

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

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.

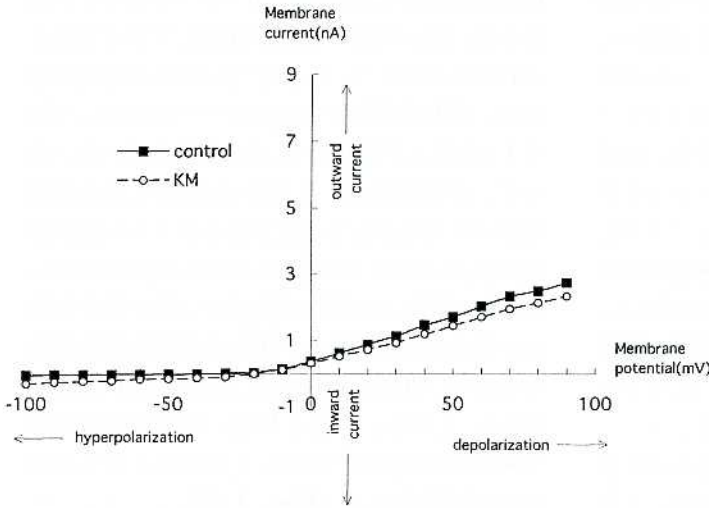


Fig. 7. I-V curve obtained from isolated HEs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution. Outward current did not increase at all after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution.

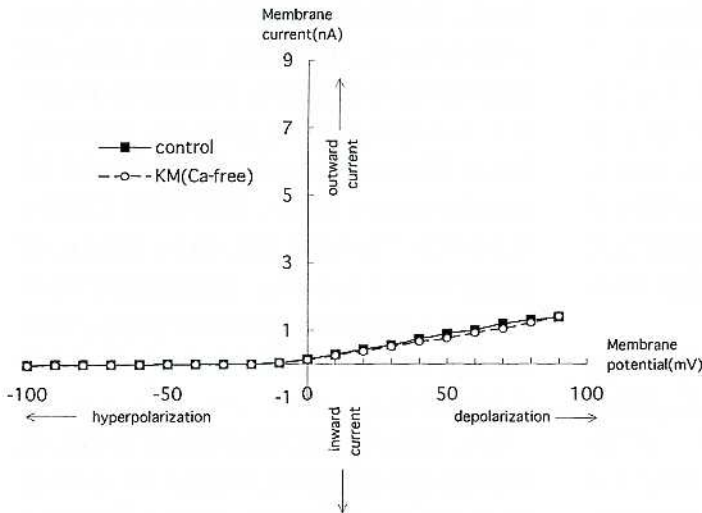


Fig. 8. I-V curve obtained from isolated HEs before and after perfusion of the cell with 10^{-4} M KM solution (Ca-free solution). Outward current did not increase at all after perfusion of the cell with Ca-free solution to which 10^{-4} M KM had been added.

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のにに対し、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