

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
乾 崇 樹	主 査 教 授 竹 中 洋
	主 査 教 授 窪 田 隆 裕
	副 査 教 授 黒 岩 敏 彦
	副 査 教 授 林 秀 行
	副 査 教 授 古 谷 榮 助
主論文題名 Physiological Role of L-Type Ca^{2+} Channels in Marginal Cells in the Stria Vascularis of Guinea Pigs (モルモット血管条辺縁細胞に存在する L 型 Ca^{2+} チャネルの生理的役割)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>蝸牛内リンパ腔は+80 mV 程度の蝸牛内直流電位(EP)を有している。この電位は内耳血管条で発生し、有毛細胞に電流を供給して受容器電位(脱分極)を引き起こすので、音の機械的振動を電気信号に変換する際に重要な役割を果たしているものと考えられている。</p> <p>近年、我々の研究室では、一過性無呼吸負荷に伴う EP の低下(TAID)が、内リンパ腔への膜透過性 Ca^{2+}キレート剤の投与により抑制される事を見出しており、血管条構成細胞の細胞内 Ca^{2+}濃度($[\text{Ca}]_i$)が EP の調節に関与しているものと考えている。また、種々の細胞において酸素欠乏時には L 型 Ca^{2+}チャネルが開孔して$[\text{Ca}]_i$が増加することが示されている。本研究では、電気生理学的手法を用いて L 型 Ca^{2+}チャネルの役割を検討し、免疫組織化学的手法を用いてその局在を検討した。さらに、無呼吸負荷時の内リンパ液 Ca^{2+}濃度($[\text{Ca}]_o$)の急激な増加 (TAICa)についても検討を加えた。</p> <p>《方 法》</p> <p>電気生理実験では、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にて麻酔後、レスピレータによる人工換気を行った。EP 測定用電極と Ca^{2+}測定用電極は、蝸牛第 2 回転より中央階に経血管条的に刺入した。なお、無呼吸負荷は人工呼吸器を 100 秒間停止させることで行った。</p> <p>内リンパ灌流では、微小注入用ピペットを用いて L 型 Ca^{2+}チャネルの阻害薬である nifedipine (0.001-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)または(+)-Bay K 8644 (1 μM)、同チャネルの開孔薬である(-)-Bay K 8644 (1 μM)、高濃度の Ca^{2+} (5 mM)を含む人工内リンパ液を内リンパ腔に注入した。さらに、椎骨動脈に挿入したカニューレより、nifedipine (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)または Ba^{2+} (5 mM)を含んだ生理食塩水を投与した。</p> <p>免疫組織化学実験では、モルモット内耳組織切片にウサギ抗マウス L 型 Ca^{2+}チャネル($\alpha 1$)抗体と Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG を結合させ、蛍光顕微鏡にて観察した。</p> <p>《結 果》</p> <p>(1)椎骨動脈または内リンパ腔に nifedipine を投与すると、TAID および TAICa が有意に抑制された。(2)内リンパ腔に投与する nifedipine の濃度を変化させると、TAID は濃度依存性に阻害された。(3)免疫組織化学実験では、血管条では辺縁細胞のみに L 型 Ca^{2+}チャネルが観察された。(4)内リンパ</p>	

腔に(+)-Bay K 8644 を投与すると TAID が有意に抑制されたが、(-)-Bay K 8644 の投与では 10 分程度経過後に EP が急激に低下した。(5) 椎骨動脈に Ba²⁺含有生理食塩水を投与すると EP の著明な低下(BAID)が観察されるが、内リンパ腔に nifedipine を投与することで BAID が有意に抑制された。(6) EP 値と[Ca]_eの逆対数値(p[Ca]_e)との関係を、コントロール状態、無呼吸負荷後 100 秒、および nifedipine 投与時の無呼吸負荷後 100 秒で検討すると、両者が正の相関を示した(p[Ca]_e = 1/28.5 x EP + 3.34, r = 0.999)。(7)内リンパ腔を高濃度 Ca²⁺にした状態で無呼吸負荷を行うと[Ca]_eは初期には変化せず、その後一旦減少した後増加した。

《考 察》

椎骨動脈または内リンパ腔に nifedipine を投与すると TAID が有意に抑制されること、免疫組織化学実験において血管条では辺縁細胞にのみ L 型 Ca²⁺チャネルが観察されることから、この部位に存在する L 型 Ca²⁺チャネルが EP の発生・調節に重要であると考えられた。(+)または(-)-BAY K 8644 の内リンパ腔投与実験から、L 型 Ca²⁺チャネルがコントロール条件で少なからず開孔していることが示唆された。

Ba²⁺は K⁺チャネルを阻害する性質を持つため、BAID は血管条中間細胞の内向き整流性 K⁺チャネルの阻害により生じると考えられてきた。しかし、Ba²⁺は各種の Ca²⁺チャネルを透過することが知られている。本研究では、内リンパ腔への nifedipine 投与により BAID が著明に抑制されることから、BAID は Ba²⁺が L 型 Ca²⁺チャネル等の Ca²⁺透過性チャネルを通して辺縁細胞内に入り、EP 発生機構に何らかの影響をもたらすことにより生じるものと思われた。

種々の条件において EP 値と p[Ca]_e 値が相関を示すことから、TAICa は EP の低下に伴う電気化学勾配の変化により生じている可能性が示唆された。また、高濃度 Ca²⁺含有人工内リンパ液を灌流し無呼吸負荷による[Ca]_eの変化を観察すると、[Ca]_eは EP 低下開始後 25 秒以内には殆ど変化せず、その後 2 相性の変化を示した。これは、1) 無呼吸負荷の初期には内リンパ腔に面する細胞(ESC)を介した Ca²⁺の透過性が低く、電気化学勾配が変化しても[Ca]_eが変化しないこと、2) 無呼吸負荷の後期には Ca²⁺透過性が上昇することで、電気化学勾配の変化に伴い[Ca]_eが変化することを示している。したがって TAICa は電気化学勾配の変化のみならず、ESC を介した Ca²⁺透過性が上昇した結果生じるものと考えられた。

以上より、無呼吸負荷時には血管条辺縁細胞の L 型 Ca²⁺チャネルの開孔確率上昇による [Ca]_e の増加が EP の低下を引き起こす可能性が示唆された。しかし、辺縁細胞における EP の発生機構ならびに[Ca]_eの増加による EP 低下の機序に関しては不明な点も多く、今後さらに検討が必要である。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	乾 崇 樹
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 黒 岩 敏 彦	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 古 谷 榮 助	
主論文題名 Physiological Role of L-Type Ca^{2+} Channels in Marginal Cells in the Stria Vascularis of Guinea Pigs (モルモット血管条辺縁細胞に存在する L 型 Ca^{2+} チャネルの生理的役割)			
論文審査結果の要旨			
<p>蝸牛内リンパ腔は+80 mV 程度の蝸牛内直流電位(EP)を有している。この電位の正の部分は内耳血管条で発生していると考えられているが、その発生機序はいまだ解明されていない。申請者は、モルモット蝸牛に電気生理学的手法を用いて椎骨動脈または内リンパ腔に薬剤を投与した時の EP および内リンパ液 Ca^{2+}濃度([Ca]_e)を測定し、さらに免疫組織化学的手法を用いて内耳血管条における L 型 Ca^{2+}チャネルの局在を検討し、以下の結果を得ている。</p> <p>椎骨動脈または内リンパ腔に L 型 Ca^{2+}チャネルの阻害薬である nifedipine を投与すると、一過性無呼吸負荷に伴う EP の低下(TAID)および無呼吸負荷時の[Ca]_eの急激な増加 (TAIICa)が有意に抑制された。免疫組織化学実験においては、血管条では辺縁細胞のみに L 型 Ca^{2+}チャネルが観察された。また、内リンパ腔に L 型 Ca^{2+}チャネルの阻害薬である(+)-Bay K 8644 を投与すると TAID が有意に抑制されたが、同チャネルの開孔薬である(-)-Bay K 8644 の投与では投与後 10 分程度で EP が急激に低下した。これらことから、辺縁細胞に存在する L 型 Ca^{2+}チャネルが通常でも少なからず開孔し、EP の発生・調節に重要な役割を果たしているものと考えられる。椎骨動脈に Ba^{2+}含有生理食塩水を投与すると EP の著明な低下(BAID)が観察されるが、内リンパ腔に nifedipine を投与することで BAID が有意に抑制された。よって BAID は Ba^{2+}が L 型 Ca^{2+}チャネル等の Ca^{2+}透過性チャネルを通して辺縁細胞内に入り、EP 発生機構に影響をもたらすことにより生じるものと考えられる。</p> <p>EP 値と[Ca]_eの逆対数値を、コントロール状態、無呼吸負荷後 100 秒、および nifedipine 投与時の無呼吸負荷後 100 秒で検討すると、両者に正の相関が認められた。一方内リンパ腔を高濃度 Ca^{2+}にした状態で無呼吸負荷を行うと[Ca]_eは初期には変化せず、その後一旦減少した後増加した。この現象は、1) 無呼吸負荷の初期には内リンパ腔に面する細胞(ESC)を介した Ca^{2+}の透過性が低く、電気化学勾配が変化しても[Ca]_eが変化しないこと、2) 無呼吸負荷の後期には Ca^{2+}透過性が上昇することで、電気化学勾配の変化に伴い[Ca]_eが変化することを示している。したがって TAIICa は EP の低下に伴う電気化学勾配の変化のみならず、ESC を介した Ca^{2+}透過性が上昇した結果生じるものと考えられた。</p> <p>以上より、無呼吸負荷時には血管条辺縁細胞の L 型 Ca^{2+}チャネルの開孔確率が上昇し、辺縁細胞の細胞 Ca^{2+}濃度が増加して EP の低下を引き起こすことが示唆された。したがって本研究は、音受容に</p>			

重要な EP の発生・調節に重要な知見を提示している。

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。

(主論文公表誌)

The Journal of Physiological Sciences 57(5): 287-298, 2007