研 究

蝸牛内直流電位に対する
Ca関連薬剤の作用

佐 藤 幸 弘

Effects of Nifedipine and EGTA on Endocochlear
Potential in the Guinea Pig

Yukihiro Sato

(Kawasaki Medical School)

The endocochlear potential (EP) was measured in guinea pigs given calcium channel blockers and calcium chelating agents. The test solutions were administered either intravenously or by perilymphatic perfusion.

Blood pressure was monitored during the intravenous infusion of nifedipine. The EP was decreased by intravenous nifedipine. The systemic blood pressure decreased immediately when 1 mg/kg of nifedipine was given and the EP started to fall after about 30 sec. While 0.1 mg/kg of nifedipine was being infused, the EP remained nearly unchanged until the blood pressure decreased irreversibly. With 0.01 mg/kg, neither the blood pressure nor the EP showed any detectable change. It was concluded that the decrease of EP during the intravenous administration of nifedipine is secondary to its hypotensive action.

During perilymphatic perfusion of nifedipine the EP fell from +70 mV to +54 mV and then returned to the initial level when the control solution without nifedipine was perfused again.

EGTA, in a concentration of 10 mM decreased the EP but only transiently, and there was a prompt return to the control level. EDTA in a concentration of 4 mM had no significant effect on the EP. These results suggest that Ca ions play a role in maintaining the EP.

Key words: endocochlear potential, intravenous administration, perilymphatic perfusion, nifedipine, EGTA

はじめに

蝸牛内直流電位 (endocochlear potential, EP) は血管条辺縁細胞で Na-K ポンプおよび K

ポンプによって産生される +100mV の electrogenic potential および濃度差による -20mV の K の拡散電位の結果として +80mV が存在す

と考えられている¹⁾²⁾。また近年Na-Kポンプとともに、CaイオンがEPの産生に関与していることが指摘されている。

Bosher³⁾, Ninoyu et al⁴⁾, Ikeda et al⁵⁾⁶⁾は、外リンパは 10^{-3}M のオーダーに対して、内リンパCaイオン濃度は 10^{-5}M に過ぎないことを報告している。これらの著者は外リンパ腔よりCaイオンが内リンパ腔に向かって移動していることを示唆している。またCaイオンの作用機序について、Caイオンは拡散電位58mVを産生するが⁵⁾⁶⁾、辺縁細胞の能動輸送機構がcAMP依存性である可能性もあり、その経路を介して作用することも示唆している。

細胞内Caイオンが、種々の作用に重要な役割をしていることは多くの研究者に受け入れられてきた⁷⁾。したがって辺縁細胞に流入するCaを阻止したときEPがどのような変化を受けるかを明らかにすることは重要であると考えられる。今回の実験においては、カルシウム拮抗剤の全身投与および外リンパ腔灌流による投与、およびCaキレート剤の外リンパ腔投与によるEP変化を測定した。EGTA液で灌流した時のEP変化については、その結果の一部をすでに報告した⁸⁾。

方 法

手術手技：ハートレー系モルモットをpentobarbital sodium 30mg/kg腹腔内投与suxamethonium chlorideにて不動化した。呼吸は気管内に挿入した気管カニューレを通して人工呼吸器によって維持された。腹側経路にて蝸牛を露出した。すなわち、顎二腹筋と茎状突起を除去した後、中耳骨胞が十分観察できるように開窓した。毛細管微小電極には3M KClを満たし、EPが測定できるまでマイクロマニピュレーターにて蝸牛基底回転にあけた小孔より中央階に挿入した。体温は自製の保温器を使って一定に保った。

電位測定：電極は高入力抵抗増幅器(AVZ-8, 日本光電)に接続され、デジタル電圧計(DL-709, TRIO)でEPを読み取りながら

オシロスコープ(VC-10, 日本光電)とペンレコーダー(R-102, 理化電機)に表示した。

動脈圧測定：頸動脈にカテーテルを留置し、トランスジューサ(TR200T, 日本光電)を介してポリグラフ(multipurpose polygraph, 日本光電)に表示した。

全身投与ニフェジピン：ニフェジピン(sigma, bayer)はDMSO(dimethyl sulfoxide)に溶解した後生理食塩液1.5mlに希釈し約2分間かけて頸静脈に投与した。

外リンパ腔灌流：灌流用ピペットはガラス毛細管の先端を切断して作製し、先端直径は約 $10\mu\text{m}$ とした。実験初期には2本のシリンジに試験液と対照液とをみだし、シリコンチューブ、三方活栓を通してピペットに接続し、三方活栓において対照液から試験液へ切り替えた。この方法を第一法とする。人工外リンパ液は $10\mu\text{l}/\text{min}$ の速度で、基底回転鼓室階を入口とし、基底回転前庭階を出口として注入した。第一法を用いると対照液からテスト液に変換する時、ピペットを動かさなくてよいという利点があるが、試験液の灌流開始時間を明らかにできないという欠点がある。実験の後半では灌流用ピペットを一旦抜き去り先端に試験液が満たされたのを確認した後再び挿入した。この方法によって開始時間は明らかになり第二法とした。対照外リンパ液は130mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl_2 , 2mM MgCl_2 , 0.1mM NaH_2PO_4 , 10mM NaHCO_3 , 5mM glucose, 10mM HEPES, pH7.4に調整した。ニフェジピンはそれぞれの実験の前にDMSOに溶解し、 CaCl_2 を含まない対照液に添加した。EGTA溶液は当量の CaCl_2 を MgCl_2 におきかえ Ca^{2+} と Mg^{2+} の濃度の和を一定に保った。EDTA溶液では CaCl_2 と MgCl_2 ともに除去した。

結 果

1. ニフェジピン全身投与におけるEPの変化 ニフェジピン1mg/kg群

第1例は投与直後よりEPは初期値の+80mVから低下し始め15分後には-18mVに至っ

表1 ニフェジピン全身投与例

	濃 度 (mg/kg)	E P 初期値 (mV)	E P 最終値 (mV)	E P 最下値 (mV)	観 察 時 間 (分)
1	1	80	-18	-18	16
2	1	78	-22	-33	41
3	0.1	94	96	94	34
4	0.1	94	98	94	22
5	0.1	100	98	98	89
6	0.1	76	-12	-34	37
7	0.01	84	76	76	35
8	0.01	97	98	96	30

表2 ニフェジピン外リンパ腔灌流例

	ニフェジ ピン濃度 (ng/ml)	E P		灌 流 時 間 (分)	灌 流 方 法
		初期値 (mV)	最小値 (mV)		
1	100	86	82	32	2
2	100	96	96	33	2
3	200	70	14	50—70	1
4	400	74	64	18	2
5	400	78	24	40	2
6	400	92	10	120	2
7	1000	70	55	44	2
8	1000	84	54 以下	54	2
9	1000	84	25	70	2

図1 ニフェジピン1mg/kg全身投与におけるEP

て安定し（図1），第2例でもほぼ同様の結果であった。

ニフェジピン0.1mg/kg群

4例中1例では，投与直後よりEPは初期値の+76mVから低下し始め20分後には最下値-34mVに達した（図2），しかし他の3例（表1 第3，4，5例）にてはEPの変化はなかった。

ニフェジピン0.01mg/kg群

1例（表1 第7）において初期値+84mVから数mVの軽度の変化は認めたがEPの低下は認めなかった（図3）。もう1例はEPは不変であった。EPの変化を測定した全例について表に示す（表1）。

2. ニフェジピン全身投与における動脈圧の変化

ニフェジピンを投与することにより全身血圧が低下する事は周知のことであり全身血圧の変化を検討することが必要となった。

a) ニフェジピン1mg/kg投与時の動脈圧変化

収縮期初期圧52mmHgより，投与後速やかに低下し，脈圧は認められなくなり約30秒後に最下値30mmHgに到達した（図4）。

図2 ニフェジピン0.1mg/kg全身投与におけるEP

図3 ニフェジピン0.01mg/kg全身投与におけるEP

b) ニフェジピン0.1mg/kg投与時の動脈圧変化

収縮期初期圧60mmHgより、投与後低下し約1分20秒後には最低値30mmHgに到達したが、投与後約14分後には脈圧は回復した(図5)。

c) ニフェジピン0.01mg/kg投与時の動脈圧変化

収縮期動脈圧は投与前の75mmHgの値に保たれており、変化は認められなかった(図6)。

3. ニフェジピン外リンパ腔灌流のEPにおよぼす効果

全身血圧のEPにおよぼす効果を除外するため外リンパ腔を選択的に灌流した。外リンパ腔灌流速度によりEPの変動を来す可能性があるが、20 μ l/minの速度でもEPが安定することが確認された。しかし安全のため10 μ l/minの速度で灌流を行った。つぎに、灌流液の交換方

図4 ニフェジピン1mg/kg全身投与における動脈圧

図5 ニフェジピン0.1mg/kg全身投与におけるECGおよび動脈圧

図6 ニフェジピン0.01mg/kg全身投与におけるECGおよび動脈圧

法で第二法を用いた場合、再挿入により圧の変化のためEPの変動を来す事がある。しかし予備実験にて対照液から対照液に変更しても、交換の直後にはEPは約5mVの変化を生じるだけで交換後も安定した値が得られた。よって以後第二法を用いた。

a) ニフェジピン外リンパ腔灌流

対照外リンパ液にてEPが安定した後ニフェジピン外リンパ腔灌流を開始するとEPは徐々に低下し始め、最低値に到達するが、対照液にて薬液を洗いながすことによりEPは上昇し可逆性が示された。濃度を低下させた場合はEPの低下は示さなかった。ニフェジピン100, 200, 400, 1000ng/ml各濃度において測定したEP値は要約して表2に示した。

b) 外リンパ液よりCaイオンを除去した際のEPへのおよぼす効果

4mM EDTAにて外リンパ腔を灌流した場合、3例ではEPは減少せず、そのうちの1例ではかえって8mVの上昇が認められた。

10mM EGTAにて外リンパ腔灌流を施行した場合3例中1例では、EPは初期値+80mVより最低値+67mVに低下しEGTAを継続して灌流しても回復し、他の2例にても約20mVの低下が認められた。

考 察

動脈圧とEPについて検討すると、ニフェジピン1mg/kg投与では顕著な動脈圧の低下を起し非可逆的であり、EPの減少を生じさせる。0.1mg/kgでは動脈圧の変化は比較的軽度でEPの減少を起こさなかったものが4例中3例であったが、EPの減少する例も1例認めた。これは、0.1mg/kgが臨界濃度であり個体の薬物感受性に多少の差異があるためと思われる。しかしニフェジピン0.01mg/kgの低濃度を投与する時は動脈圧にも、EPにも変化はきたさなかった。EPは低酸素または無酸素条件に対して極めて敏感であることが知られている。蝸牛局所血流遮断の場合、潜時も極めて短く2, 3秒で急激に電位が低下しレスピレータ停

止でも約20~40秒の潜時にて低下することが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。本実験ではEP低下の潜時は25~35秒であり動脈圧の変化より潜時が長いので、ニフェジピンの血管条細胞に対する直接の効果と言うよりも、むしろ急激な血圧低下の結果、蝸牛血流低下が起こればEPが低下したものと考えられる。また投与量が少なく血圧に変動が少ない場合EPに変動はないものと思われる。近年、突発性難聴の治療にCa拮抗剤を用いる報告があるが¹¹⁾¹²⁾、臨床投与量では重篤な血圧の変動もなくEPの低下等は来さないものと思われる。

全身条件を除いた蝸牛の選択的灌流では表2に示すようにニフェジピン投与によりEPが低下することが明らかになった。しかし、これは単離された動脈平滑筋より域値が高いが、灌流することにより薬液が拡散されて血管条に到達したことによるものと思われる¹³⁾。

ニフェジピンのEPにおよぼす影響について3つの説明が可能である。興奮細胞において周囲からのCa流入を防ぐようにニフェジピンが血管条に対して作用するものと考えられる。ニフェジピンは静止時の心筋のCa流入を減少させはしないがもし、血管条細胞が脱分極と再分極とを繰り返しているならば血管条細胞内Ca流入がニフェジピンにより抑制されることはあり得るであろう。EP低下の第一の説明として、細胞内Caイオン濃度が低下すると、Na-Ca交換が抑制され細胞内Naイオン濃度が減少し、その結果Na-Kポンプ活性が低下しEPの減少がおこると考えられる。しかし、Na-Ca交換自体血管条にての存在は明らかでない。第二の説明として、ニフェジピンによるCa流入の減少がcAMPの活性に関与することである。YoshiharaとIgarashi¹⁴⁾はその組織化学的実験にて血管条にCa-ATPaseが存在することを報告している。もし細胞のCaの流入がニフェジピンにより阻害された場合、結果としてcAMP依存性の反応が阻止されることが考えられる。血管条のcAMPが内リンパ液組成を

制御することも想定できるので^{15)~17)}Na-Kポンプもカルシウム流入阻止により阻害される可能性がある。第三に、Ca²⁺の拡散電位によりEPの低下が説明される。内リンパ遊離Ca濃度は10⁻⁵M、外リンパの1/100以下の濃度である。Ca²⁺拡散電位は+58mVでEPの方向も同じであるが、実際の電位より小さい。もし血管条、細胞内カルシウム濃度がニフェジピンにより降下し他の条件がかわらなければEPは増加することが期待できる。これはニフェジピンのCa濃度勾配に対する説明としては最も可能性が少ない。

Konishi¹⁸⁾は4mM EDTA灌流にてCM振幅は減少するがEPは低下しないと報告している。しかし、本研究において10mM EGTA液で灌流するとEPは一過性に約13mVまで降下した⁸⁾。

EGTAのEP低下に対する効果の機構はニフェジピンの作用のそれに類似しているものと考えられ、血管条へのCaの流入を阻止することと思われる。4mM EDTAと10mM EGTAの結果の相違は濃度差によるものと思われる。灌流溶液は一樣に前庭階、鼓室階に分布せずCaは周囲組織から移動してきているものと思われる。つまり4mMは内リンパ液と外リンパ液のCaをキレートするには少なすぎたものと考えられる。高濃度Caキレート剤でEPが減少したが、この変化は一過性で他の領域より移動してきて、EGTAのキレート作用が代償され、内外リンパ液のCa濃度が回復したものと考えられる。

まとめ

蝸牛内直流電位に対するCa拮抗剤(ニフェジピン)およびCaキレート剤(EGTA)の作用をモルモットを用いて検討した。

1. ニフェジピン全身投与0.01mg/kg以下の濃度ではEPに変化をおよぼさない。それより高濃度でEPの低下を来したものは動脈圧の急激な変化によるものと推測する。

2. ニフェジピン外リンパ腔灌流100ng/ml

以下の濃度ではEP低下を来さないが、それより高濃度にて低下する。

3. 高濃度Caキレート剤にてEPが低下する。

4. 血管条への Ca^{2+} の流入が蝸牛内直流電位生成に必要と思われる。

稿を終わるに臨み、御指導と御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、同第一生理学教室、松村幹郎教授に感謝いたします。

なお本論文の要旨は、第31回日本オージオロジー学会（北九州，1986），第38回日本生理学会，中国四国地方会（徳島，1986），日本耳鼻咽喉科学会第13回中国地方連合講演会（岡山，1987），第35回日本基礎耳科学会（東京，1988），日本生理学会第65回大会（和歌山，1988）において発表した。

参考文献

- 1) Kuijpers W and Bonting SL: The cochlear potential, II; The nature of the cochlear endolymphatic resting potential. *Pflugers Arch* 320: 359~372, 1970.
- 2) Sellick PM and Johnstone BM: Differential effects of ouabain and ethacrynic acid. *Pflugers Arch* 352: 339~350, 1974.
- 3) Bosher SK: Very low calcium content of cochlear endolymph, an extracellular fluid. *Nature* 273: 377~378, 1978.
- 4) Ninoyu O and Meyer zum Gottesberge AM: Calcium transport in the endolymphatic space of cochlear and vestibular organ. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 102: 222~227, 1986.
- 5) Ikeda K, Kusakari J, Takasaka T, et al: The Ca^{2+} activity of cochlear endolymph of the guinea pig and the effect of inhibitors. *Hear Res* 26: 117~125, 1987.
- 6) 池田勝久, 草刈 潤, 高坂知節, 他: 内リンパ Ca^{2+} 濃度の測定一酸素欠乏, フロセマイド, アセタゾラミドの影響一. *Audiology Japan* 29: 240~245, 1986.
- 7) Baker P: Calcium and the Cell. *Ciba Foundation Symposium* 122. pp 1~4, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, UK, 1986.
- 8) 佐藤幸弘, 折田洋造: Caキレート剤のEPにおよぼす効果. *Ear Research Japan* 19: 424~426, 1988.
- 9) Konishi T, Butler RA and Fernandez C: Effect of anoxia on cochlear potentials. *J Acoust Soc Am* 33: 349~356, 1961.
- 10) 安野友博: モルモットにおける Endocochlear Potential に関する実験的研究. *日耳鼻* 65: 193~219, 1962.
- 11) Mann T, Beck C and Beck CH: Calcium antagonists in the treatment of sudden deafness. *Arch Otorhinolaryngol* 243: 170~173, 1986.
- 12) 市村恵一, 村上 泰, 周 明仁: 突発性難聴に対するカルシウム拮抗剤療法. *耳鼻臨床* 79: 2023~2030, 1986.
- 13) Sperelakis N: Electrophysiology of calcium antagonists. *J Mol Cell Cardiol* 19: 19~47, 1987.
- 14) Yoshihara T and Igarashi M: Cytochemical localization of Ca-ATPase activity in the lateral cochlear wall of the guinea pig. *Arch Otorhinolaryngol* 243: 395~400, 1987.
- 15) Schacht J: Adenylate cyclase and cochlear fluid balance. *Am J Otolaryngol* 3: 328~331, 1982.
- 16) Zajic G, Anniko M and Schacht J: Cellular localization of adenylate cyclase in the developing and mature inner ear of the mouse. *Hear Res* 10: 249~261, 1983.
- 17) Anniko M, Spangberg ML and Schacht J: Adenylate cyclase activity in the fetal and the early postnatal inner ear of the mouse. *Hear Res* 4: 11~12, 1981.
- 18) Konishi T and Keisey E: Effect of calcium deficiency on cochlear potentials. *J Acoust Soc Am* 47: 1055~1062, 1970.

（原稿採択：昭和62年9月19日 急載）
別刷請求先：佐藤幸弘
〒701-01 岡山県倉敷市松島577
川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室