism in the endolymph of the chinchilla. *Hear Res* 34 : 307—311, 1988
 - 17) Ikeda K, Morizono T : Electrochemical profile for calcium ions in the stria vascularis : Cellular model of calcium transport mechanism. *Hear Res* 40 : 111—116, 1989
 - 18) Ahlström P, Thalmann I, Thalmann R, Ise I : Cyclic AMP and adenylate cyclase in the inner ear. *Laryngoscope* 85 : 1241—1258, 1975
 - 19) Yoshihara T, Igarashi M : Cytochemical localization of Ba^{2+} ATPase activity in the lateral cochlear wall of the guinea pig. *Arch Otorhinolaryngol* 243 : 395—400, 1987
 - 20) Sato Y : Effects of a calcium channel blocker and calcium chelating agents on cochlear electrical activity in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 108 : 76—82, 1989
 - 21) 佐藤幸弘 : 蝸牛内直流電位に対する Ca 関連薬剤の作用. *耳鼻臨床* 82 : 103—108, 1989
 - 22) Handa T, Sato Y, Orita Y, Matsumura M : Inhibitory effects of heavy metal ions on endolymphatic DC potential and cochlear microphonics in the guinea pig. *Kawasaki Med J* 18 : 53—58, 1992
 - 23) 半田 徹 : 重金属イオンの EP, CM に及ぼす効果. *日耳鼻* 94 : 1227—1233, 1991
 - 24) 山川純至 : 蝸牛内直流電位に対する Dimethyl Sulfoxide の作用. *川崎医学会誌* 17 : 60—64, 1991
 - 25) Hess P, Lansman JB, Tsien RW : Different modes of Ca channel gating behavior favoured by dihydropyridine Ca agonists and antagonists. *Nature* 311 : 538—544, 1984
 - 26) Godfraind T, Miller R, Wibo M : Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol Rev*

- 38 : 321—416, 1986
- 27) Ochi R, Hino N, Niimi Y : Prolongation of calcium channel open time by dihydropyridine derivative BAYK 8644 in cardiac myocytes. *Proc Japan Acad* 60 : 153—156, 1984
 - 28) Sato Y, Ishii K, Taira N : Interaction between BayK-8644 and some vasodilators in the dog hindlimb vasculature. *Jpn J Pharmacol* 40, Suppl : 125, 1986
 - 29) Matsumura Y, Uriu T, Sasaki Y, Shinyama H, Morimoto S : Effects of BayK-8644, a calcium channel agonist, on renin release from rat kidney cortical slices. *Jpn J Pharmacol* 40, Suppl : 125, 1986
 - 30) Doi K, Mori N, Matsunaga T : The effect of adenylate cyclase stimulation on endocochlear potential in the guinea pig. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 247 : 16—19, 1990
 - 31) Doi K, Mori N, Matsunaga T : Effects of forskolin and 1.9-dideoxy-forskolin on cochlear potentials. *Hear Res* 45 : 157—164, 1990
 - 32) Marcus DC, Demott JE, Kobayashi T, Ge XX, Thalmann R : Specificity of action of vanadate to the organ of Corti. *Hear Res* 5 : 231—234, 1981
 - 33) Liu DS, Achouche J, Wu AH, Trotier D, Huy PT : Luminal non-specific cationic channels in cultured strial marginal cells of guinea pig and gerbil as determined by patch clamp technique. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 111 : 298—303, 1991
 - 34) Peters T : Basic mechanisms of cellular calcium homeostasis. *Acta Otolaryngol (Stockh), Suppl.* 460 : 7—12, 1988
 - 35) 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
 - 36) Konishi T : Some observations on negative endocochlear potential during anoxia. *Acta Otolaryngol* 87 : 506—516, 1979
 - 37) Santos-Sacchi J, Dilger JP : Whole cell currents and mechanical responses of isolated outer hair cells. *Hear Res* 35 : 143—150, 1988
 - 38) Fuchs P, Evans MG, Murrow BW : Calcium currents in hair cells isolated from the cochlea of the chick. *J Physiol* 429 : 553—568, 1991
 - 39) Komune S, Huangfu M, Snow JB : Mechanism of production of the negative endocochlear CD potential in the guinea pig. *Otolaryngol Head and Neck Surgery* 91 : 427—434, 1983
 - 40) Konishi T, Kelsey E : Effect of calcium deficiency on cochlear potentials. *J Acoust Soc Am* 47 : 1055—1062, 1969
 - 41) Tanaka Y, Asanuma A, Yanagisawa K : Effect of EDTA in the scala media on cochlear potentials. *Proc Japan Acad* 55 (G) : 31—36, 1979
 - 42) Tanaka Y, Asanuma A, Yanagisawa K : Potentials of outer hair cells and their membrane properties in cationic environments. *Hear Res* 2 : 431—438, 1980
 - 43) Konishi T, Butler RA, Fernandez C : Effect of anoxia on cochlear potentials. *J Acoust Soc Am* 33 : 349—356, 1961