

## 蝸牛内直流電位に対する Dimethyl Sulfoxide の作用

山川 純至

蝸牛内直流電位 (EP) に対する Ca イオンの関与を検討するため, Ca-ATPase 抑制作用を有する dimethyl sulfoxide (DMSO) を使用した. DMSO (2% v/v 以上) を含む人工外リンパを鼓室階から灌流するとき, EP は一過性に上昇した後低下した. 最初の EP 上昇は, 前庭階から灌流するときは認め難いことから, DMSO がコルチ器に作用しその電気抵抗を増大することによると考えられた. 後続の EP 低下の程度は DMSO の濃度に依存しており, 20% v/v 濃度では10分以内に0 mV に低下した. DMSO がイオン電流を非特異的に抑制することから, EP の低下は血管条細胞への Ca<sup>2+</sup> 流入減少による結果と考えられた.

(平成3年2月26日採用)

### Action of Dimethyl Sulfoxide to Endocochlear DC Potential

Junshi Yamakawa

Dimethyl sulfoxide was locally administered to the cochlea of the guinea pig in order to investigate the roles of Ca<sup>2+</sup> in generation of endocochlear DC potential (EP). Perilymphatic perfusion of DMSO at the concentration above 2% v/v through the scala tympani caused an initial increase in EP, followed by a late decrease. The initial increase was not clearly observed during vestibular perfusion. Probably, the site responsible for the initial increase is the organ of Corti rather than the stria vascularis. The late decrease was sustained as long as perfusion was continued. The final level was dependent on the DMSO concentration but did not exceed the 0 potential level. DMSO is known to suppress Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> current in a non-specific manner. Therefore, it was suggested that DMSO decreased Ca<sup>2+</sup> inflow into the marginal cells of the stria vascularis, which resulted in a decrease in EP.

(Accepted on February 26, 1991) *Kawasaki Igakkaishi* 17(1): 60-64, 1991

**Key Words** ① Endocochlear DC potential ② Dimethyl sulfoxide  
③ Perilymphatic perfusion ④ Organ of Corti  
⑤ Stria vascularis

#### I. 緒 言

蝸牛内直流電位 (EP) は, 内リンパ液と外リンパ液との K<sup>+</sup> 平衡電位から予測される値とは正負が逆転しており, その成因についていくつかの説明がなされている.<sup>1)</sup> 近年 EP の形成に Ca<sup>2+</sup>

の関与することが指摘されている. しかし, Ca<sup>2+</sup> がどのような機序で EP に影響を及ぼしているかは明らかではない. 先に, Sato<sup>2)</sup> は Ca<sup>2+</sup> チャンネル遮断剤である nifedipine が EP を減少させることを見だし, 血管条辺縁細胞に対する Ca<sup>2+</sup> 流入が減少して Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 交換機構が不活性化

される結果  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ ポンプが抑制されて EP が低下するであろうと示唆した。他方、血管条辺縁細胞には adenylate cyclase の存在することが指摘されており、<sup>3), 4)</sup> 細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化が cAMP-dependent protein kinase に影響してイオンチャンネルの磷酸化を導くという可能性が考えられる。第三には、細胞内情報伝達物質としての phosphoinositide 代謝系に対する細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ の影響も考慮されなければならないであろう。<sup>5)</sup> 本研究においては、第三の可能性を明らかにするため dimethyl sulfoxide (DMSO) の EP に対する効果を検討した。DMSO は、phorbol ester と協同的に働き、protein kinase C を活性化して多様な生物学的作用を発揮することが知られている。<sup>6), 7)</sup> また、DMSO はすぐれた溶剤であり、cryoprotective agent として広く用いられている物質である。

II. 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を露出した。マニピュレーターを使って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。ここで電極をさらに数十  $\mu\text{m}$  進めて固定した。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  $\mu\text{l}/\text{min}$  の速さで注入し基底回転前庭階に作製した小孔より流出させた。前庭階灌流では、基底回転前庭階より注入し蝸牛頂より流出させた。人工外リンパ液の組成は、130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.1 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,

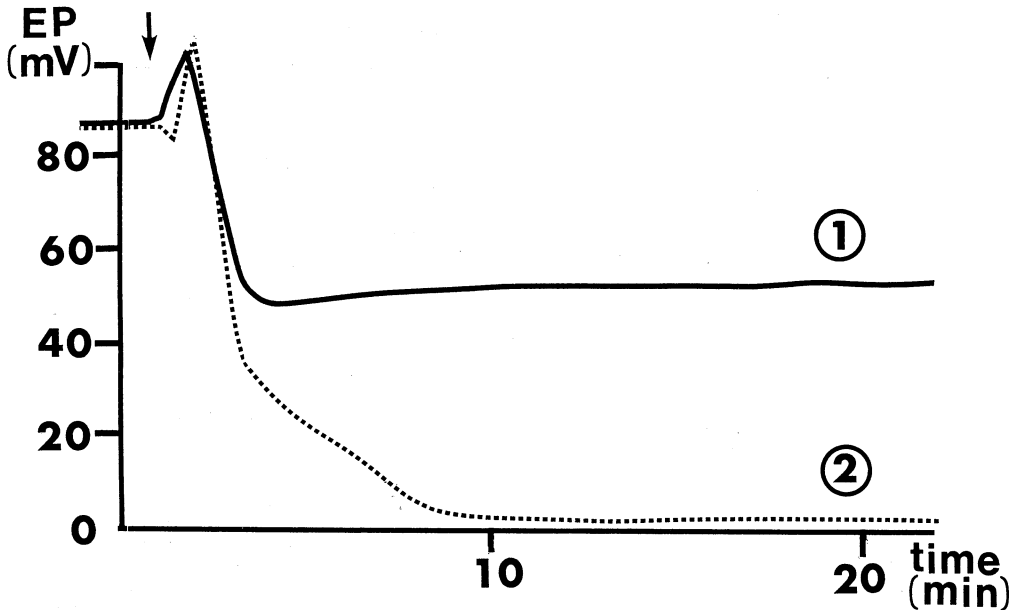


Fig. 1. Changes in EP during perilymphatic perfusion containing 10% v/v (continuous line ①) and 20% v/v DMSO (dotted line ②). At the time indicated by an arrow, the perfusing solution was exchanged from the standard to DMSO-perilymphatic solution. Time 0 means the arbitrary time during perfusion.

10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4である. DMSO(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.

### III. 結 果

電極が中央階に達すると+70 mV~+90 mVのEPが記録される. 電極刺入の直後においては

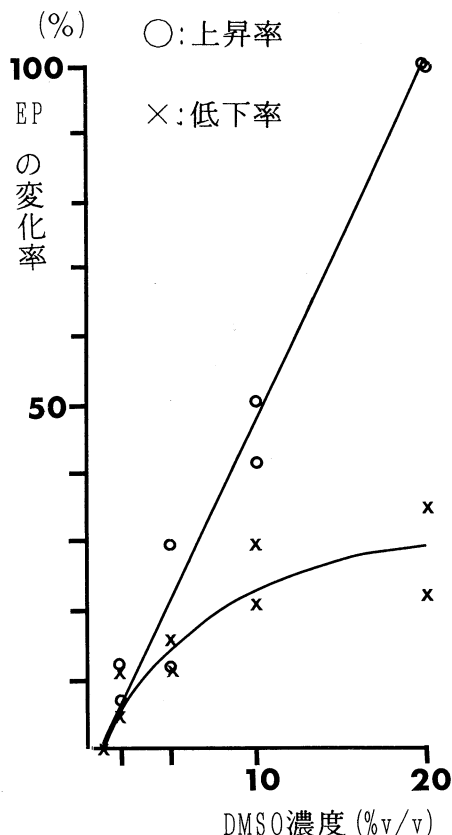


Fig. 2. Relationship between the changes in EP and DMSO concentrations. Both the initial transient rise and the following sustained fall are scaled % of EP before DMSO perfusion. The amplitude of the initial rise is indicated by crosses and is calculated from (maximum EP-control EP)/(control EP). The following fall of EP is indicated by hollow circles and is calculated from (control EP - minimum EP)/(control EP). Lines are drawn by eye.

数 mV の変動が認められるときがあるが, 20分後には定常に達する. ここで, 正常外リンパ液を灌流するとき, その開始の直後に2~3 mV 変動した. おそらく機械的な測定誤差によるものであろう. 灌流が一定速度でなされるようになると, EP は2~3時間にわたって定常の値を示した. 定常値が+70 mV 以下の試料は結果の測定から除外された.

正常外リンパ液を灌流し定常状態が得られた後, この電極を抜き取り, 代わりにDMSOを含む外リンパ液を満たしたピペットを刺入して灌流した. Figure 1 は10%および20%のDMSOを含む人工外リンパ液を灌流したときのEPの記録である. DMSO外リンパ液を灌流した直後には, EP は15~20 mV 上昇し1~1.5分間持続した後低下し始める. EP 低下は比較的速やかであり10分以内に一定値に達した. 最初の一過性のEP 上昇も, 後続の持続的なEP 低下についても, 20% v/v DMSOの方が10% v/v DMSOよりも顕著であった.

最初のEP 上昇および後続のEP 低下の程度はDMSO濃度に依存しており, その結果はFigure 2に示される. 1% v/v 濃度ではDMSOのEPに及ぼす影響は認められなかった. また, 20% v/v 以上の濃度では一層顕著な影響が予想されたけれども詳細な検討はなされていない. 2~20% v/v 濃度範囲においては, EPの一過性上昇も持続的低下も, 濃度によって増強された.

DMSOの作用が血管条細胞に対するものか, Corti器に対するものかを区別するために, 前庭階をDMSO液で灌流した. 血管条に対しては前庭階からも鼓室階からも物質の拡散を均等に受けるが, Corti器官は前庭階からの拡散を受けにくいと予想されるからである. 前庭階灌流を行ったときのEP変化はFigure 3に示される. 最初の一過性のEP 上昇は, 鼓室階を灌流したときにくらべて小さくせいぜい5 mV にすぎなかったが, 後続の持続的なEP 低下の大きさや時間経過は鼓室階灌流の場合と近似していた.

IV. 考 察

DMSO は 2% 以上の濃度で、EP を一過性に上昇し低下させるという結果を得た。

EP の一過性上昇については、バナジン酸については報告されている。Marcus ら<sup>8)</sup> はバナジン酸を灌流するとき EP が減少する前に一過性に上昇することを見だし、しかも、この上昇は鼓室階の灌流時のみ出現し前庭階を灌流しても出現しないことから、バナジン酸の EP 上昇作用は Corti 器の contraluminal membrane に対する効果であろうと示唆した。Corti 器の膜抵抗増大により EP の negative component が減少して、EP を増大させることが

期待される。細胞内 cAMP レベルを増加する forskolin は、血管条細胞における positive component を増加して EP の上昇を起こすと考えられているが、<sup>4)</sup> 本研究において認められた DMSO による EP の一過性上昇は、前庭階灌流に際して明瞭には観察されなかった事実から、血管条細胞に対するよりも Corti 器に起因すると考えられた。

Buchet ら<sup>9)</sup> は、筋小胞体 Ca-ATPase は DMSO によって可逆的に抑制されることを報告している。この点もバナジン酸と同様であり、Ikeda ら<sup>10)</sup> は既にバナジン酸の外リンパ灌流により内リンパ Ca<sup>2+</sup>濃度の低下を報告している。Yoshihara and Igarashi,<sup>11)</sup> Ikeda ら<sup>12)</sup> は血管条の marginal cell や basal cell および前庭階に Ca-ATPase の存在を示し、外リンパから内リンパへの Ca<sup>2+</sup>能動輸送を示している。これらは、内リンパ液の Ca<sup>2+</sup>を一定以上に維持し有毛細胞の

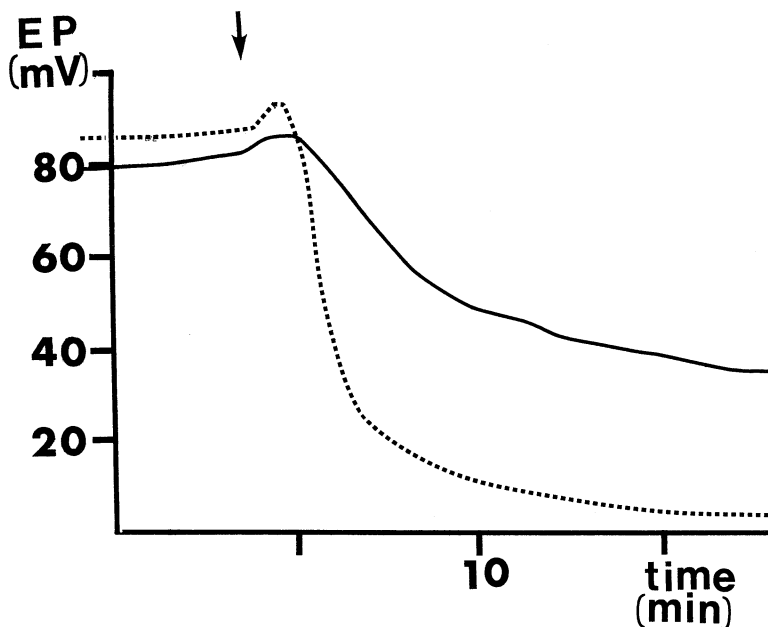


Fig. 3. Changes in EP during vestibular perfusion. The perfusion pipette was inserted into scala vestibuli at the basal turn. At the time indicated by an arrow, perfusing solution was exchanged from the standard to DMSO-perilymphatic solution. DMSO concentration were 10% v/v. Two results obtained from the separate animals are demonstrated by continuous and dotted lines.

興奮を可能にしていると推測される。また、今回 DMSO により Ca-ATPase が抑制されて、一部の血管条細胞では Ca<sup>2+</sup> overload を来していると考えた。

DMSO が持続的な EP 低下をもたらす事実は EP の生成に protein kinase C が関与することを示唆している。すでに Schacht ら<sup>13)</sup> は蝸牛におけるイノシトール燐酸の存在を示し、inositoltrisphosphate (IP<sub>3</sub>) および diacylglycerol (DG) による EP の変化を示していた。種々の腫瘍細胞において、DMSO は Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> 電流を非選択的に遮断すること、<sup>14)</sup> DG と同族体で protein kinase C を活性化する oleoylacetyl-glycerol (OAG) が Ca<sup>2+</sup>電流を減衰すること、<sup>15)</sup> DMSO は細胞分裂に対して phorbol ester と協同的に作用すること<sup>6)</sup> などが知られており、同様の作用が血管条細胞にもあるとすれば、DMSO は直接に、あるいは protein kinase C を介して

Ca<sup>2+</sup>電流を減少させ、あたかも Ca<sup>2+</sup>チャンネル遮断剤と同様の結果<sup>2)</sup>をもたらすと考えられる。

稿を終えるにあたり、ご指導とご校閲をいただい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、本論文の一部は、第42回日本生理学会中国四国地方会(平成2年11月16日)、第38回日本基礎耳科学会(平成3年2月15日)にて発表した。

## 文 献

- 1) Salt, A. N. and Konishi, T. : The cochlear fluids : Perilymph and endolymph. *In Neurobiology of Hearing : The Cochlea*, ed. by Altschuler, R. A., Hoffman, D. W. and Bobbin, R. P. New York, Raven Press. 1986, pp. 109—122
- 2) Sato, Y. : Effect of a calcium channel blocker and calcium chelating agents on cochlear electrical activity in the guinea pig. *Acta Otolaryngol.* 108 : 76—82, 1989
- 3) Schacht, J. : Adenylate cyclase and cochlear fluid balance. *Am. J. Otolaryngol.* 3 : 328—331, 1982
- 4) Doi, K., Mori, N. and Matsunaga, T. : The effect of adenylate cyclase stimulation on endocochlear potential in the guinea pig. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 247 : 16—19, 1990
- 5) 飯野正光 : カルシウム動員における IP<sub>3</sub>, IP<sub>4</sub>の役割とその機構. 「カルシウムイオンと細胞機能」(遠藤 實, 西塚泰美, 八木康一, 宮本英七編), 第1版. 東京, 共立出版. 1990, pp. 66—72
- 6) Makowske, M., Ballester, R., Cayre, Y. and Rosen, O. M. : Immunochemical evidence that three protein kinase C isozymes increase in abundance during HL-60 differentiation induced by dimethyl sulfoxide and retinoic acid. *J. Biol. Chem.* 263 : 3402—3410, 1988
- 7) Abdel-latif, A. A. : Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messenger. *Pharmacol. Rev.* 38 : 227—272, 1986
- 8) 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
- 9) Buchet, R., Jona, I. and Martonosi, A. : Correlation of structure and function in the Ca<sup>2+</sup>-ATPase of sarcoplasmic reticulum : A Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) study on the effects of dimethyl sulfoxide and urea. *Biochem. Biophys. Acta* 983 : 167—178, 1989
- 10) Ikeda, K., Kusakari, J., Takasaka, T. and Saito, Y. : The Ca<sup>2+</sup> activity of cochlear endolymph of the guinea pig and the effect of inhibitors. *Hear. Res.* 26 : 117—125, 1987
- 11) 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
- 12) Ikeda, K. and Morizono, T. : Electrochemical profile for calcium ions in the stria vascularis : Cellular model of calcium transport mechanism. *Hear. Res.* 40 : 111—116, 1989
- 13) Schacht, J. and Zenner, H. P. : Evidence that phosphoinositides mediate motility in cochlear outer hair cells. *Hear. Res.* 31 : 155—160, 1987
- 14) Jourdon, P., Berwald-Netter, Y. and Dubois, J. : Effects of DMSO on membrane currents. *Biochem. Biophys. Acta* 856 : 399—402, 1988
- 15) Rane, S. G. and Dunlap, K. : Kinase C activator 1, 2-oleoylacetyl glycerol attenuates voltage-dependent calcium current in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83 : 184—188, 1986