

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
二村 吉継	主査 教授 竹 中 洋 主査 教授 窪 田 隆 裕 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 池 田 恒 彦 副査 教授 田 窪 孝 行
主論文題名 Effects of $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ in Perilymph on the Endocochlear Potential in Guinea Pigs (モルモット蝸牛内直流電位に対する外リンパ液 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ の影響)	
学位論文内容の要旨	
<p>(目的)</p> <p>Pendred 症候群は PDS 遺伝子 (SLC26A4) の異常により生じる疾患で、難聴と甲状腺腫を特徴としている。内耳では、この遺伝子の異常により $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交換体に変異することで血管条の酸塩基平衡に障害が生じ、有毛細胞での音受容に重要な役割を果たしている正の蝸牛内直流電位 (EP) の消失を来すものと考えられている。そこで、本研究では pH 電極および EP 測定用電極を用いて、EP に対する $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ の影響を外リンパおよび内リンパ灌流法により検討した。</p> <p>(方法)</p> <p>実験動物としてプライエル反射陽性の白色モルモットを使用し、ペントバルビタールを腹腔内麻酔後、気管切開を施行し、レスピレータにて人工換気を行った。</p> <p>pH 測定用電極はシラン化したピペットにイオン交換樹脂を注入して作成し、電極内液には pH 7.0 のリン酸緩衝液を用いた。pH 測定用電極と EP 測定用電極は蝸牛第2回転より経血管条的に刺入した。また、一過性無呼吸負荷は人工換気を 100 秒間止める事により行った。</p> <p>内リンパ灌流では、L 型 Ca^{2+} チャンネルの阻害剤であるニフェジピン (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含んだ溶液を内リンパ腔に注入した。外リンパ灌流では、5% $\text{CO}_2/25 \text{ mM HCO}_3^-$ 溶液 ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 溶液)、5% $\text{CO}_2/5 \text{ mM HCO}_3^-$ 溶液 (低 HCO_3^- 溶液)、5% $\text{CO}_2/50 \text{ mM HCO}_3^-$ 溶液 (高 HCO_3^- 溶液)、HEPES-buffer 溶液 ($\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$-free 溶液) もしくは 20 mM NH_4Cl 含有 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 溶液 (NH_4Cl 溶液) を 100 $\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流した。さらに椎骨動脈に挿入したカニューレより、ニフェジピン (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を含んだ溶液を 1 ml/min で投与した。</p> <p>(結果)</p> <p>コントロール条件で EP は +78 mV 程度で、内リンパ液の pH (pH_e) は 7.45 程度であった。一過性無呼吸負荷により EP は急激に約 60 mV 低下し、呼吸を再開させると元のレベルまで急激に回復するが、この時 pH_e は 0.05 程度低下するのみであった。外リンパ灌流実験では、$\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 溶液を灌流しても EP はほとんど変化せず、無呼吸負荷による EP の低下も外リンパ灌流を行わない時とほぼ同程度であった。$\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$-free 溶液を 10 分間灌流すると EP は約 +80 mV から +52 mV へ低下し、pH_e は 7.45 から 7.84 へ</p>	

上昇した。また、 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液を灌流して新たな定常状態に達するのに15分程度要し、

$\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 溶液灌流時には一過性無呼吸負荷によりEPは77 mV低下したが、 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液灌流時には37 mV低下した。

次に、 HCO_3^- の濃度を变化させた時のEPと pH_e の変化を観察した。低 HCO_3^- 溶液(pH = 6.7)を外リンパ腔に灌流すると、 pH_e は0.09低下したがEPはほとんど変化しなかった。また、高 HCO_3^- 溶液(pH = 7.7)を灌流しても、 pH_e は0.08上昇したがEPはほとんど変化しなかった。以上より、 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液灌流時には、血管条細胞内の CO_2 が低下する事でアルカリ化が生じ、EPの低下が生じるものと推察された。そこで、細胞内をアルカリ化させる事が知られている NH_4Cl 溶液を5分間外リンパ腔に灌流すると、 pH_e は約0.2上昇しEPは約30 mV低下した。

最後に、 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるニフェジピンを内リンパに投与し、一過性無呼吸負荷や $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液および NH_4Cl 溶液の外リンパ灌流に伴うEPの低下に対する効果を観察した。ニフェジピンを内リンパ腔に投与することで、一過性無呼吸負荷によるEP低下や、外リンパ腔への $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液および NH_4Cl 溶液の灌流によるEP低下が有意に抑制された。また、椎骨動脈よりニフェジピンを投与するとEPは緩やかに低下したが、一過性無呼吸負荷によるEP低下は抑制された。

(考察)

一般に細胞外の CO_2 を上昇させると細胞内のpHは低下し、細胞外の CO_2 を低下させると細胞内のpHは上昇すると報告されている。この事から、 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液の外リンパ灌流では血管条細胞内のpHが上昇し、EPが低下したものと考えられる。また、細胞内pHを上昇させるとされている NH_4Cl 溶液を外リンパ灌流するとEPが低下したことは、この推測と合致する。一方、 CO_2 を一定にして HCO_3^- の濃度(pH)を変化させても有意なEPの変化が見られなかったことから、血管条基底細胞の H^+ や HCO_3^- の透過性はあまり高くないものと考えられた。*SLC26*^{-/-}マウスでは HCO_3^- の内リンパ腔へのトランスポーターであるpendrinが欠如しており、 HCO_3^- がEP発生細胞に蓄積して細胞内をアルカリ化する事によりEPが低下している可能性がある。いずれの場合においても、内リンパ腔に面した細胞の細胞内pHがEPの維持に重要な役割を果たしているものと考えられた。

さらに、一過性無呼吸負荷によるEPの低下や、 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液および NH_4Cl 溶液の外リンパ灌流によるEPの低下は、内リンパ腔や血管からL型 Ca^{2+} チャネルの阻害剤であるニフェジピンを投与することで抑制された。したがって、これらのEP低下は内リンパ腔に面した細胞の細胞内カルシウム濃度が上昇することにより生じるものと考えられる。このことは、内リンパ腔に膜透過性カルシウムキレート剤を投与すると一過性無呼吸負荷によるEP低下が抑制される、という以前の報告からも示唆される。よって、 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -free溶液の外リンパ灌流では、血管条組織の CO_2 の低下によるEP発生細胞の細胞内pHの上昇が、細胞内カルシウム濃度を上昇させてEPの低下をもたらすものと考えられた。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	二村 吉継
論文審査担当者		主 査 教授 竹 中	洋
		主 査 教授 窪 田	隆 裕
		副 査 教授 林	秀 行
		副 査 教授 池 田	恒 彦
		副 査 教授 田 窪	孝 行
主論文題名			
Effects of CO ₂ /HCO ₃ ⁻ in Perilymph on the Endocochlear Potential in Guinea Pigs (モルモット蝸牛内直流電位に対する外リンパ液 CO ₂ /HCO ₃ ⁻ の影響)			
論文審査結果の要旨			
<p>血管条細胞の細胞内 pH は、EP (Endocochlear Potential) に対して強く影響すると報告されている。申請者は、モルモット蝸牛に EP 測定用電極および pH 電極を用い、さらに内リンパ腔もしくは外リンパ腔を灌流することで以下の結果を得ている。</p> <p>1) CO₂/HCO₃⁻-free 溶液を外リンパ腔に灌流すると内リンパ腔の pH が上昇し、EP は著明に低下した。しかし、5% CO₂ 存在下で HCO₃⁻ 濃度を変化させた溶液を外リンパ腔に灌流しても、内リンパ腔の pH はやや変化するが、EP はほとんど変化しなかった。</p> <p>2) 細胞内 pH をアルカリ化させることが知られている、NH₄Cl 溶液の外リンパ灌流を行うと、内リンパ腔の pH が上昇し、EP は低下した。</p> <p>3) Ca²⁺ チャンネル阻害剤であるニフェジピンを内リンパ腔に投与すると、一過性無呼吸負荷による EP 低下のみならず、外リンパ腔への CO₂/HCO₃⁻-free 溶液や NH₄Cl 溶液の灌流による EP の低下が有意に抑制された。また、椎骨動脈にニフェジピンを投与すると、EP は徐々に低下したが、一過性無呼吸負荷による EP 低下が抑制された。</p> <p>一般に細胞外の CO₂ を上昇させると細胞内の pH は低下し、細胞外の CO₂ を低下させると細胞内の pH は上昇すると報告されている。このことから、CO₂/HCO₃⁻-free 溶液の外リンパ灌流では血管条細胞内の pH が上昇し、EP が低下したものと考えられた。また、NH₄Cl 溶液を外リンパ灌流すると EP が低下したことは、この推測と合致する。さらに、ニフェジピンの投与により、一過性無呼吸負荷や CO₂/HCO₃⁻-free 溶液および NH₄Cl 溶液の外リンパ灌流による EP 低下が抑制されることから、これらの EP 低下は内リンパ腔に面した細胞の細胞内カルシウム濃度が上昇することにより生じるものと考えられた。このことは、内リンパ腔に膜透過性カルシウムキレート剤を投与すると一過性無呼吸負荷による EP 低下が抑制される、という以前の報告からも示唆される。</p> <p>本研究のごとく EP の調節機序を明らかにすることは、聴覚生理の進歩のみならず、Pendred 症候群や急性虚血性難聴などの末梢性感音難聴の病態生理を解明するとともに、新たな治療法の開発に向けて重要な意義を持つと考えられる。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌) Journal of Physiological Sciences 57(1): 15-22, 2007			