慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	蝸牛外有毛細胞膜の形状が電位依存性運動に与える影響
Sub Title	
Author	守本, 倫子(Morimoto, Noriko) 小川, 郁(Ogawa, Kaoru)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.3 (2003. 9) ,p.T269- T277
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030901-0269

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

慶應医学・80(3)：T269～T277，2003

学位論文

蝸牛外有毛細胞膜の形状が電位依存性運動に与える影響

慶応義塾大学耳鼻咽喉科学教室
（指導：小川郁教授）
守本倫子

（平成15年2月20日受付）

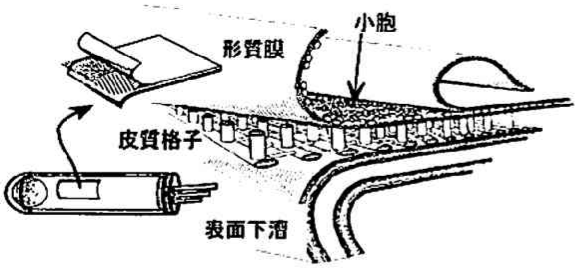
Key Word： membrane reservoir, electromotility, membrane bending, hydraulic conductivity

哺乳類の蝸牛感覚細胞には，求心性神経に支配される内有毛細胞と遠心性神経終末を受けている外有毛細胞の2種類が存在する．それぞれの細胞は振動体である基底板の上に位置し，コルチ器を形成している．内・外有毛細胞はそれぞれの上極に感覚毛を有するが，外有毛細胞の感覚毛は蝸牛蓋膜に接している．音響信号が中耳から蝸牛に伝わると弾性体である基底板が振動し，基底板上の有毛細胞と蓋膜の間にずれが生じ，感覚毛も受動的に屈曲する．有毛細胞の感覚毛先端には機械電気変換チャンネルが存在するため，感覚毛の屈曲によりこのチャンネルが開閉し，その結果，有毛細胞の膜電位が変化する．内有毛細胞はこの電位の変化を直接中枢聴覚路に伝える働きがある．一方，外有毛細胞は膜が脱分極すると収縮し，過分極すると伸展するという特徴的な電位依存性運動能（electromotility）を有し[1]，機械的なフィードバック機構を介して基底板の共鳴を鋭くする働きがある．蝸牛は音の高さによる周波数特異性を有しており，音の周波数分析を行っている．従来Bekesyが明らかにした進行波による基底板振動が周波数分析を行っていると考えられていたが，有毛細胞や蝸牛神経の鋭い周波数特異性から現在では外有毛細胞の能動的運動により基底板振動のピーク付近の振幅をさらに大きく鋭いものにすることにより，聴覚閾値を低下させ周波数弁別能を高めていると考えられている．つまり，外有毛細胞は聴覚における鋭敏な音感受性と高度な周波数選択性を調節することに関わっている．

外有毛細胞は30～80 μm長の円柱形をした細胞である．細胞側壁は特徴的な3層構造を呈しており，この構造が細胞の伸縮に関係していると考えられている．3層構造は外側から形質膜（plasma-membrane），皮質格子（cortical lattice），表面下槽（subsurface cisterna）と呼ばれている（第1図）．最外側の形質膜は脂質二重膜であり，電顕写真では波打った襞状構造を呈している[2]．また最内側の表面下槽は，複数の膜が層状構造を呈している[2,3]．形質膜と表面下槽の間に存在する皮質格子は太いアクチン線維とその間を交差してつなぐ細いスペクトリン線維から成り，ばねのように働くことで細胞骨格の役割を担っている[4~6]．さらに皮質格子と形質膜の間は柱（pillar）とよばれる構造物により橋渡しされ，一定の力で結合している[4,7,8]．

外有毛細胞の電位依存性運動は100 kHz以上の速い運動が可能であり，カルシウムやATPなどの化学的エネルギーには依存していないとされている[9]．電位依存性運動の発生機序の詳細はまだ明らかではないが，最も有力な仮説として領域運動能理論（area motor model）がある．これは細胞側壁の形質膜にある収縮タンパク（motor分子）が，形質細胞膜を横切る膜電位で駆動され，形質膜表面積の大きさを変化させる，とするものである[10~12]．最近この収縮タンパクが，分子生物学的にプレスティンと呼ばれるタンパクであり，外有毛細胞側壁に局在していることが証明された[13~15]．外有毛細胞側壁の形質膜が，機械的に変形を受け，膜の緊張が増加する

本論文は，Morimoto N, Raphael RM, Nygren A, Brownell WE：Excess plasma membrane and effects of ionic amphipaths on the mechanics of outer hair cell lateral wall. Am J Physiol 282：c1076-1086, 2002 の一部，Morimoto N, Nygren A, Brownell WE：Quantitative assessment of drug-induced change in OHC lateral wall mechanics. Recent Developments in Auditory Mechanics. (Ed) Wada H, Takasaka T, Ikeda K, Ohyama K,and Koike T, World Scientific publishing Co., Singapore, p261-267, 2000 の一部を含む．



第1図　外有毛細胞側壁の構造．外有毛細胞側壁は外側から，形質膜，皮質格子，表面下溝の3層構造からなる．

と膜容量が減少し[16]，電位依存性運動能は減弱する[17~19]．しかし，外有毛細胞は，外力による機械的変形に対して膜の浸透性を機敏に変化させ，細胞内圧を一定に保つ機構を有する[20,21]．この機構によって形質膜外の環境変化に対応し，電位依存性運動能，つまり音感受性を維持していると推定されている．しかしながら，電位依存性運動能を維持している膜張力や浸透性など外有毛細胞側壁形質膜の機械的特性の定量的分析は，ほとんど行われていない[22]．収縮タンパクによる領域運動能理論と膜の機械的特性の整合性について検討することは，外有毛細胞の電位依存性運動を解明することにつながるものと考えられる．

本研究では，外有毛細胞側壁形質膜に圧力変形を加えたときの膜表面積・体積を測定することによって，外有毛細胞形質膜における余剰膜の存在を検討した．細胞形質膜がもつ余剰膜の存在は，肺上皮細胞においても証明されており，これが機械的な力を生み出す際に重要な役割を果たすことも報告されている[23]．さらに，形質膜に作用し膜の形態と機械的特性を変化させることで知られているサリチル酸やクロルプロマジン[17,24~29]を用い，膜の張力，浸透性に対する影響を検討した．以上の結果から外有毛細胞側壁の膜特性が電位依存性運動に及ぼす効果について考察を加えた．

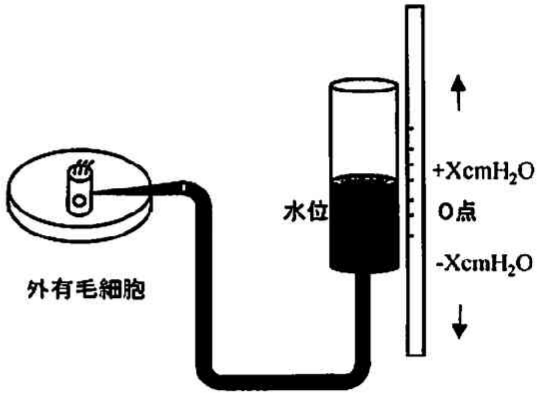
実験と方法

1．外有毛細胞単離

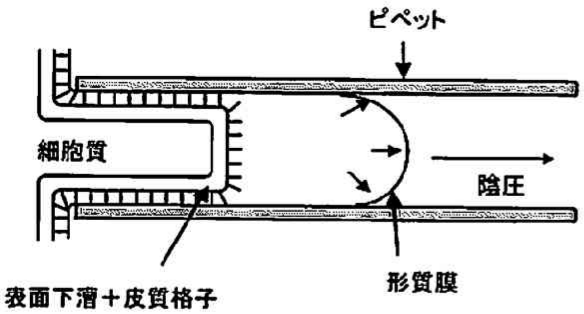
モルモットを断頭して側頭骨を取り出し，耳胞を開放したのち，探針を用いてコルチ器を注意深く蝸牛より遊離，人工細胞外液（135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, PH 7.4, 浸透圧 285～290mOsm/kg）入りの容器に浮遊させた．その後，容器内をピペットでゆっくり撹拌することによって外有毛細胞を機械的に単離した．シャーレ上に外有毛細胞を含んだ溶液を少量おき，定着させるため数分間静置した．実験には単離後3時間以内で，核が細胞の底部にあり，長さ60～80 μmの円柱形状をした状態の良い細胞のみを使用した．実体顕微鏡（Zeiss Axiovert 135 TV）下にシャーレを設置し，100x の油浸対物レンズにて得られたイメージをビデオカメラにて記録した．外有毛細胞の側壁を内径3 μm または5 μm の極細のガラス管ピペットを用いて陰圧または陽圧をかけて変形させた．

2．実験1．陰圧負荷実験（micropipette aspiration）

吸引用の微細ピペットはガラス管作製機器（Mecanex 社製）にてガラス管の内径が3 μmとなるように調整した．微細ピペットと細胞外液入りのシリンダー（水柱）をチューブで連結し，全体を細胞外液で満たした（第2図）．細胞がシャーレの底部に定着した後，ピペット先端を細胞側壁のほぼ中央の位置に接するように調節した．この時の水柱の水位をシャーレの高さに一致させ（ゼロ点），水柱をゆっくりと Xcm 下げると $-XcmH_2O$ の陰圧が細胞壁に加えられるようにした．この状態で少しずつ段階的に強い陰圧をかけていくと細胞壁はピペットの中に引き込まれ，さらにある臨界の圧力に達すると形質膜のみが内側の2層から剥離するのが観察された．そして剥離後も形質膜は徐々にピペットの内側に向かって伸展，膨隆した．伸展する形質膜と内側2層の間は細胞内液によって満たされ，風船のように膨隆した（第3図）．そして最終的には伸びている形質膜の後方が自



第2図　細胞への陰圧・陽圧負荷法．微細ピペットと水柱をチューブで連結し，細胞外液を満たす．ピペット先端を細胞側壁に接触させ，水柱を下げると陰圧がかかり，水柱を上げると陽圧がかかる．



第3図　小胞形成過程．臨界の圧力がかかると，形質膜はその下の表面下層＋皮質格子より剥離し，形質膜のみがピペット内に伸展する．そして最終的には脱離して小胞を形成する．(Morimoto N et al：Am J Physiol Cell Physiol Fig. 7 の一部を許可を得て転載)

然に閉鎖し，形質膜のみから成る小胞として遊離した[30]．一つの小胞が遊離すると同時に次の新しい形質膜が伸び始め，再度新しい小胞が形成される．こうして小胞が形成，遊離する過程をビデオテープに記録して，外有毛細胞の長さ，半径，表面積，および体積と形成された小胞の体積，表面積を計測した．さらに膜の形態や機械的特性を変える薬剤（10 mM サリチル酸，0.1 mM クロルプロマジン）を投与して対照との比較を行った．サリチル酸 10 mM，クロルプロマジン 0.1 mM の量を投与することにより，薬剤そのものが形質膜の形態を変化させ，電位依存性運動にも影響を与えることが報告されている[28,31,32]ため，本実験でも同濃度で使用した．なお小胞を3個，または6個形成した後に細胞内顆粒のブラウン運動や，細胞光沢の減少が観察された場合は，その細胞は実験不適と判断し解析から除外した．

3. 実験2．陽圧負荷実験（micropipette fluid jet）

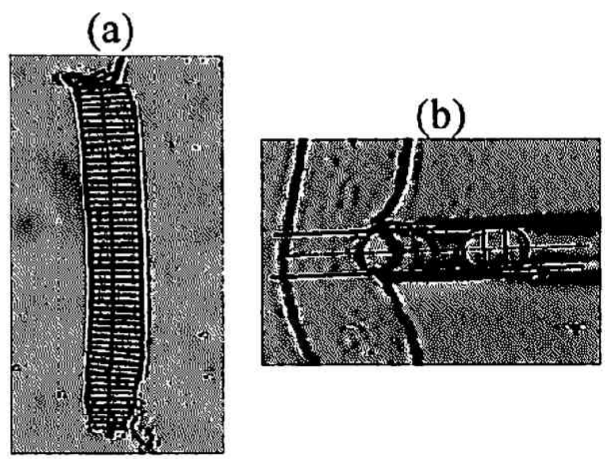
本実験には内径が 5 μm の微細ピペットを用いた．微細ピペットおよび水柱は低浸透圧（250 mOsm/kg）に調整した人工細胞外液（135 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 2 mM $CaCl_2$, 10 mM HEPES, PH 7.4, 浸透圧 250mOsm/kg）で満たした．細胞がシャーレの底部に定着後，ピペットの先端を細胞壁から 10 μm 離れた位置に固定し，水柱の水位を＋20 cmH_2O に上げて細胞壁に局所的なジェット水流を加えた．最初の数秒間はジェット水流により細胞は局所的に陥凹するが，その後細胞が全体的に腫脹し球体に近づいていった．低浸透圧溶液を用いることで，細胞形態の変化が急速かつ明瞭となった．経過中の細胞の変化を記録し，5秒ごとに細胞の長さ，半径，体積および表面積を計測した．さらに 10 mM サリチル酸や 0.1 mM クロルプロマジンを投与して対照と比較した．

4. 細胞形状の計測

細胞形状の計測はビデオ画像をパソコンにとり込みイメージ解析ソフト（MATLAB program, Mathworks）を用いて行った．陰圧実験では，まず画面上の細胞全体の輪郭と吸引除去した小胞の輪郭を手動で5回なぞり，細胞は細胞の長軸を中心とした小さな円柱の積算と仮定し（第4a図），小胞は中央部の円柱と両端の球体の一部でできた複合体と仮定して（第4b図）それぞれの輪郭長の平均値を求めた．さらに小胞を3個，6個，9個形成したところで，細胞の輪郭を再び5回ずつなぞり小胞形成後の細胞輪郭長の平均値を求めた．これらの輪郭長をもとに細胞の長さ，半径，表面積，体積および小胞の表面積，体積を算出した．陽圧実験では陽圧開始後5，10，15，20，25秒後の細胞を同様にして計測した．この算出法を適用した場合の誤差は，長さや半径では2%以内，表面積や体積では5%以内であった．

統計解析には一元配置分散分析と unpaired t-検定を用いた．$P<0.05$ の場合，有意な差があると判定した．

実験に使用した動物の取扱いは Baylor College of Medicine Animal Protocol Review Committee によって定められた規則に従った．



第4図　外有毛細胞および小胞の体積，表面積の算出法．(a) 外有毛細胞：細胞体を小さな円柱の積み重ねと見なして体積と表面積を算出した．(b) 小胞：小胞を円柱とその両端の球体の一部にわけて体積と表面積を算出した．図中で小胞は微小ピペット内に引き込まれている．(Morimoto N et al：Am J Physiol Cell Physiol Fig. 1 の一部を許可を得て転載)

結　果

1. 表面積の変化

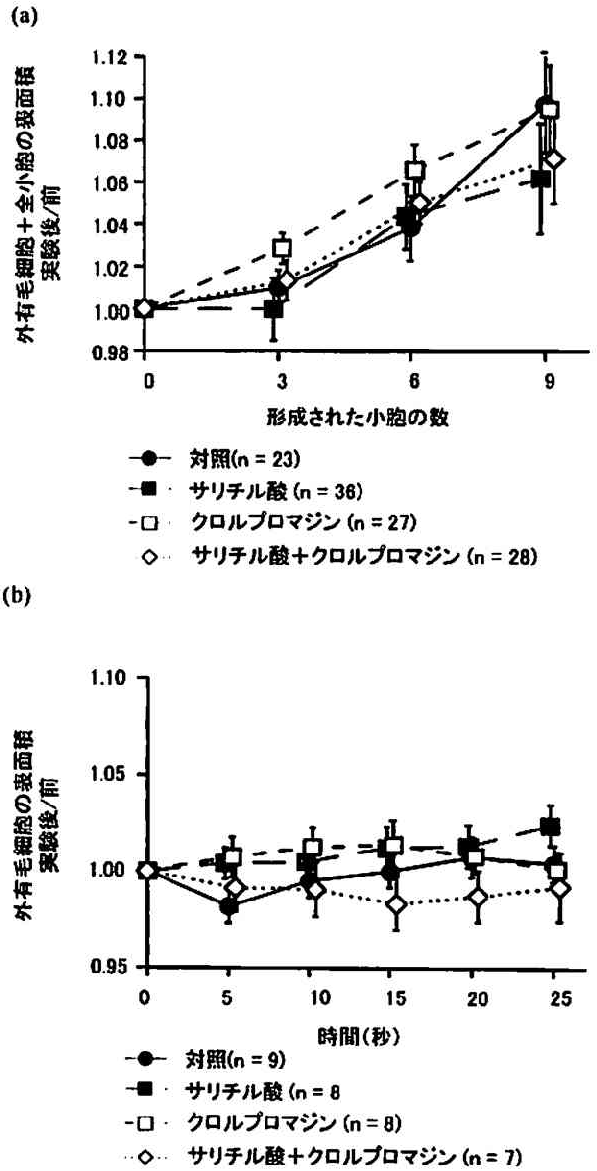
陰圧負荷実験において，小胞が3個，6個，9個と形成された時点の外有毛細胞の表面積と形成された小胞の表面積の総和を比較した（第5a図）．それぞれの時点ですべての群において，表面積の総和は実験前の外有毛細胞の表面積に比べて増加する傾向にあり，9個の小胞が形成された時には表面積の総和は実験前の細胞面積と比較して6～10%増加した．薬剤による小胞の表面積への影響を検討したが，それぞれの群間において有意差はなかった．

陽圧負荷実験では，数秒以内に水が細胞内に入りこんで膨隆し，すぐさま細胞長軸は短くなる一方，細胞短軸は長くなり球体に近い形態となった．この現象は，過去の報告と類似のものであった[33,34]．しかし，表面積には全く変化が認められず一定のままであった．（第5b図）．

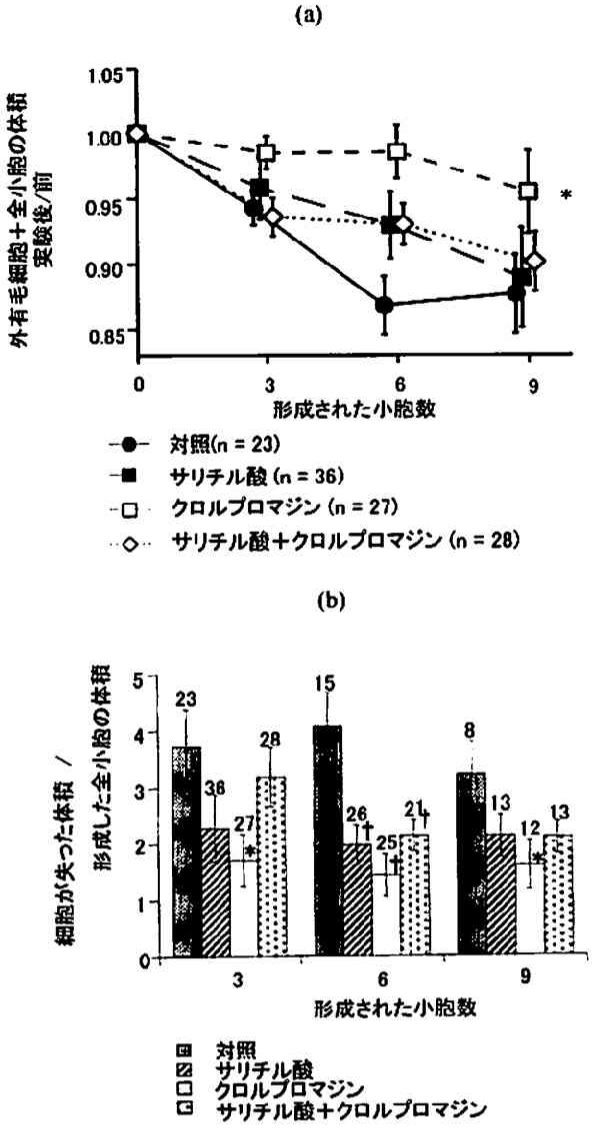
2. 体積の変化

陰圧負荷実験において，小胞が3個，6個，9個と形成された時点の外有毛細胞の体積と形成された小胞の体積の総和を比較した（第6a図）．それぞれの時点ですべての群において，体積の総和は実験前の外有毛細胞の体積に比べて減少していた．しかし9個の小胞が形成された時，対照群では実験前に比べて13%体積が減少したのに対して，0.1 mM クロルプロマジンを投与した群では5%の減少しか認められなかった（$p<0.05$，一元配置分散分析）．さらに細胞の体積減少量と遊離した小胞の体積を比較した（第6b図）．小胞が形成された各時点で，細胞体積減少量は小胞の体積と等しいはずである（細胞が失った体積/形成した全小胞の体積＝1）．しかし結果をみると，対照群における体積減少量は全小胞体積総計のほぼ3.5倍あった．このため小胞形成時に細胞質の漏出があると推測された．つまり小胞形成時に漏出して失った細胞質量は全小胞体積総計の2.5倍であった．同様に，10 mM サリチル酸投与群では全小胞体積総計の約1倍，0.1 mM クロルプロマジン投与群では約0.5倍漏出が認められ，対照群における細胞質の漏出が有意に多かった（unpaired t-検定）．小胞一個の体積は，表面積と同様に薬剤による影響は見られなかった．

陽圧負荷実験にて低浸透圧溶液を負荷すると，数秒後にほぼ一定の速度で体積が増加した（第1表）．薬剤投与群の体積増加率は対照群のそれよりも有意に小さかった（$p<0.05$，一元配置分散分析）．体積増加率は膜の



第5図　圧負荷時の表面積変化．(a) 陰圧負荷時（実験1）：小胞形成過程での細胞＋全小胞の総表面積を示す．すべての群において全表面積は陰圧負荷前より増加した．各群間の有意差は認めなかった．（SAL：サリチル酸投与群，CPZ：クロルプロマジン投与群，SAL＋CPZ：サリチル酸＋クロルプロマジン投与群）(b) 陽圧負荷時（実験2）：陽圧負荷時間の経過と共に計測した細胞の表面積を示す．すべての群において，表面積は変化しなかった．（Morimoto N et al：Am J Physiol Cell Physiol Fig. 3 の一部を許可を得て転載）



第6図　圧負荷時の体積変化．(a) 陰圧負荷時の小胞形成過程における体積変化：細胞＋全小胞の総体積を示す．すべての群において総体積は減少した．しかし，クロルプロマジンを投与した群では，他の群に比べて総体積の減少が有意に少なかった（*$p<0.05$）．(b) 細胞質漏出程度の比較：細胞質流出は，対照群において総小胞体積の2.5倍に達した．しかし，サリチル酸やクロルプロマジン投与により，細胞出流出はそれぞれ40%，20%に抑制された（*$p<0.01$，*$p<0.01$）．(Morimoto N et al：Am J Physiol Cell Physiol Fig. 5の一部を許可を得て転載)

第1表　陽圧負荷時の体積増加率

使用薬剤	体積変化/秒
対照	0.040
サリチル酸	0.027*
クロルプロマジン	0.028*
サリチル酸＋クロルプロマジン	0.014*

低浸透圧溶液を陽圧負荷すると，数秒後にほぼ一定の速度で体積が増加した．クロルプロマジンとサリチル酸は体積増加速度を抑制した．(*$p<0.05$)

水浸透性と相関することが示されているため[20,21,33]，この結果は10 mMサリチル酸や0.1 mMクロルプロマジンは膜透過性を減弱させることを示唆した．

3. 膜の機械的特性の変化

第2表は陰圧負荷実験で，1つの小胞を形成するのに必要な圧力と時間を表示したものである．0.1 mMクロルプロマジンが投与されていると，対照群よりも有意に低い圧力で形質膜から内側の2層が剥離し，小胞が形成された．また，1つの小胞を形成するのにかかる時間は，0.1 mMクロルプロマジン投与群では対照に比べて半分以下であった．一方，10 mMサリチル酸単独投与群では小胞形成の圧力も時間も対照群とほぼ同じであった．それぞれの群の間で小胞の大きさに有意差はなかった．これらの結果は，クロルプロマジンが小胞を形成するエネルギーを減少させることを示唆し，細胞外側壁の膜張力に影響を与えていると考えられた．

そこで，膜張力を以下の手順で算出し，検証した．膜の張力（T (N/m)）が均一であると仮定すると，ピペット吸引部位における膜内外の圧力の平衡は

$$P_p - P_i = \frac{2T}{R_p} \qquad \text{Eq. (1)}$$

(R_p；ピペットの内径 (m)，P_p；ピペット内の吸引圧力 (N/m^2)，P_i；細胞内圧 (N/m^2)) と表される．一方，ピペット吸引部位以外の場所における膜内外の圧力平衡はLaplaceの法則より

$$P_i - P_o = \frac{2T}{R_c} \qquad \text{Eq. (2)}$$

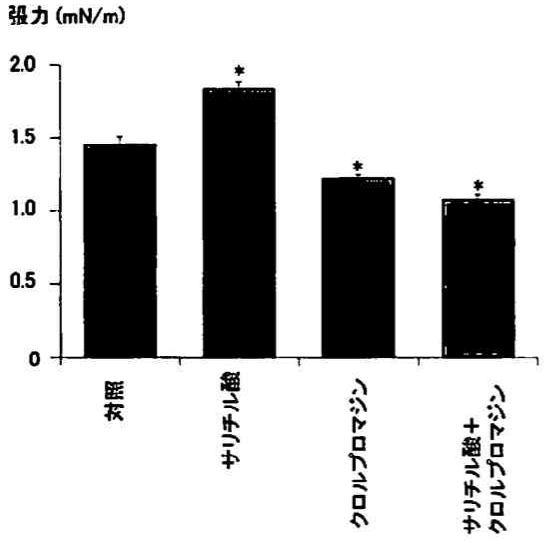
(P_o；細胞外圧 (N/m^2)，R_c；細胞の半径 (m)，P_i；細胞内圧 (N/m^2))

と表すことができる．Eq. 1，2よりP_iを消去すると膜張力（T）を測定可能なP_p，P_o，R_p，R_cで導出することができる．すなわち，

第2表　小胞形成に必要な陰圧および形成に要する時間

使用薬剤	n	陰圧（mN/m²）	形成に要した時間（秒）
対照	22	1.26±.10	229.18±21.6
サリチル酸	36	1.26±.07	254.57±22.7
クロルプロマジン	27	0.96±.04*	109.85±16.2*
サリチル酸＋クロルプロマジン	28	0.87±.05*	64.75±11.0*

クロルプロマジン投与群は，対照群よりも低陰圧で小胞を形成した（*p<0.005 unpaired t-検定）．サリチル酸投与群における負荷陰圧は対照群と同じであった．小胞形成に要する時間はクロルプロマジン投与群では対照の48%に短縮された（*p<0.0001）．



第7図　外有毛細胞形質膜の張力．対照群に比べ，サリチル酸投与群では膜の張力が増加し，反対にクロルプロマジン投与群では減少した（*p<0.001）．形質膜張力の算出は「結果」参照．ヒストグラム上の数字はnを示す．（Morimoto N et al：Am J Physiol Cell Physiol Fig. 4の一部を許可を得て転載）

$$T = \frac{(P_p - P_o)R_cR_p}{2(R_c + R_p)} \qquad \text{Eq. (3)}$$

これに計測した各数値（P_p, P_o, R_p, R_c）を当てはめて算出した膜の張力（T）を第7図に示す．対照群に比べ，0.1 mM クロルプロマジン投与群では膜張力が減少したが（*p<0.001, unpaired t-検定），10 mM サリチル酸投与群では膜の張力が増加した．

考　察

モルモットの単離外有毛細胞側壁形質膜に対して，微細ピペットを用いて圧負荷実験を行った．陰圧負荷実験で小胞が遊離した際，外有毛細胞と小胞の体積総和が減少し，小胞遊離中に細胞質が漏出していることがわかった．膜の特性を変化させるサリチル酸やクロルプロマジンを投与すると，体積総和の減少は対照に比べ抑制された．これよりサリチル酸とクロルプロマジンは細胞質漏出を抑制させると推測された．陽圧負荷実験でサリチル酸やクロルプロマジンは膜における水の浸透性を低下させることが明らかになった．よって，これら薬剤による細胞質漏出抑制は，水浸透性の低下と何らかの関係があるものと推測される．一方，陰圧負荷実験によって外有毛細胞と小胞の表面積総和は増加した．これは形質膜が余剰の膜を保持していることを示唆している．また，本研究により，サリチル酸は形質膜の張力を増加させ，反対にクロルプロマジンは形質膜の張力を減少することが明らかになった．

1. 体積変化と膜の浸透性

外有毛細胞形質膜の水に対する透過性は，他の種類の細胞膜に比べると高くはない[20]．細胞の体積維持に水の出入りが関係していることもあり，負荷が加わらない状態では外有毛細胞の体積は変化しにくいといえる．しかし，形質膜に局所的に陰圧を負荷すると小胞遊離時に形質膜内の体積総量が減少し，陽圧下に低浸透圧溶液を負荷した時は水の流入による体積の増加が認められた．これは，形質膜が外部からの圧刺激により変形，伸展したために，その部分の水の透過性が局所的に増加したことによると推測される．膜に圧刺激を加えると，膜が伸展して一過性に小孔が生じることを示唆する報告があり[33]，これが水透過性亢進に関与している可能性があげられる．つまり，脂質二重膜である細胞形質膜の中では自由に脂質が動けるようなゆとりが形成されており，膜に圧を加えるとそのゆとり部分が小孔のように大きく開く[35]と考えられる．その結果，細胞外からの陰圧，陽圧負荷により水の流出入が活発になったのかもしれない．この小孔は単糖または二糖類は通過可能であるものの三糖類は通

過できないことも報告されている[32]ため，形成される小孔のサイズは4nm以下であろうと推測される．

一方，サリチル酸やクロルプロマジンを投与すると，膜伸展により増加する水の透過性の増加が抑制されることが明らかになった．水の透過性増加が抑制される理由として，膜の張力が低下した[36]か，小孔形成しにくくする何らかの要因が生じたことが考えられた．サリチル酸は形質膜の外側に作用し，クロルプロマジンは形質膜の内側に作用する．さらにこれらの薬剤は外有毛細胞膜の堅さや膜脂質の流動性などの機械的特性にも影響を与えることも報告されている[28,31]．小胞形成時の外有毛細胞の細胞質漏出は，静止水圧を減少させるために生じるものであり，薬剤による細胞質漏出抑制は，サリチル酸は外有毛細胞の形質膜の張力を増加させ，反対にクロルプロマジンは減少させるという膜張力変化に関連していると考えられた．

2. 表面積変化

電子顕微鏡による観察によって形質膜は襞状構造を有していることが示されている[2]．陰圧負荷によって小胞を形成したところ外有毛細胞の表面積が6〜10%増加したことは，小胞形成によって形質膜の襞が伸展されたことが推測される．この襞状構造をとることによって，形質膜は余剰の膜を保持することができ[37]，膜の伸展に伴って伸展し，増加したようにみえたと考えられる[38]．低浸透圧溶液による陽圧負荷実験では，水の流入による細胞体積の増加が見られるが，形態は変化しても，表面積は一定のままであった．このことより，この余剰な膜の存在は，体積の維持に関係しておらず，むしろ電位依存性運動に関係していることを示唆している．膜の張力は形質膜に存在している余剰な膜によって緩衝されるため[36]，前述の領域運動能理論では，細胞における領域を変化させる効率を減弱させると考えられる．しかし，最近提唱されている電位依存性運動のメカニズムとして，膜タンパク分子が並び替えることによりアコーディオンのように膜の彎曲を変化させていくという膜の彎曲運動理論がある[39]．この理論においては襞構造と余剰な膜の存在は矛盾せず，形質膜上の脂質流動性が電位や張力によって変化する点[31]も充分説明可能である．

サリチル酸は電位依存性運動を減少させ[40]，その結果可逆性の難聴を引き起こすのに対し，クロルプロマジンは本実験に使用したような大量投与により，電位依存性運動を誘発する電位を変化させる[32]．形質膜の機械的特性は外有毛細胞の運動能に大切であると考えられている．しかしながら，形質膜に影響を与えるサリチル酸とクロルプロマジンでは，電位依存性運動への効果は異なっていた．サリチル酸は形質膜の外側に，クロルプロマジンは内側に影響を与える．今回の結果から電位感受，運動機構は形質膜の外側が最も大きな役割を果たし，電位依存性運動も形質膜外側の機械的特性に影響を受けることが考えられた．しかし，この点に関しては，他にも形質膜の片側のみに選択的に作用する同種の薬剤を用いて，この仮説を支持する結果が得られるかさらに検討される必要があるだろう．

総　括

単離したモルモットの外有毛細胞に対し微細ピペットを用いて局所的な圧力（陰圧および陽圧）をかけ，細胞側壁の物理学的特性を計測した．さらに，形質膜の形態を変化させる薬剤のサリチル酸やクロルプロマジンを用いて対照群との変化を検討した．

1. 形質膜は陰圧をかけることで6〜10%程引き伸ばされた．

2. サリチル酸は形質膜の張力を増加させ，反対にクロルプロマジンは張力を低下させた．

3. 細胞壁に陽圧をかけることで水の浸透性は増加した．しかし，サリチル酸やクロルプロマジン投与によりこの水の浸透性増加は抑制された．

これらの結果より，有毛細胞形質膜は余剰膜を保持しており，水の浸透性はこの余剰膜も含めた膜全体の小孔形成に起因することが示唆された．サリチル酸やクロルプロマジンは膜の張力を変化させたが，これが小孔形成の抑制に関係すると考えられた．

謝　辞

稿を終えるにあたり，ご指導，ご校閲を賜りました慶応義塾大学医学部耳鼻咽喉科学教室の小川郁教授に深甚なる謝意を表します．また，本研究において直接ご指導いただいたベイラー医科大学の William E Brownell 教授に深謝いたします．さらに適切な御助言をいただきました九州大学医学部耳鼻咽喉科教室の中川尚志講師に感謝いたします．

また，第1図は Oghalai JS 氏の論文より引用し，筆頭著者および共著者からの同意を得て転載させていただきました．

本論文の要旨の一部は，International Symposium on Recent Development in Auditory Mechanics（1999年7月），第10回日本耳科学会総会（2000年10月）に発表した．

文　献

1) Brownell WE, Bader CR, Bertrand D, de RY : Evoked mechanical responses of isolated cochlear outer hair cells. Science 227 : 194-196, 1985
2) Dieler R, Shehata DW, Brownell WE : Concomitant salicylate-induced alterations of outer hair cell subsurface cisternae and electromotility. J Neurocytol 20 : 637-653, 1991
3) Saito K : Fine structure of the sensory epithelium of guinea-pig organ of Corti : subsurface cisternae and lamellar bodies in the outer hair cells. Cell Tissue Res 229 : 467-481, 1983
4) Flock A, Flock B, Ulfendahl M : Mechanisms of movement in outer hair cells and a possible structural basis. Arch Otorhinolaryngol 243 : 83-90, 1986
5) Holley MC, Ashmore JF : A cytoskeletal spring in cochlear outer hair cells. Nature 335 : 635-637, 1988
6) Holley MC, Ashmore JF : Spectrin, actin and the structure of the cortical lattice in mammalian cochlear outer hair cells. J Cell Sci 96 : 283-291, 1990
7) Arima T, Kuraoka A, Toriya R, Shibata Y, Uemura T : Quick-freeze, deep-etch visualization of the 'cytoskeletal spring' of cochlear outer hair cells. Cell Tissue Res 263 : 91-97, 1991
8) Bannister LH, Dodson HC, Astbury AR, Douek EE : The cortical lattice : a highly ordered system of subsurface filaments in guinea pig cochlear outer hair cells. Prog Brain Res 74 : 213-219, 1988
9) Kachar B, Brownell WE, Altschuler R, Fex J : Electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. Nature 322 : 365-368, 1986
10) Dallos P, Evans BN, Hallworth R : Nature of the motor element in electrokinetic shape changes of cochlear outer hair cells. Nature 350 : 155-157, 1991
11) Santos SJ : Harmonics of outer hair cell motility. Biophys J 65 : 2217-2227, 1993
12) Iwasa KH : A membrane motor model for the fast motility of the outer hair cell. J Acoust Soc Am 96 : 2216-2224, 1994
13) Zheng J, Shen W, He DZ, Long KB, Madison LD, Dallos P : Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. Nature 405 : 149-155, 2000
14) Ludwig J, Oliver D, Frank G, Klocker N, Gummer AW, Fakler B : Reciprocal electromechanical properties of rat prestin : the motor molecule from rat outer hair cells. Proc Natl Acad Sci USA 98 : 4178-4183, 2001
15) Santos-Sacchi J, Shen W, Zheng J, Dallos P : Effects of membrane potential and tension on prestin, the outer hair cell lateral membrane motor protein. J Physiol 531 : 661-666, 2001
16) Iwasa KH : Effect of stress on the membrane capacitance of the auditory outer hair cell. Biophys J 65 : 492-498, 1993
17) Kakehata S, Santos SJ : Membrane tension directly shifts voltage dependence of outer hair cell motility and associated gating charge. Biophys J 68 : 2190-2197, 1995
18) Santos SJ, Kakehata S, Takahashi S : Effects of membrane potential on the voltage dependence of motility- related charge in outer hair cells of the guinea-pig. J Physiol (Lond) 510 : 225-235, 1998
19) Brownell WE, Shehata WE : The effect of cytoplasmic turgor pressure on the static and dynamic mechanical properties of outer hair cells. The Mechanics and Biophysics of Hearing. (Ed) Dallos P, Geisler CD, Matthews JW, Ruggero MA, Steele CR, Springer-Verlag, Amsterdam, p.52-60 1990
20) Chertoff ME, Brownell WE : Characterization of cochlear outer hair cell turgor. Am J Physiol 266 : C467-479, 1994
21) Ratnanather JT, Zhi M, Brownell WE, Popel AS : The ratio of elastic moduli of cochlear outer hair cells derived from osmotic experiments. J Acoust Soc Am 99 : 1025-1028, 1996
22) Morimoto N, Raphael RM, Nygren A, Brownell WE : Excess plasma membrane and effects of ionic amphipaths on the mechanics of outer hair cell lateral wall. Am J Physiol 282 : C1076-C1086, 2002
23) Vlahakis NE, Hubmayr RD : Invited review : Plasma membrane stress failure in alveolar epithelial cells. J Appl Physiol 89 : 2490-2496, 2000
24) Evans EA : New membrane concept applied to the analysis of fluid shear-and micropipette-deformed red blood cells. Biophys J 13 : 941-954, 1973
25) Russell I, Schuz C : Salicylate ototoxicity : Effects on stiffness and Electromotility of Outer hair cells isolated from the guinea pig cochlea. Auditory Neurosci 1 : 309-319, 1995
26) Tunstall MJ, Gale JE, Ashmore JF : Action of salicylate on membrane capacitance of outer hair cells from the guinea-pig cochlea, J Physiol (Lond) 485 : 739-752, 1995
27) Hallworth R : Modulation of outer hair cell compliance and force by agents that affect hearing. Hear Res 114 : 204-212, 1997
28) Lue AJ, Brownell WE : Salicylate induced changes in outer hair cell lateral wall stiffness. Hear Res 135 : 163-168, 1999
29) Oghalai JS, Tran TD, Raphael RM, Nakagawa T, Brownell WE : Transverse and lateral mobility in outer hair cell lateral wall membranes. Hear Res 135 : 19-28, 1999
30) Oghalai JS, Patel AA, Nakagawa T, Brownell WE : Fluorescence-imaged microdeformation of the outer hair cell lateral wall. J Neurosci 18 : 48-58, 1998
31) Oghalai JS, Zhao HB, Kutz JW, Brownell WE : Voltage- and tension-dependent lipid mobility in the outer hair cell plasma membrane. Science 287 : 658-661, 2000

32) Lue AJ, Zhao HB, Brownell WE : Chlorpromazine alters outer hair cell electromotility. Otolaryngol Head Neck Surg 125 : 71-76, 2001
33) Brownell WE, Ratnanather JT, Popel AS, Zhi M, Sit PS : Labyrinthin lateral walls : cochlear outer hair cell permeability and mechanics. (Ed) Flock A, Ottoson D, Ulfendahl M, Active Hearing. Elsvier Science, Amsterdam, p.167-179, 1995
34) Ratnanather JT, Brownell WE, Popel AS : Mechanical properties of the outer hair cell. Ed) Duifhuis H, Horst JW, van Dijk P, van Netten S, Biophisics of Hair Cell Sensory Systems. World Scientific, Groningen, p.199-206, 1993
35) Raphael RM, Waugh RE, Svetina S, Zeks B : Fractional occurrence of defects in membranes and mechanically driven interleaflet phospholipid transport. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys 64 : 051913, 2001
36) Patel AJ, Honore E, Maingret F, Lesage F, Fink M, Duprat F, Lazdunski M : A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K^+ channel. Embo J 17 : 4283-4290, 1998
37) Raucher D, Sheetz MP : Membrane Expansion Increases Endocytosis Rate during Mitosis. J Cell Biol 144 : 497-506, 1999
38) Li Z, Anvari B, Takashima M, Brecht P, Torres JH, Brownell WE : Membrane tehter formation from outer hair cell with optical tweezers. Biophys J 82 : 1386-1395, 2002
39) Raphael RM, Popel AS, Brownell WE : A membrane bending model of outer hair cell electromotility. Biophys J 78 : 2844-2862, 2000
40) Shehata WE, Brownell WE, Dieler R : Effects of salicylate on shape, electromotility and membrane characteristics of isolated outer hair cells from guinea pig cochlea. Acta Otolaryngol (Stockh) 111 : 707-718, 1991