研 究

外有毛細胞への塩酸ビフェメランの影響

池田 勝久・高坂 知節

Effects of Bifemelane Hydrochloride on the Outer Hair Cells

Katsuhisa Ikeda and Tomonori Takasaka

(Tohoku University School of Medicine)

The intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in the cochlear outer hair cells (OHC) of the guinea pig was measured with a microfluorimetric imaging technique and the effects of free radicals and bifemelane hydrochloride were investigated. The application of hypoxanthine (HX) plus xanthine oxidase (XO) to the OHC resulted in an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the presence of external Ca^{2+} . Elimination of external Ca^{2+} did not cause an increase in $[Ca^{2+}]_i$. The elevation of $[Ca^{2+}]_i$ induced by HX-XO was reduced by the addition of superoxide dismutase. These findings indicate that superoxide anions generated in the OHC increase Ca^{2+} influx across the membrane. Administration of bifemelane hydrochloride significantly inhibited the increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by HX-XO, suggesting that bifemelane has a therapeutic effect on pathological events in the OHC.

Key words: outer hair cell, free radicals, intracellular free calcium, bifemelane hydrochloride

緒 言

活性酸素は老化, 炎症, 酸素欠乏, 耳毒性薬物などによる蝸牛障害の原因の1つに挙げられている。蝸牛において活性酸素の消去系が発達していることが立証されており¹⁾, 酸素ストレスに対する防御機構を持っていることが推察できる。紫外線によって惹起された活性酸素は外有毛細胞を非可逆的に極めて遅い速度で収縮させることが報告されており²⁾, 活性酸素が外有毛細胞の生物活性に障害を与えることが示唆された。我々は既に活性酸素によって外有毛細胞の細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することを示し, 蝸牛障害の病態に関連する現象であると考えてい

る³⁾。

今回, 脳代謝賦活剤である塩酸ビフェメランが活性酸素による外有毛細胞への作用を抑制したことを見出したので報告する。

実験方法

体重 200~300 g の白色モルモットをエーテルで麻酔後に断頭し, 側頭骨を摘出した。蝸牛の骨壁を取り去り, 第Ⅲ又はⅣ回転のコルチ器を採集した。これらの操作は実体顕微鏡下で, 純酸素にて飽和した人工外リンパ液 - 150 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM Mg Cl_2 2.75 mM HEPES, 2.25 mM tris (pH 7.4) の溶液内にて施行した。摘出したコルチ器は

Ca 蛍光指示薬である fura-2 AM ($3 \mu\text{M}$) を 30～40 分間、 37°C 下で負荷された。その後、ピペットによる機械的操作によって外有毛細胞を単離し、カバースリップ上にのせた。実験中は 37°C の酸素で飽和した溶液を 1.6 ml/min で灌流した。組織の観察は倒立顕微鏡 (IMT-2, オリンパス) を用いて行った。100 W のキセノンランプから生じた 2 波長の励起光を交互に細胞に照光し、発生した蛍光像を 510 mm の干渉フィルターを通して超高感度 TV カメラ (c-2400-8, 浜松ホトニクス) でとらえ、イメージプロセッサー (ARGUS-50, 浜松ホトニクス) によって解析した^{4)～6)}。

種々の Ca^{2+} -EGTA 液によって得られた校正曲線から細胞内 Ca^{2+} 濃度を算出した⁷⁾。使用した薬剤は hypoxanthine (HX, 1.0 mM , 和光純薬), xanthine oxidase (XO, 10 mU/ml , Fluka), Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD, 10 U/ml , Sigma), 塩酸ビフェメラン ($1 \mu\text{M}$) である。

統計学的処理は paired-t 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意な変化とみなした。

結 果

XO は HX を基質としてスーパーオキシドを産生することが知られている⁸⁾。HX と XO の同時投与によって細胞内 Ca^{2+} 濃度は一過性の増加を示し、その除去によって元の値に戻った (図 1)。細胞内 Ca^{2+} 濃度は無刺激時で $103 \pm 15 \text{ nM}$ ($n=16$) であり、HX と XO の存在下で $172 \pm 21 \text{ nM}$ の最大値をとった。外液の Ca^{2+} を取り除いた状態では Ca^{2+} 濃度の上昇は認めず、細胞外 Ca^{2+} の流入が細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加の原因であることが判明した (図 1)。スーパーオキシドの消去薬である SOD の前処置によって、HX と XO による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が抑制された (図 2)。HX と XO により細胞内 Ca^{2+} 濃度は $80 \pm 5 \text{ nM}$ ($n=4$) の増加を示したが、SOD によってその増加は $14 \pm 9 \text{ nM}$ ($n=4$) へと有意な減少を示した。

塩酸ビフェメランの単独投与は細胞内 Ca^{2+} 濃度に変化をもたらさなかったが、HX と XO

によってもたらされた細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇 ($75 \pm 15 \text{ nM}$, $n=5$) は塩酸ビフェメランによって有意に抑制された ($15 \pm 8 \text{ nM}$, $n=5$) (図 3)。

考 察

スーパーオキシドによって引き起こされた細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加は外有毛細胞の運動能に影響を与えることが推察される。1 つは遅い収縮であるが、この収縮機構に必要な Ca^{2+} 濃度は今回スーパーオキシドによって増加した濃度をはるかにしのぐため、遅い収縮能の関与は少ないと考えられる。一方、蝸牛の外有毛細胞は膜電位に依存した速い電氣的収縮能を有しており、周波数弁別能に貢献している。外有毛細胞のコンダクタンスは主として細胞内 Ca に依存している K チャンネルによって占められており、

図 1 hypoxanthine と xanthine oxidase による細胞内 Ca^{2+} 濃度への影響。HX: hypoxanthine, XO: xanthine oxidase, 0 Ca: 細胞外 Ca^{2+} の除去。

図 2 hypoxanthine と xanthine oxidase による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加への superoxide dismutase の影響。HX: hypoxanthine, XO: xanthine oxidase, SOD: superoxide dismutase.

膜電位はK⁺の電位勾配によって決定されている。従って、膜電位は細胞内Ca²⁺の制御を受けており、外有毛細胞の細胞内Ca²⁺濃度は音受容機構において重要な役割を荷なっている⁹⁾。スーパーオキシドによって得られた細胞内Ca²⁺濃度の増加によって容易に膜のK⁺チャンネルは活性化し、過分極そして伸長をもたらすことが考えられる。

今後、スーパーオキシドによる外有毛細胞の収縮への観察が必要となろう。スーパーオキシドによる外液のCa²⁺の流入機序として電位依存性Ca²⁺チャンネルの関与が示唆されている³⁾。今回は塩酸ビフェメラミンの影響を検討した。塩酸ビフェメラミンには脳神経系に対する種々の薬理作用が報告されている^{10)~12)}。しかし蝸牛への報告は少なく¹³⁾¹⁴⁾、蝸牛有毛細胞への細胞レベルでの検討はなされていない。塩酸ビフェメラミンがスーパーオキシドによるCa²⁺流入を阻害した所見はi)スーパーオキシドの消去作用またはii)Ca²⁺流入機構に対する阻害作用によって説明できるが、今回の結果からはどちらの作用が主体であるかは結論できず、今後の検討を要する。蝸牛の種々の病態が外有毛細胞の収

縮能の障害に基づく受容機構の変化によって生じる可能性があること¹⁵⁾を考えると、老化、炎症、酸素欠乏などによる蝸牛病態の背景因子としての活性酸素の過剰産生は細胞内Ca²⁺濃度の増加による収縮能の異常を引き起こすことが推察される。塩酸ビフェメラミンの外有毛細胞への作用はその病変の保護効果として位置付けられることを示唆している。今後の基礎および臨床面での研究の発展が期待される。

参考文献

- 1) Pierson MG and Gray BH : Superoxide dismutase activity in the cochlea. *Hear Res* 6 : 141~151, 1982.
- 2) Dulon D, Zajic G and Schacht J : Photo-induced irreversible shortening and swelling of isolated cochlear outer hair cells. *Int J Radiat* 57 : 1007~1014, 1989.
- 3) Ikeda K, Sunose H and Takasaka T : Effects of free radicals on the intracellular calcium concentration in the isolated outer hair cell of the guinea pig cochlea. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 113 : 137~141, 1993.
- 4) Ikeda K, Saito Y, Nishiyama A, et al : Effects of pH on intracellular calcium level in isolated

図3 hypoxanthine と xanthine oxidase による細胞内Ca²⁺濃度の増加への塩酸ビフェメラミンの影響。HX : hypoxanthine, XO : xanthine oxidase, BIF : 塩酸ビフェメラミン。

- cochlear outer hair cells of guinea pigs. *Am J Physiol* **261** : C231~C236, 1991.
- 5) Ikeda K, Saito Y, Nishiyama A, et al : Intracellular pH regulation in isolated cochlear outer hair cells of guinea-pig. *J Physiol* **447** : 627~648, 1992.
- 6) Ikeda K, Saito Y, Nishiyama A, et al : Na^+ - Ca^{2+} exchange in isolated cochlear outer hair cells of the guinea-pig studied by fluorescence image microscopy. *Pflugers Arch* **420** : 493~499, 1992.
- 7) Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY : A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260** : 3440~3450, 1985.
- 8) McCord JM : Oxygen-derived radicals in post-ischemic tissue injury. *N Engl J Med* **312** : 159~163, 1985.
- 9) Hudspeth AJ : How the ear's works work. *Nature* **341** : 397~404, 1989.
- 10) 包 仕堯, 成富博章, 佐々木将博, 他 : 実験的虚血脳浮腫に及ぼす 4-(o-benzylphenoxy)-N-methylbutylamine hydrochloride (bifemelane) の影響. *脳神経* **38** : 163~167, 1986.
- 11) Egashira T, Nagai T, Kimba Y, et al : Effects of bifemelane hydrochloride on various cholinergic markers in cortical and subcortical regions of aged rats. *Jpn J Pharmacol* **51** : 211~218, 1989.
- 12) 勝井義一, 竹沢英郎, 辻田悦治, 他 : 脳血管障害に対する 4-(O-Benzylphenoxy)-N-methylbutylamine hydrochloride (E-0687) 錠使用の臨床的検討. *診療と新薬* **21** : 2505~2531, 1984.
- 13) 森崎博伸, 中島 務, 柳田則之 : 塩酸ビフェメランの蝸牛血流, 脳血流への影響. 第38回日本基礎耳科学会. 181頁, 1991.
- 14) 奴久妻聡一, 中村耕一郎, 佐藤善一, 他 : 酸素欠乏モルモットにおける ABR に対するビフェメランの効果と蝸牛の変化. 第35回日本基礎耳科学会. 168頁, 1989.
- 15) 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.

原稿受付 : 平成 5 年 9 月 6 日
原稿採択 : 平成 6 年 11 月 22 日
別刷請求先 : 池田勝久
〒980 仙台市青葉区星陵町1-1
東北大学医学部耳鼻咽喉科学教室