

モルモットコルチ器支持細胞の電気的特性に及ぼすカナマイシンの影響

奥本 香苗

哺乳類のコルチ器は音刺激によって振動する基底板上に位置し、内、外有毛細胞 (IHC, OHC) の2種類の感覚細胞群と、これらを周囲から支える支持細胞群により構成されている。音受容機構は、その全容は未だ解明されておらず、現在も広範囲に研究されている。その中で、支持細胞も構造的・支持機能だけでなく、音受容に関与している可能性が示唆されている。本研究の目的はコルチ器支持細胞群、特にダイテルス細胞 (DCs) 及びヘンゼン細胞 (HEs) の膜興奮性 K チャンネルの電気生理学的特性を明らかにし、併せて、OHC に対し重篤な障害を引き起こす事が臨床的に良く知られているアミノ配糖体系抗生物質であるカナマイシン (KM) の支持細胞に対する作用から、支持細胞と OHC の共通性及び相違性を見出す事である。

モルモットの蝸牛から DCs 及び HEs を単離し、conventional whole cell パッチクランプ法を用いて、膜電流の変化を調べた。その結果、次の諸点が明らかになった。

- (1) DCs, HEs 共に、膜電流の 80 % は電位依存性外向き K 電流であった。
- (2) 細胞外から KM を投与すると、この電位依存性外向き K 電流は、DCs においてのみ急速に増加した。
- (3) この電流は、細胞外 Ca イオンに対する依存性は示さなかった。
- (4) 一方、HEs の電位依存性外向き K 電流は、KM の影響を全く受けなかった。

以上の結果から、OHC の膜電位依存性 Ca チャンネル、メカノセンサーチャンネルの抑制を引き起こすことが知られている KM は、DCs の電位依存性外向き K 電流を著明に増幅させることが示された。これは、DCs の K チャンネルの開口が、KM によって著明に増幅されることを示す。同様の現象は、OHC では、報告されておらず、DCs の特異的現象と考えられる。

(平成 9 年 10 月 28 日受理)

Effect of Kanamycin on Potassium Currents in Isolated Supporting Cells from the Guinea-pig Cochlea

Kanae OKUMOTO

The auditory sensory organ of mammals, the organ of Corti, is located on the basilar membrane. This organ consists of two types of sensory hair cells, outer and inner hair cells (OHCs and IHCs), and a surrounding network of various supporting cells, the largest part of which is made of Deiters' cells (DCs) and Hensen's cells

(HEs). The aim of the present study was to determine whether voltage-dependent currents exist in the supporting cells which are associated with the hair cells, and whether these currents are affected by kanamycin (KM), an ototoxic drug to OHCs. In the present experiment, two types of supporting cells, DCs and HEs, were freshly isolated from the guinea-pig cochlea, and the current-voltage relations of these cells were examined by conventional whole cell recording techniques. It was found that the whole cell currents of both DCs and HEs were voltage-dependent outward K currents, because these currents were suppressed almost completely by the extracellular Cs ions, and 80 % were suppressed by 10 mM TEA. When 10^{-4} M KM was added to the extracellular solution, the voltage-dependent outward K currents in the DCs were increased more than those in a normal extracellular solution, but these increased currents were not dependent on the Ca ions in the extracellular solution. On the other hand, the currents in HEs were not changed by 10^{-4} M KM in extracellular solution. From these results, it was suggested that KM has inhibitory effects on the voltage-dependent Ca channel and that a mechanosensor channel in OHC, accelerated the voltage-dependent outward K currents in DCs. (Accepted on October 28, 1997) *Kawasaki Igakkaishi* 23(3) : 155-164, 1997

Key Words ① Organ of Corti ② Kanamycin ③ Deiters' cells
④ Hensen's cells ⑤ Voltage-dependent outward K currents

はじめに

哺乳類のコルチ器は、音刺激により機械的振動を生ずる基板上に位置し、内有毛細胞 (inner hair cell, IHC) 及び外有毛細胞 (outer hair cell, OHC) の2種類の感覚細胞と、これらを周囲から支える支持細胞群により構成されている。

音受容には、IHC 及び OHC の関与が重要であるが、その機構の全容解明には未だ至っておらず、有毛細胞の聴覚における生理学的機能は現在でも広範囲に研究されている^{1),2)}。

一方、コルチ器支持細胞は、OHC を構造上直接あるいは間接的に支持し、この構造が主な機能と考えられてきた。しかし、音刺激によって引き起こされる受容器電位が支持細胞でも記録されることから、OHC と支持細胞間に電気的結合が存在し、両細胞の電気生理学的機能が、密接に関連していることが示唆されている³⁾⁻⁵⁾。これは、音刺激による OHC の興奮によって生じる

カリウム (K) 電流が、支持細胞にも連動し、支持細胞の機能が構造的支持だけでなく聴覚機構にも関与している可能性を示唆するものである。最近、比較的容易に単離できる支持細胞群の1つであるダイテルス細胞 (Deiters' cell, DCs) やヘンゼン細胞 (Hensen's cell, HEs) の生理学的機能が種々な方法で検討されているが⁶⁾⁻⁹⁾、現時点では不明な点も多い。

本実験では、OHC と支持細胞間の電気生理学的関連性が存在するならば、支持細胞も OHC 同様のイオン電流の反応が起こっていると考えられ、その点について検討した。

OHC の障害を引き起こすことが知られているアミノ配糖体系抗生物質 (AGs) は、電気生理学的には、OHC のイオンチャンネル機能を抑制することが報告されており、支持細胞と OHC が電氣的に連動しているならば、支持細胞にも同様な現象を引き起こされると考えられる。そこで、支持細胞群の中で特に OHC との関連性が強い DCs と HEs に、OHC にも存在する興奮性膜の特徴である電位依存性 K チャンネルについ

て検討し、AGsであるカナマイシン(KM)の、イオンチャンネルに及ぼす影響から支持細胞の生理的特性、OHCとの共通性及び相違性について検討した。

実験方法

1. 実験動物及び細胞単離

250~400 gの白色ハートレー系モルモット(ブライエル反射正常であり、聴覚機能が正常であると判断された)を使用した。ハロセンによる吸入麻酔下で断頭した。実体顕微鏡下に蝸牛を露出し、第2~4回転のみを摘出した。摘出蝸牛を標準細胞外液(NaCl 150 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM, Dextrose 10 mM, pH 7.4)を入れたサンプルカップ内にいれ、20分間室温下で振盪分離(MULTI MIXER, IUCHI)、その後 pipetting でDCsを単離した。HEsは、カルシウム(Ca)イオンを除去した標準細胞外液に0.1%トリプシンを加えた液を使用して、DCs同様の方法で単離した。倒立顕微鏡(Nikon製)の中心部に、底部にスライドガラスを敷いた容量1 mlの円柱形chamberを作った。その中に単離細胞を含む液を入れ、15分間放置して、細胞を沈殿させた。これらの操作は全て、室温24~26°C下で行った。

2. 電流の測定

パッチ電極は、Inter Medical社のガラス毛细管(1.5 mm×0.8 mm)から、微小電極製作器(Narishige pp83)を用いて製作した。使用した電極の先端直径は2~3 μm、抵抗は3~5 MΩであった。パッチクランプ法のConventional whole cell modeを用い、増幅器はAxon Instrument社のAxopatch 1Dを使用した。得られた記録の解析プログラムは、同社のpCLAMPを使用した。保持電位は-80 mVとし、100 ms, 10 mVのstep pulseで、膜電位を-100 mVから+90 mVまで変化させた時の膜電流の変化を記録した。尚、膜電流は、100 mS時の値で検討した。

3. 実験溶液

標準細胞外液以外の使用溶液の組成は、以下の通りである。

TEA(tetraethyl-ammonium)を含む細胞外液は、NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, TEA 10 mM, HEPES 10 mM, Dextrose 10 mM, pH 7.4とした。標準ピペット内液は、KCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4とし、CsCl置換液は、CsCl 140 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 1 mM, HEPES 10 mM, pH 7.4とした。Ca-free液は、NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 3 mM, HEPES 10 mM, Dextrose 10 mM, pH 7.4を使用した。AGsはKMを使用し、濃度は10⁻⁴ Mとして、上記の標準細胞外液とCa-free液に溶解した。

尚、本実験は、川崎医科大学動物実験委員会への承認を受け、同大学の動物実験指針に基づき実施された。

実験結果

1. DCsの電位依存性K電流

標準細胞外液、標準ピペット内液下で、DCsに脱分極パルスを与えた際に認められる電流を検討した。-80 mVを保持電位とし、-100 mVより10 mVのステップパルスで脱分極性電圧変化を与えると、-20 mV付近で急速に賦活される電流を認めた。Figure 1(control)に示した様に、DCsの脱分極性電圧変化に伴う外向き電流は、0 mVで0.68 nA, 30 mVで2.08 nA, 60 mVで3.33 nA, 90 mVで3.69 nA(n=15)と急速に電流の上昇を示した。しかし、電流-電圧曲線ではこの外向き電流は60 mV付近までは膜電位の上昇(脱分極)に伴って直線的な増加を示すにも拘わらず、それ以上の電位では増加せずプラトー相を形成した。この外向き電流が脱分極性K電流かどうかを検討するために、標準ピペット内液のKClを、K電流の特異的ブロッカーとされているCsClに置換した。その結果、Figure 1(CsCl)に示した様に、脱分極パルスに伴う外向き電流は、-20 mV付近

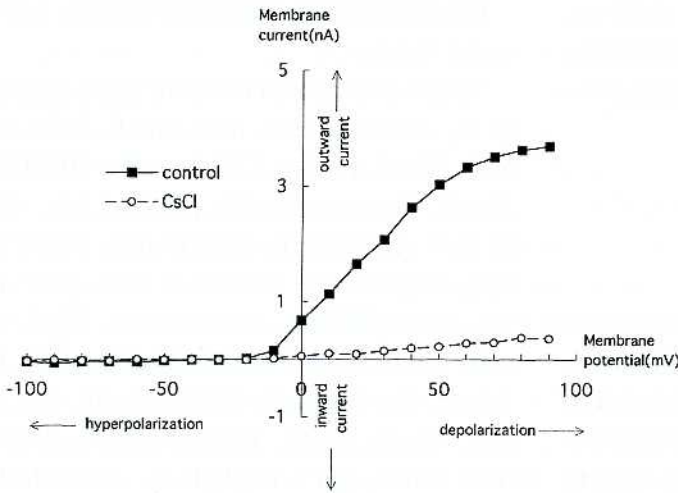


Fig. 1. I-V curve of isolated DCs, obtained with pipette solution of 140 mM CsCl and normal extracellular solution. When KCl solution was used in the pipette, outward current was generated by depolarizing voltage pulses (control). When KCl was replaced by CsCl in the patch pipette, Cs ions blocked outward current.

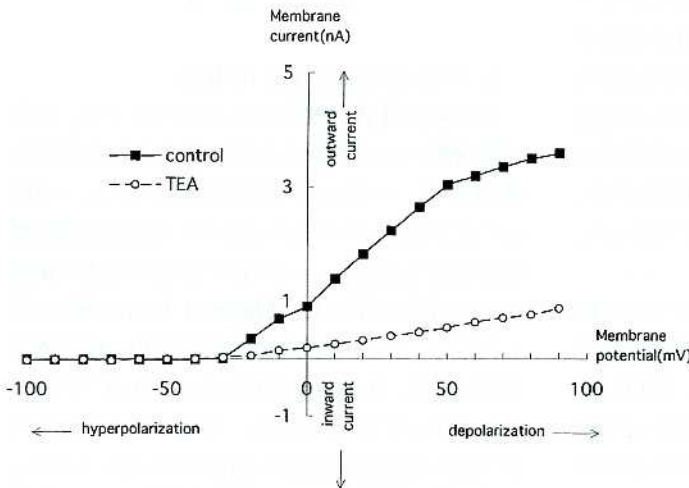


Fig. 2. I-V curve obtained from isolated DCs before and after perfusion of the cell with 10 mM TEA solution. Outward current was blocked after perfusion of the cell with 10 mM TEA solution.

た。しかし、この外向き電流は、DCsの標準細胞外液で検出された電位依存性の外向き電流の20%以下であった。この結果から、DCsで検出された電位依存性外向き電流の80%以上が、外向きK電流と推定された。

TEAは、速い活性化を示す電位依存性外向きK電流を抑制する事が知られている。平滑筋の電位依存性Kチャンネルのblockに必要なTEA濃度は10 mM以上とされており¹⁰⁾、本実験では、DCsで検出された電位依存性外向きK電流の性質を検討するために、10 mM TEAを使用した。TEAを細胞外から投与すると、電位依存性外向きK電流はFigure 2に示した様に、-20 mV付近で賦活され、0 mVで0.19 nA、30 mVで0.40 nA、60 mVで0.65 nA、90 mVで0.88 nA (n=3)の値を示した。

この膜電位依存性の電流は、電流-電圧曲線では90 mVまで直線的に上昇し、DCsに対するcontrol (Fig. 1)のような、60 mV以上の電位での電流のプラトー相の形成は認められなかった。また、DCsの標準細胞外液で検出された電位依存性外向きK電流の80%以上が抑制される事を示した。これは、DCsの標準細胞外液で検出された電位依存性外向きK電流は、TEA感受性K電流であることを

で僅かに賦活され、0 mVで0.05 nA、30 mVで0.15 nA、60 mVで0.28 nA、90 mVで0.36 nA (n=3)の値を示した。この脱分極パルスに伴う外向き電流は90 mVまで直線的に上昇し

示唆する。OHCのK電流には、Ca活性化K電流及び電位依存性外向きK電流が存在し、Csイオン、TEAに感受性を持つと報告されているが¹¹⁾、本実験では、DCsもOHC同様、Csイオ

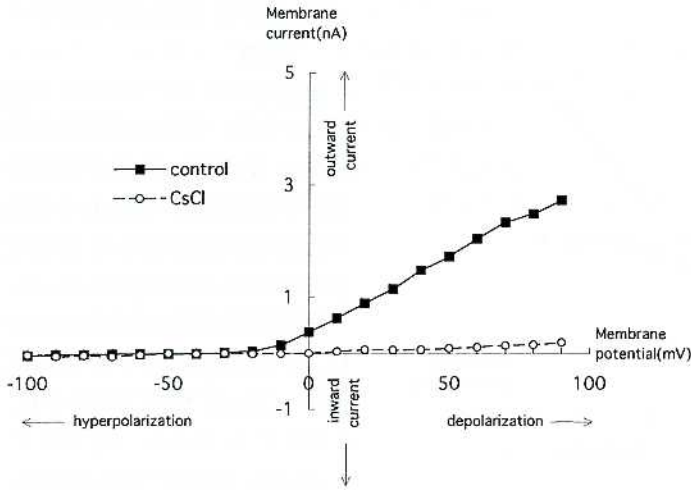


Fig. 3. I-V curve of isolated HEs, obtained with pipette solution of 140 mM CsCl and normal extracellular solution. When KCl solution was used in the pipette, outward current was generated by depolarizing voltage pulses (control). When KCl was replaced by CsCl in the patch pipette, Cs ions blocked outward current.

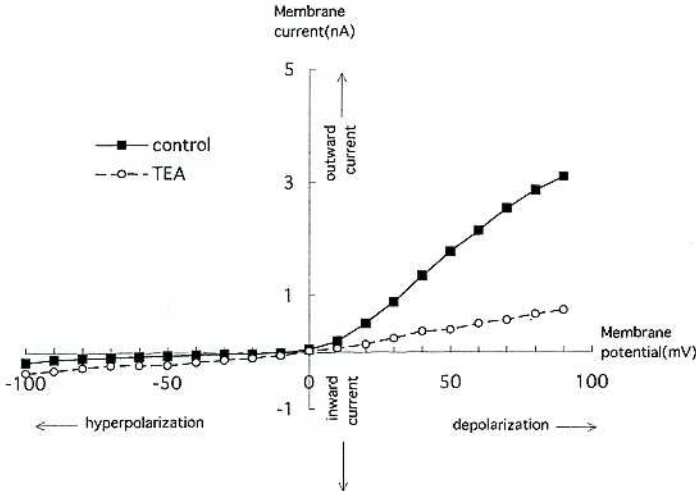


Fig. 4. I-V curve obtained from isolated HEs before and after perfusion of the cell with 10 mM TEA solution. Outward current was blocked after perfusion of the cell with 10 mM TEA solution.

ンと TEA に感受性を持つ電位依存性外向き K 電流を有し、この電流が DCs の主電流である事が明らかとなった。

2. HEs の電位依存性 K 電流の特徴

HEs に脱分極性電圧変化を与えると、**Figure 3** (control) に示す様に、DCs 同様、 -20 mV 付近で賦活される外向き電流を認めた。この電流は 0 mV で 0.38 nA、 30 mV で 1.15 nA、 60 mV で 2.05 nA、 90 mV で 2.73 nA ($n=6$) の値を示した。この膜電位依存性の電流は、電流-電圧曲線に見られるように、 90 mV まで直線的に上昇し、**Figure 1** に示されたような、 60 mV 以上の電位での電流のプラトー相の形成は認められなかった。この結果は、DCs と HEs の外向き電流の増加状態が 60 mV 付近から異なり、両細胞の関与する電流が若干異なることを示している。HEs では細胞内に CsCl を投与すると、DCs と同様 -20 mV 付近で賦活され、**Figure 3** (CsCl) に示す様に、 0 mV で 0.01 nA、 30 mV で 0.07 nA、 60 mV で 0.12 nA、 90 mV で 0.20 nA ($n=3$) の値を示した。この結果は、HEs の標準細胞外液で検出された電位依存性外向き K 電流の 90% 以上が Cs イオンで抑制され、脱分極パルスの増大に伴って増加する外向き電流は、DCs と同様、電位依存性外向き K 電流であることを示している。

この HEs の標準細胞外液で検出された電位依存性外向き K 電流は、 10 mM TEA を含む細胞外液に置換した場合、**Figure**

4 に示す様に、電流は -20 mV 付近で賦活され、 0 mV で 0.03 nA、 30 mV で 0.25 nA、 60 mV で 0.51 nA、 90 mV で 0.75 nA ($n=3$) の値を示し、HEs の標準細胞外液で検出された電位依

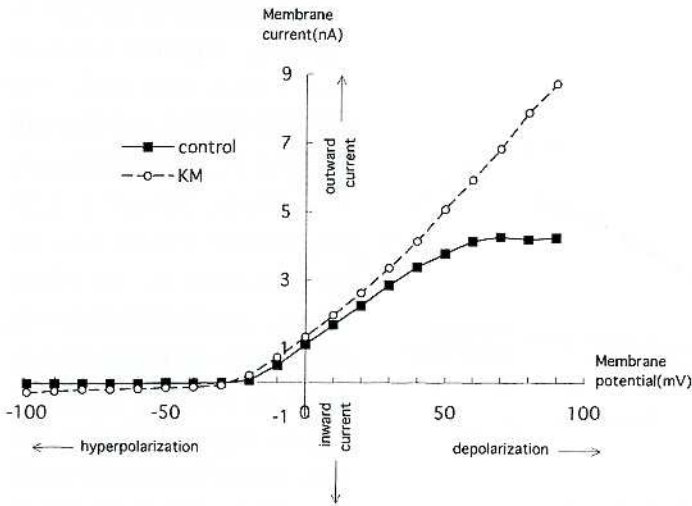


Fig. 5. I-V curve obtained from isolated DCs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution. Outward current was increased remarkably by depolarization more positive than 40 to 50 mV after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution.

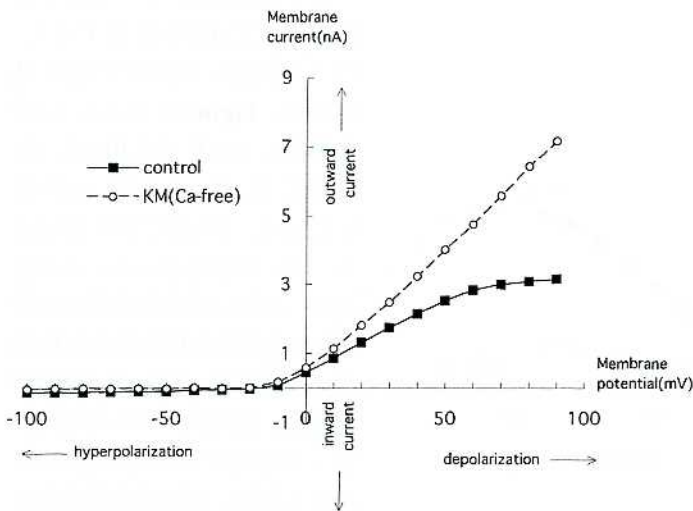


Fig. 6. I-V curve obtained from isolated DCs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution (Ca-free solution). Outward current increased remarkably after perfusion of the cell with Ca-free solution to which 10^{-4} M KM had been added.

性外向き K 電流の約 75% が抑制された。これは、HEs の標準細胞外液で検出された電位依存性外向き K 電流の大部分が、TEA 感受性 K 電流であることを示す。

3. KM の K 電流に及ぼす影響

細胞外液に 10^{-4} M KM を投与し、DCs, HEs の電位依存性外向き K 電流に対する KM の影響を検討した。Figure 5 には DCs の電位依存性外向き K 電流の KM による変化を示した。

標準細胞外液で検出された DCs の電位依存性外向き K 電流は -20 mV 付近で賦活され、 0 mV で 1.13 nA, 10 mV で 1.71 nA, 30 mV で 2.86 nA, 60 mV で 4.13 nA, 90 mV で 4.23 nA の値を示した。一方、 10^{-4} M KM を含む細胞外液での DCs の電位依存性外向き K 電流は -20 mV 付近で急速に賦活され、 0 mV で 1.36 nA, 10 mV で 1.99 nA, 30 mV で 3.36 nA, 60 mV で 5.93 nA, 90 mV で 9.00 nA の値を示し、特に 60 mV 以上で直線的な外向き K 電流の増加を示した ($n=6$)。

OHC では KM は電位依存性 Ca チャンネルを block するとの報告がある。本実験では、標準細胞外液中の Ca イオンの影響を除外するために、細胞外液から Ca イオンを除去した条件下で、KM の電位依存性外向き K 電流に対する影響を検討した。その結果、標準細胞外液で検出される DCs の電位依存性外向き K 電流は -20 mV 付近で賦活され、 0 mV で 0.46 nA, 10 mV

で 0.87 nA, 30 mV で 1.76 nA, 60 mV で 2.84 nA, 90 mV で 3.15 nA の値が得られたのに対し、Ca イオンを除去した標準細胞外液下で 10^{-4} M KM を投与した時の電位依存性外向き K

電流は、0 mV で 0.60 nA, 10 mV で 1.15 nA, 30 mV で 2.40 nA, 60 mV で 4.75 nA, 90 mV で 7.15 nA の値となり (n=4), 電位依存性外向き K 電流は直線的な増加を示した (Fig. 6). この結果は, KM によって増加する電位依存性外向き K 電流が Ca イオンによって影響されな

いことを示している.

一方, HEs では, 標準細胞外液で検出された DCs の電位依存性外向き K 電流は, DCs と同様に, -20 mV 付近で賦活され, 0 mV で 0.38 nA, 10 mV で 0.63 nA, 30 mV で 1.15 nA, 60 mV で 2.05 nA, 90 mV で 2.73 nA の値とな

ったのに対し, 標準細胞外液に 10^{-4} M KM を投与した時の電位依存性外向き K 電流は, -20 mV 付近で賦活され, 0 mV で 0.33 nA, 10 mV で 0.54 nA, 30 mV で 0.94 nA, 60 mV で 1.72 nA, 90 mV で 2.33 nA の値を示し (n=5), KM による電流の変化は認められなかった (Fig. 7). また, 標準細胞外液で検出される HEs の電位依存性外向き K 電流は -20 mV 付近で賦活され, 0 mV で 0.15 nA, 10 mV で 0.29 nA, 30 mV で 0.57 nA, 60 mV で 1.01 nA, 90 mV で 1.49 nA となったの

に対し, Ca イオンを除去した標準細胞外液で 10^{-4} M KM を投与した時の電位依存性外向き K 電流は, -20 mV 付近で賦活され, 0 mV で 0.13 nA, 10 mV で 0.26 nA, 30 mV で 0.52 nA, 60 mV で 0.93 nA, 90 mV で 1.42 nA の値を示し (n=4), DCs と同様, Ca イオンの影響を受けなかったが, KM の影響も認められなかった (Fig. 8). 以上の結果から, OHC を選択的に障害する KM は, 支持細胞に対して, HEs の場合反応が見られないのに対し, DCs では電位依存性外向き K 電流が著しく増加することが分かった.

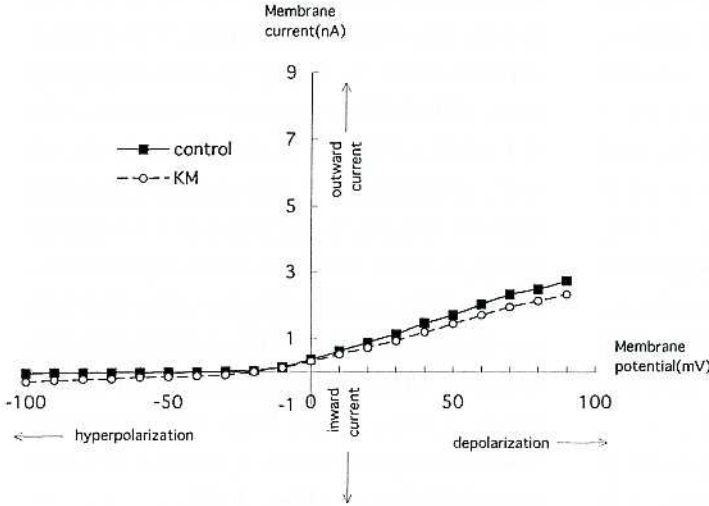


Fig. 7. I-V curve obtained from isolated HEs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution. Outward current did not increase at all after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution.

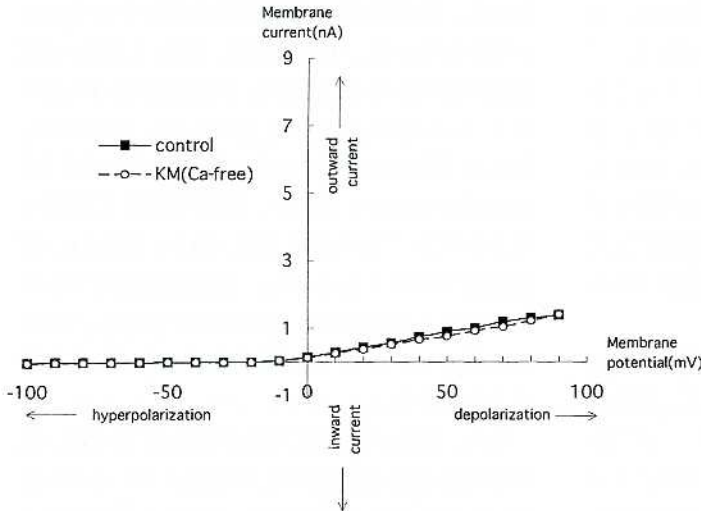


Fig. 8. I-V curve obtained from isolated HEs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution (Ca-free solution). Outward current did not increase at all after perfusion of the cell with Ca-free solution to which 10^{-4} M KM had been added.

考 察

コルチ器が存在する蝸牛管は、高 K 組成の内リンパ液で満たされている。しかし、コルチ器は、有毛細胞の帯毛面と支持細胞の一部によって形成される網状膜によって、内リンパ液と外リンパ液両液で満たされ、特殊な環境下にある。

コルチ器の機能は音受容であるが、これは基底板の振動による OHC の収縮が、蓋膜を介して IHC の感覚毛を屈曲させ、IHC の脱分極、伝達物質の放出、蝸牛神経の求心性インパルスを生じることによっておこなっている¹²⁾。この際、IHC、OHC 共に、高 K 液下にある感覚毛の屈曲により細胞外から K イオンが細胞内に流入し、細胞の脱分極を生じる事が細胞興奮の第一段階である。従って、音受容に関しては、K イオンが重要な役割を果たしていると言える。

しかし、OHC と IHC の K チャンネルの性質は全く異なっていることが知られている。すなわち、OHC の K チャンネルの電流として、Ca 活性化 K 電流と電位依存性 K 電流の存在が報告され²⁾、IHC の K チャンネルの電流として、Ca 活性化 K 電流は存在せず電位依存性 K 電流のみが存在することが報告され¹³⁾、両細胞では、有しているチャンネルが異なっているのである。これらのことから、IHC と OHC に関与する主電流は、前者が電位依存性 K 電流なのに対し、後者は Ca 活性化 K 電流であり²⁾、これは、IHC が音刺激を電気的信号に変換して中枢に伝達する機能を持つものに対し、OHC は遠心性制御による IHC の調節機能という細胞機能の相違によるためと考えられる。

コルチ器の構造的な支持機能しか有していないと考えられてきた支持細胞も、最近、聴覚機構に関与している可能性が示唆された。本実験では、支持細胞である DCs、HEs と OHC との生理機能的関連を検討するために、支持細胞の K チャンネルの性質について検討した。その結果、DCs、HEs 共に、脱分極性パルスによって外向きの電位依存性遅延整流型の K 電流のみが

惹起されることが明らかとなった。

本実験で示した DCs のイオンチャンネルを流れる電流の増加は、60 mV 付近までの電圧刺激では、直線的に増加するが、更に大きい電圧では電流の増加は無く、プラトー相を形成した。モルモットの OHC の電流-電圧曲線は、80 mV 付近を最小とする N-shape パターンを示すと報告され、Ca イオンの流入が関与していると考えられている^{11,14,15)}。Dulon¹⁶⁾ は DCs の外向き電流は、OHC 同様 N-shape パターンを示し、Ca イオンの流入が関与していると報告している。従って、本実験で示した DCs の 60 mV 以上の脱分極パルスによって形成されるプラトー相の形成には、Ca イオンが関与していると推察される。しかし、HEs では脱分極電位の上昇に伴う電流は、直線的に増加した。HEs の電位依存性外向き電流は、外液 Ca イオンには依存しないと推察される。しかし、DCs と HEs の電位依存性外向き電流は細胞外液中の Cs イオンによってその 90% が抑制された (Figs. 1, 3)。

更に、Figure 2 と 4 は、DCs と HEs の細胞外液を TEA に置換した条件での電位依存性外向き K 電流を示している。TEA は、細胞膜の内表面に働き、電位依存性 K チャンネルの開口を抑制し、活動電位の持続時間を延長させることが知られている。本実験では、DCs と HEs の電位依存性外向き K 電流は、両細胞共に TEA によって 80% 以上の抑制を示した。すなわち、DCs と HEs の電位依存性外向き電流は TEA sensitive current であり、遅延整流型 K 電流と考えられる。これらの結果は、DCs、HEs は、興奮性膜であることを示し、両細胞を構成する K チャンネルの開口は、電位勾配に依存し、流れる電流の 80% 以上は外向き電流であることを示すものである。

また、DCs の電位依存性外向き K 電流は、主に電位依存性遅延整流型 K 電流と Ca イオンに依存した電流から構成され、OHC と同様のイオンチャンネルを有していると推察されたが、HEs では主に電位依存性遅延整流型 K 電流で構成され、OHC、DCs とは異なると考えられた。

AGs は、電気生理学的研究により、神経細胞あるいはOHCの電位依存性Caチャンネル^{17),18)}、OHCのメカノセンサーチャンネル¹⁹⁾、骨格筋の電位依存性Kチャンネル²⁰⁾をblockすることが報告されている。

本実験では、OHCと同様のイオンチャンネルを有していると考えられるDCsが、KM投与によりどのような反応を示すかを検討した。DCsでは、細胞外からのKM投与により外向き電流は有意に増加した。この外向き電流は電位依存性に増加し、また、細胞外のCaイオンをfreeにした状態でも同様の反応を示し、Caイオンの影響を受けない電流であった。DCsのこの電位依存性K電流が骨格筋の電位依存性K電流と同様にKMによって抑制を受けると仮定するならば、DCs、HEs共、外向き電流は抑制されると考えられる。しかし、両細胞共に抑制は示されず、DCsでは逆に増加、HEsでは変化なしで、骨格筋の電位依存性K電流とは異なっていると考えられる。また、OHC、神経細胞と同様にKMが電位依存性Ca電流を抑制すると仮定するならば、DCsに存在するCa電流はHEsには存在しないことから、HEsの外向き電流が影響を受けないことは説明できる。Moatazら²¹⁾により、Indo-1を用いた細胞内Ca動態の研究で、ゲンタマイシンによりCaイオンの細胞内流入が抑制されると報告されており、KMにより増加したDCsの外向き電流は、Caイオンの流入が抑制され、電位依存性遅延整流型K電流がみかけ上増加している可能性がある。しかし、細胞外のCaイオンをfreeにした状態でKMを投与しても、やはり電位依存性の外向きK電流が有意に増加しており、いずれにせよ電位依存性遅延整流型K電流が賦活されていることは確かであると考えられる。HEsはDCsと異なり、細胞外のCaイオンに関わらずKM投与で外向き電流は増加傾向も抑制傾向も示さず、KMの影響を

受けないと考えられる。

本実験の結果から、DCsはKMによって膜Kチャンネルの開口を増幅させることが示された。すなわち、KMはDCsの再分極過程の増大を引き起こす可能性を示唆した。

この再分極過程の増大は、OHCのKMによる障害に対し、DCsが代償的機能を発揮する可能性を示唆するものとする。

ま と め

1. コルチ器支持細胞のKチャンネルを、パッチクランプ法 (conventional whole cell mode) を用いて検討した。
2. DCs, HEs共に電位依存性遅延整流型K電流を有していた。DCsには、Caイオンに依存する電流の存在が示唆された。
3. HEsのKチャンネルを流れる電流がKMに全く反応を示さなかったのに対し、DCsのKチャンネルはKMにより著明に開口し、これはCaイオンに影響されないことが示された。

以上のことから、KMはDCsに対して再分極過程の増大を引き起こすことによって、OHCのKMによる障害に対し代償的機能を発揮する可能性を示唆した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲を賜りました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室、折田洋造教授に深く感謝いたします。また、実験について助言、協力いただいた川崎医療福祉大学、西島博明先生に厚くお礼申し上げます。

尚、本論文の要旨の一部は、第97回日本耳鼻咽喉科学会総会(福岡、1996)および第6回日本耳科学会総会(東京、1996)において発表した。

文 献

1) Ashmore JF: Ionic mechanisms in hair cells of the mammalian cochlea. Prog in Brain Res 74: 3—

- 9, 1988
- 2) Housley G, Ashmore J : Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 448 : 73—98, 1992
 - 3) Oesterle E, Dallos P : Intracellular recordings from supporting cells in the organ of Corti. *Hear Res* 22 : 229—232, 1986
 - 4) Oesterle EC, Dallos P : Intracellular recordings from supporting cells in the guinea-pig cochlea : AC potentials. *J Acoust Soc Am* 86 : 1013—1032, 1989
 - 5) Zwislocki J, Slepecky N, Cefaratti L, Smith R : Ionic coupling among cells in the organ of Corti. *Hear Res* 57 : 175—194, 1990
 - 6) Santos-Sacchi J, Dallos P : Intercellular communication in the supporting cells of the organ of Corti. *Hear Res* 9 : 317—326, 1983
 - 7) Santos-Sacchi J : Dye coupling in the organ of Corti. *Cell Tissue Res* 245 : 525—529, 1986
 - 8) Santos-Sacchi J : Isolated supporting cells from the organ of Corti : Some whole cell electrical characteristics and estimates of gap junctional conductance. *Hear Res* 52 : 89—98, 1991
 - 9) Dulon D, Moataz R, Mollard P : Characterization of Ca^{2+} signals generated by extracellular nucleotides in supporting cells of the organ of Corti. *Cell Calcium* 14 : 245—254, 1993
 - 10) Volk KA, Matsuda JJ, Shibata EF : A voltage-dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells. *J Physiol* 439 : 751—768, 1991
 - 11) Fuchs PA, Evans MG : Potassium currents in hair cells isolated from the cochlea of the chick : *J Physiol* 429 : 529—555, 1990
 - 12) 高坂知節 : 蝸牛の微細構造と音受容機構. *Otol Jpn* 1 Suppl 2 : 1—167, 1991
 - 13) Kros CJ, Crawford AC : Potassium currents in inner hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 421 : 263—291, 1990
 - 14) Meech RW : Calcium-activated potassium currents in nervous tissue. *Annu Rev Biophys Bioeng* 7 : 1—18, 1978
 - 15) Ohmori H : Ionic currents and transduction currents in the hair cell of the chick. *Biomed Res* 71 : 103—107, 1986
 - 16) Dulon D : Ca^{2+} signaling in Deiters cells of the guinea-pig cochlea : Active process in supporting cells. *Active Hearing* : 195—207, 1994
 - 17) Suarez-Kurtz G, Reuben JP : Effect of neomycin on calcium channel current in clonal GH3 pituitary cells. *Pflugers Arch* 420 : 493—499, 1992
 - 18) Nakagawa T, Kakehata S, Akaike N, Komune S, Takasaka T, Uemura T : Effect of Ca^{2+} antagonists and aminoglycoside antibiotics on Ca^{2+} current in isolated outer hair cells of guinea pig cochlea. *Brain Res* 580 : 345—347, 1992
 - 19) 君付 隆 : メカノセンサーチャネルによる聴覚受容機構とストレプトマイシンによる聴覚障害. イオンチャネルと疾患. 倉智嘉久 編, 東京, 羊土社. 1993, pp 144—157
 - 20) Oosawa Y, Sokabe M : Voltage-dependent aminoglycoside blockade of the sarcoplasmic reticulum K^{+} channel. *Am J Physiol* 250 : 361—364, 1986
 - 21) Moataz R, Saito T, Dulon D : Evidence for voltage sensitive ca^{2+} channels in supporting cells of the organ of Corti : Characterization by Indo-1 fluorescence. *Adv Biosci* 83 : 53—59, 1992