

蝸牛内直流電位に対する Procaine の作用 : Dimethyl Sulfoxide との比較

山川 純至

Procaine と Dimethyl sulfoxide (DMSO) の Endocochlear DC potential (EP) に対する作用を比較検討した。Procaine は 0.5w/v % 以上において, DMSO と同様に EP を一過性に上昇させた後低下させた。EP の Negative component に対する影響を調べるために, anoxia 負荷を加えて Procaine と DMSO との外リンパ灌流を併用し, EP の変化を観察した。両者共に Negative component が減少したことから EP の一過性上昇は基底膜の電気抵抗が増大したことによると, 考えられた。ただ負電位からの回復が DMSO より Procaine が大きく, Procaine が Positive component を増加させたことが示唆された。

(平成4年6月3日採用)

Effects of Procaine as Compared with those of Dimethyl Sulfoxide on the Endocochlear DC Potential in Guinea-Pig

Junshi Yamakawa

Endocochlear DC potential (EP) is composed of two components; the positive component provided by the active $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump on the marginal cells and the negative component produced by the electrochemical potential across the basilar membrane. I have already reported that dimethyl sulfoxide (DMSO) demonstrated an initial transient increase in EP due to reduction in the negative component and a late sustained decrease which resulted from a decrease in the positive component. In the present study, the effects of procaine were investigated using the perilymphatic perfusion method and they were compared with those of DMSO for the purpose of evaluating their effect on the negative component of EP. Guinea pigs weighing 250–450 g were anesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (30mg/kg). Perilymphatic perfusion through the scala tympani with 1.0 w/v% procaine caused an initial transient increase in EP of 7 mV, which was followed by a late sustained decrease toward +10 mV. A similar observation was made during DMSO perfusion. The initial increase was considered to be caused by reduction in the negative component, which could be attributed to an increase in the membrane resistance of the basement membrane, while the late decrease was produced by inhibition of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump. Even when the positive component had been previously abolished by treatment for anoxia, both procaine and DMSO were seen to increase EP as a result of reduction in the negative component. When both chemicals

were introduced to the scala tympani after EP had fallen below 0 mV following anoxia loading, they produced an increase or a partial recovery of EP. This result suggests that the positive and negative components operate independently from each other. There were differences, however, between the effects of procaine and DMSO on EP recovery. First, the degree of EP recovery from a fall during anoxia was greater with procaine than that with DMSO. Secondly, the degree of EP recovery with procaine was dependent on timing or the level of the falling phase of EP caused by anoxia loading. If procaine was applied at the early phase of anoxia, the final recovery levels were around +20 mV, whereas they were +40 mV if procaine was applied at the later phase of anoxia. These results altogether indicated that procaine not only reduced the negative component but also facilitated the transmission of the positive component depending on the activity of the Na^+-K^+ pump, while DMSO only reduced the negative component. The indirect effect on EP of dilation of the blood vessels of the stria vascularis rather than the direct effect on the positive component was involved in the greater recovery of EP by procaine. (Accepted on June 3, 1992) *Kawasaki Igakkaishi* 18(2): 93-100, 1992

Key Words ① Procaine ② Dimethyl sulfoxide
 ③ Endocochlear DC potential ④ Negative component
 ⑤ Membrane resistance

緒 言

約+80 mVの蝸牛内直流電位(EP)は、生体内最大の静止電位である。この点は聴神経の活動電位(AP)に対する感度を増幅させるような役割を果たしていると考えられている。このEP生成の原因に関して、EPが測定される中央階は細胞外であるにもかかわらず K^+ 濃度が高くしかも、正電位が発生している点が特徴的である。血管条辺縁細胞のbasolateral sideにある Na^+-K^+ pumpが主要な役割を果たしていることは明らかであるが、luminal sideに K^+ secretion pumpが存在するか、あるいはその側の細胞膜の K^+ コンダクタンスが大きいことによるか、未だ明確に説明されていない。^{1),2)} luminal sideの細胞膜の K^+ コンダクタンスが大きいという仮定にもとづいてEPを説明するために、この Na^+-K^+ pumpは三分子の Na^+ の汲み出しに対して二分子の K^+ の取込である一般的な Na^+-K^+ pumpとは異なり、 K^+ 取込が Na^+ 汲み出しより

も多い特殊なポンプであるという考えも提出されている。³⁾ イオン機構の詳細は別として、 Na^+-K^+ pumpは蝸牛管に正電位をもたらすので、これをpositive componentと呼び、他方、基底膜を介して蝸牛管と鼓室階との間の K^+ の拡散電位は蝸牛管に負の電位をもたらすので、これはnegative componentとも言われている。⁴⁾ 実際にanoxiaによって酸素感受性の Na^+-K^+ pumpが停止するとEPが-20~-40 mVまで低下するが、⁵⁾ この電位はHodgkin&Katzの式より求めた K^+ の拡散電位と一致することが確認されている。⁶⁾ 測定されるEPはpositive componentとnegative componentとの和である。

前論文においてDimethyl Sulfoxide(DMSO)を外リンパ腔灌流するときEPが一過性に上昇した後低下する事を認め、最初の上昇はnegative componentの減少によると説明した。⁷⁾ Jourdanらは⁸⁾ DMSOがhybrid glioma cellにおいて Na^+ 、 K^+ および Ca^{2+} によって運ばれる膜イオン電流を非選択的に減少させることから、DMSOの効果は麻酔薬の作用と類似すると説明してお

り, Becker らは,⁹⁾ DMSO は局所的麻酔薬と同様に末梢神経の伝導を遮断することを報告している. DMSO の麻酔薬類似の作用が EP についても認められるかどうかを明らかにするために, 本研究では Procaine の EP に対する作用を検討し, これを DMSO の作用と比較した. また両者が, negative component に実際どう影響するかをみるために, anoxia 負荷と外リンパ灌流による薬物負荷を併用し EP に対する効果を検討した.

方 法

ハートレー系モルモットを用いた. pentobarbital sodium, 30 mg/kg を腹腔内に注射して麻酔し, suxamethonium chloride を併用して不動化した. 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, 体温は自製の保温器を使って一定に保った. 動物を背位に固定し, 腹側から中耳骨胞を開窓し蝸牛基底回転に小孔をあけ, ここから 3 M KCl を満たした毛細管微小電極を刺入した. 電極先端が中央階に達すると EP が測定できる. 電極は高入力抵抗増幅器 (AVZ-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) で記録した外リンパを灌流するには, 基底回転鼓室階にもう一つ小孔をあけ, ここからマイクロピペットを挿入し, 電動ポンプで灌流液を 10 μ l/min の速さで注入し基底回転前庭階に作成した小孔より流出させた. 灌流液の交換は一度ピペットを抜き, ポンプからピペットまでの灌流液を完全に交換してから再び挿入し灌流した. 人工外リンパ液の組成は, 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaHCO₃, 5

mM glucose, 10 mM HEPES pH 7.4 である.

Procaine hydrochloride (Sigma) および Dimethyl Sulfoxide (Sigma) は, 所定の濃度になるように人工外リンパ液で希釈した. anoxia 負荷は単に人工呼吸器を止めることによって行った.

結 果

1. Procaine 灌流中の EP の変化

正常外リンパ液を灌流し, EP のレベルが一定に達した後 Procaine を含む外リンパ液の灌流を開始した. EP は Procaine 液灌流後すぐに上昇し始め, 3 分間に 8 mV 上昇した. ここで正常人工外リンパ液を灌流して Procaine を洗い去ると, 2 分間に 6 mV 低下する (Fig. 1). Procaine 灌流時間を 5 分以内にとどめるならば, この EP 変化は可逆的であり正常外リンパ液で灌流すると EP は最初の値に戻り, 再び 0.2% Procaine を灌流すると EP の上昇が繰り返す認められる. Procaine を反復灌流したとき可逆性の示された結果を Figure 2 に掲げる. 0.2% Procaine 灌流における 3 例について EP 上昇の

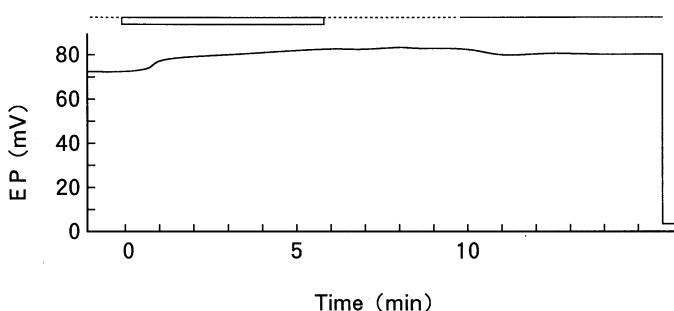


Fig. 1. Changes in EP during perfusion with 0.2 w/v % procaine. Mark \square indicates the period of perfusion with the perilymphatic solution containing procaine and — does the period of perfusion with the standard perilymphatic solution. During the period indicated \cdots , perfusion was interrupted due to the exchange of perfusing pipettes. At the end of the experiment the electrode was withdrawn from the scala media. The potential of +2 mV indicates that a DC drift was negligibly small in the course of experiment.

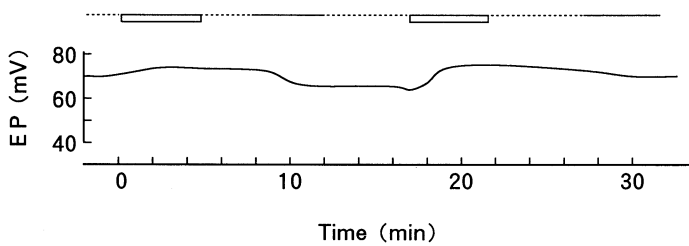


Fig. 2. Reversible change in EP caused by the application and washout of 0.2 w/v % procaine. Marks \square , — and are the same as those in Fig. 1.

Table 1. Initial transient rise and final steady value of EP at different concentration of procaine.

| Procaine concentration (w/v·%) | EP before procaine perfusion (mV) | Rise of EP after the start of procaine perfusion (mV) | Final EP during procaine perfusion (mV) |
|--------------------------------|-----------------------------------|---|---|
| 0.2 | 72 | 8 | 80 |
| 0.2 | 70 | 5 | 74 |
| 0.2 | 76 | 10 | 86 |
| 0.5 | 71 | 10 | 70 |
| 0.5 | 86 | 10 | 86 |
| 1.0 | 70 | 7 | 30 |
| 1.0 | 70 | 11 | 13 |

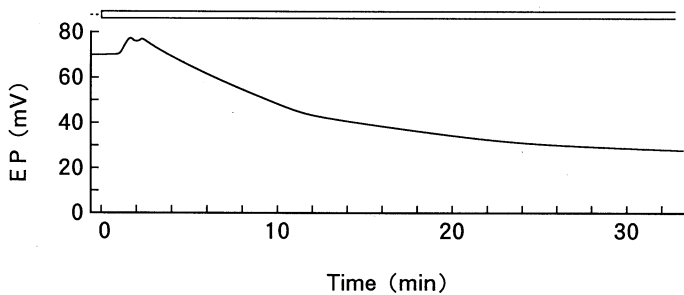


Fig. 3. Changes in EP during perfusion with 1.0 w/v % procaine. Procaine perfusion started at time 0. Marks of \square and indicate the same periods as those in previous figures.

振幅の結果を Table 1 に示す。

Procaine 濃度を高くして、1% Procaine 液を灌流した時の EP 変化について、1例を Figure 3 に示す30秒後に EP は 7 mV 上昇し2.5分間持続した後低下した。0.5%では1%より低下の程度は少なかった5匹の動物について同様の

実験を行ったがその結果を Table 1 に要約して示す。

2. anoxia 条件における Procaine の作用

Figures 1, 2 および 3 に示されるように、Procaine 灌流の最初に EP が上昇する。この EP 上昇の原因の一つとして、基底膜の膜抵抗が Procaine によって増大するためであろうと考えられる。Procaine の negative component に対する作用をより明瞭にするために、anoxia 条件において positive component を減弱ないし消失した状態において Procaine 灌流の効果を検討した。

anoxia 負荷にて EP が 0 mV に達した時に Procaine の灌流を開始すると30秒後に上昇して約+20 mV に達し、灌流を中止すると再び負電位にまで低下した(Fig. 4)。anoxia 負荷では0 mV までは速やかに、しかもほぼ一定の速度で低下し、負電位になると低下の速度が減少する。anoxia を中止すると速やかに上昇する。anoxia 負荷後に、Procaine を灌流した時に認められる EP の上昇は anoxia 負荷と Procaine 灌流との時間間隔にも依存している。Figure 5 は anoxia 負荷の後 EP 値が -20 mV のほぼ定常の最低値になった時点で Procaine の灌流を開始したときの EP の経過を示す。Procaine 灌流によって EP は直ちに上昇し、約+40 mV に達した。灌流前に EP の anoxia 負荷に対する変化が正常に起こることを確認し、anoxia 負荷と同時に Procaine を灌流すると、anoxia 負荷による EP の変化と同じ速度で低下し約+15 mV で定常に達し負電位になることはない(Fig. 6)。anoxia によって EP が低下するとき、低下

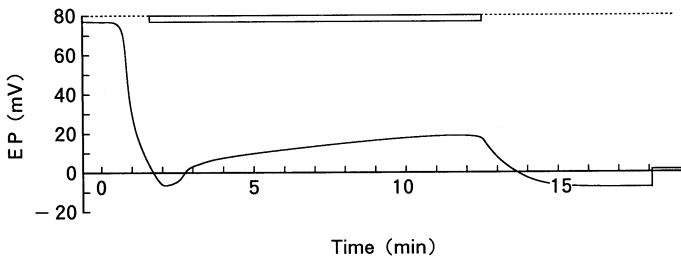


Fig. 4. Changes in EP caused by anoxia and 0.2 w/v % procaine perfusion. Anoxia loading starts at time 0 and lasts throughout the end of recording. Marks of \square and \cdots indicate the periods same as those in the previous figures. The potential of 2 mV at the end of the record means a small drift.

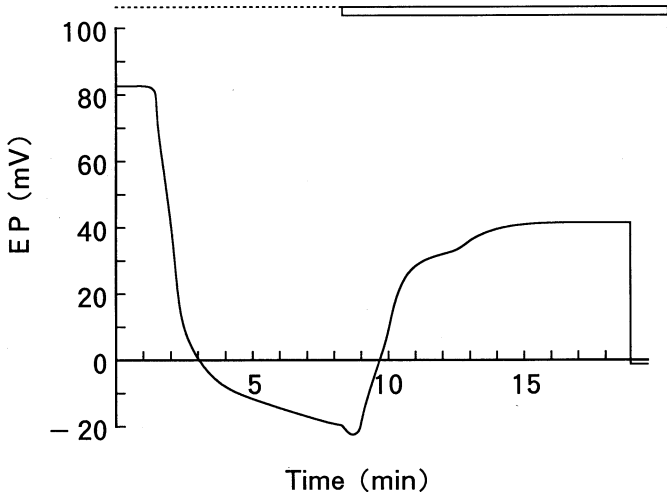


Fig. 5. Changes in EP by perilymphatic perfusion applied at the later stage of anoxia. Anoxia was loaded at the time 0.75 min throughout the end of recording. Eight min after that, scala tympani was perfused with 0.2 w/v % procaine, during the period indicated by a mark \square . The small downward deflection at the beginning of perfusion was due to a mechanical artefact of perfusate flow. The drift of the electrical potential before and after the experiment was -2 mV.

する EP のどのレベルにおいて Procaine の灌流を開始したかその時の EP と Procaine 灌流後の EP との関係についての結果を Table 2 に要約して示す。

3. anoxia 条件における DMSO の作用

DMSO の作用が麻酔薬の膜抵抗を増大させる作用に類似しているかどうかを anoxia 条件で

DMSO 灌流の効果を検討した。Figure 7 は anoxia 負荷の後 EP 値が -40 mV のほぼ定常になった時点で DMSO 灌流を開始したときの EP の経過を示す。DMSO 灌流によって EP は直ちに上昇し約 $+0$ mV に達したが再び低下しほぼ定常になった。

考 察

1. Procaine 灌流による EP の変化

外リンパ灌流法により Procaine を加える時 EP は Procaine 濃度に依存して変化することを認めた。Procaine 濃度が 0.2% では EP は持続的に上昇する。0.5% 及び 1% では一過性上昇後低下した。Koniishi らは Procaine の EP に対する変化を検討し、0.1% の濃度において僅かに上昇することを報告しているが、¹⁰⁾ 本研究においても同様に 0.2% の濃度で EP の上昇を認め、さらに高い濃度では EP の低下が後続することを明らかにした。1% Procaine の灌流にみられる EP 変化は先に示した DMSO による一過性上昇と後続の低下と、その時間経過が類似した。⁷⁾

EP 上昇作用の機序については、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ pump 促進による positive component の増加と基底膜の膜抵抗増加による negative

component の減少が挙げられる。本実験では局所麻酔薬に K^+ イオンと Na^+ イオンの膜透過性を抑制する作用があり、¹¹⁾ 基底膜における蝸牛管と鼓室階との間の電気抵抗が Procaine によって増大したと考えられる。同様の機序による EP の増大は、DMSO の他にも重金属イオン、¹²⁾ Ba^{2+} 、¹³⁾ バナジン酸¹⁴⁾ などを外リンパ灌流によって認め

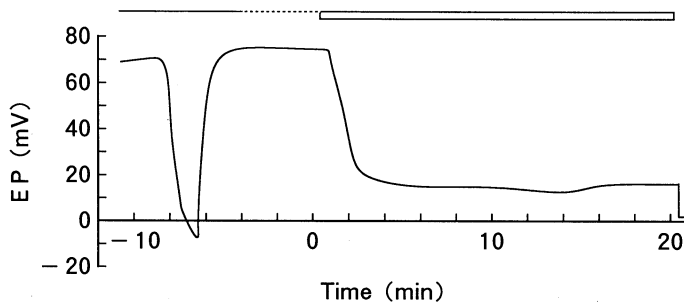


Fig. 6. Changes in EP caused by the simultaneous procaine perfusion with anoxia loading. First, anoxia was loaded for 2 min, and meanwhile EP fell to -9 mV and recovered back to the original level of $+72$ mV after interruption of anoxia. Then, at time 0, anoxia loading and procaine perfusion were simultaneously imposed. The decay of EP was observed to be partially inhibited by 0.2 w/v % procaine. Marks of \square and \cdots indicate the periods the same as described in the previous figures.

Table 2. EP decayed during anoxia loading. Procaine was introduced at the different levels of decay phase. Relation between EP level at which procaine perfusion was started and finally attainable EP

| control EP (mV) | EP at which procaine perfusion was started (mV) | final EP (mV) |
|-----------------|---|---------------|
| 76 | 0 mV | 18 mV |
| 76 | 0 mV | 22 mV |
| 80 | -16 mV | 40 mV |
| 75 | -20 mV | 34 mV |
| 72 | 72 mV | 15 mV |
| 70 | 70 mV | 20 mV |

られることが報告されているところである。また高濃度の溶液を灌流した場合に一過性の EP 上昇を認めやすい点から有毛細胞の basolateral membrane は比較的容易にその膜透過性が低下すると考える。

高濃度でみられる低下の原因として、まず Na^+-K^+ pump が抑制され positive component が低下することが考えられる。つぎに、血管条の辺縁細胞の管腔側に作用して、 K^+ イオンの透過性を低下させる可能性もある。もし、こ

の部の K^+ イオン透過性が低下すれば、たとえ EP の発生源である Na^+-K^+ pump が正常であっても EP は低下するであろう。

2. anoxia 条件で Procaine 灌流による EP の変化

anoxia によって Na^+-K^+ pump 活性が低下し、positive component を減弱ないし消失させた状態で Procaine を作用させ、EP の変化を調べた。anoxia 負荷によって EP が 0 mV 以下の負電位まで低下したところで Procaine を灌流するとき、EP は $+20 \sim +40$ mV の正の方向に向かう、つまり Procaine は anoxia による EP の低下を抑制するという事実が得られた。このことは EP 上昇作用が anoxia 負荷の条件下においても生じることを示しており、イオン透過性の低下すなわち negative component の減少によることを意味するといえる。DMSO においても同様であった。しかし、Procaine の場合それだけでは今回のような $+20 \sim +40$ mV の正の電位を発生しない。DMSO では EP の回復は約 0 mV であるが、Procaine だけが正電位を示すのは、Procaine が別の作用を併せもつといえる。灌流を中止すると低下する非常に早い

反応性は、圧効果を予期させた。⁵⁾ しかしこれは基板が前庭階側から鼓室階側に変位すると EP が上昇するもので鼓室階からの圧効果では Figure 5 の灌流開始時に認められるように EP は低下する。よって EP の正電位までの上昇の原因とは考えにくい。血管条では酸素感受性の Na^+-K^+ pump は、ミトコンドリアの多い辺縁細胞の basolateral membrane 付近の毛細血管から酸素を得ている。その血管が Procaine によって拡散し、anoxia 負荷による Na^+-K^+ pump の機

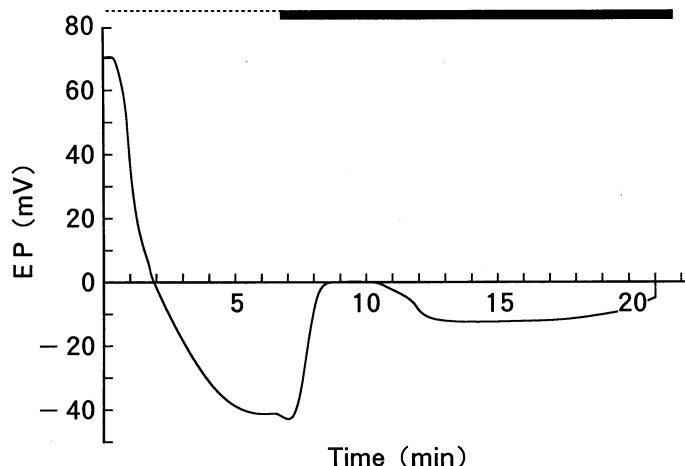


Fig. 7. Changes in EP caused by 5% DMSO perfusion during anoxia. Anoxia was loaded at the time 0, and thereafter perfusion with 5% DMSO was performed throughout the period indicated by a mark **■**. Anoxia loading was preserved to the end of the recording. The potential at the end of the record means an absence of drift in the electrical potential.

能低下が酸素が補われて機能を回復すると考えた。

次に anoxia 負荷が充分進んだ状態で Procaine の灌流を開始した場合と、anoxia 負荷と同時に灌流を開始した場合で最終の EP の値は異なる。Table 2 で示したように anoxia 負荷後で positive component がほぼ消失した時は Procaine による negative component の抑制は大きく、EP が高い正電位になった。反対に anoxia の初期で positive component がまだ残っているときに Procaine を灌流する場合は、negative component の抑制が少ない。これは、overshoot といわれる現象の機序に類似すると考える。anoxia 負荷を充分行った場合に、負荷前の EP の値よりも高くなるのは、anoxia によって末梢

血管が拡張し呼吸を再開した時代償的血流増加が起こるためであるというものである。Figure 6 では負荷を軽くするために 0 mV で人工呼吸機を再開しているために、この現象は起こっていない。

いずれにしても、Procaine が膜抵抗を増大し negative component の抑制する以外に、末梢血管を拡張して酸素欠乏を補い、positive component が回復したと考えた。Procaine は耳鳴の治療に Xylocaine より前に使われていた。¹⁵⁾ 局所麻酔薬の耳鳴に対する効果は血管拡張による作用も考えられているが、作用機序は明白ではない。今回 anoxia 条件で EP を上昇させた点は、循環障害によって低下した内耳機能に対して Procaine は作用濃度によって促進

的であると考えられる。一方、突発性難聴に対して使われる血管拡張剤が、内耳血流をどう変化させるか、EP など内耳機能にどう影響するかといった研究も近年進んでいる。

臨床では活動電位は蝸電図として測定されている電位であるが、EP は研究対照であり、その結果の clinical implication を述べるのは難しい。しかし、今回臨床で行われている治療がその電位に興味のある変化を来した点は注目に値する。

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生理学教室 松村幹郎教授、同耳鼻咽喉科学教室 折田洋造教授に深く感謝いたします。

なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費 (2-601) のもとで行われた。

文 献

- 1) Marcus, D. C. : Nonsensory electrophysiology of the cochlear : Stria vascularis. *In* Neurobiology of Hearing, ed. by Altschuler, R. A., Bobbin, R. P. and Hoffman, D. W. New York, Raven Press. 1987, pp. 123-137

- 2) Offner, F. F., Dallos, P. and Cheatham, M. A. : Positive endocochlear potential : Mechanism of production by marginal cells of stria vascularis. *Hear. Res.* 29 : 117—124, 1987
- 3) Johnstone, B. M. and Sellick, P. M. : The peripheral auditory apparatus. *Q. Rev. Biophys.* 5 : 1—57, 1972
- 4) Kuijpers, W. and Bonting, S. L. : The cochlear potentials II. The nature of the cochlear endolymphatic resting potential. *Pflügers Arch.* 320 : 359—372, 1970
- 5) 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 : 194—218, 1962
- 6) Mori, H. and Konishi, T. : Permeability to chloride ions of the cochlear partition in normal guinea pigs. *Hear. Res.* 17 : 227—236, 1985
- 7) 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
- 8) Jourdan, P., Barwald-Netter, Y. and Dubois, J-M. : Effects of dimethyl sulfoxide on membrane currents of neuroblastoma × glioma hybrid cell. *Biochim. Biophys. Acta* 856 : 399—402, 1986
- 9) Becker, D. P. : Physiological effects of dimethyl sulfoxide on peripheral nerves : Possible role in pain relief. *Exper. Neurol.* 24 : 272—276, 1969
- 10) Konishi, T. and Kelsey, E. : Effect of tetrodotoxin and procaine on cochlear potentials. *J. Acoust. Soc. Am.* 43 : 471—480, 1968
- 11) 勝田信夫 : 局所麻酔薬. 「現代の薬理学」(田中 潔編), 第15版. 東京, 金原出版. 1988, pp. 162—175
- 12) 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
- 13) Marcus, D. C. : Characterization of potassium permeability of cochlear duct by perilymphatic perfusion of barium. *Am. J. Physiol.* 247 : C240—C246
- 14) Marcus, D. C., Demott, J. E., Kobayashi, T., Ge, X. X. and Thalmann, R. : Specificity of action of vanadate to the organ of Corti. *Hear. Res.* 5 : 231—243, 1981
- 15) 安田宏一, 西田之昭, 池田雄祐 : 耳鳴に対する局所麻酔剤静注の効果. *耳喉* 45 : 97—100, 1973