

氏 名	長 谷 川 恵 子
(ふりがな)	(はせがわ けいこ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成25年7月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Ca <sup>2+</sup> concentration in endolymphatic surface cells modulates the endocochlear potential and transepithelial resistance in guinea pigs (内リンパ腔表面細胞のCa <sup>2+</sup> 濃度は、モルモットにおける蝸牛内電位および蝸牛管経上皮細胞抵抗を調節する)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 植 野 高 章 教授 林 秀 行

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 《目 的》

蝸牛内リンパ腔は、蝸牛内電位(endocochlear potential：以下EP)と呼ばれる正の電位を有している。EPは内リンパ液中のK<sup>+</sup>の有毛細胞への移動に必要な駆動力を提供し、音の振動を蝸牛管の有毛細胞で電気変換するのに役立っていると考えられている。当教室では、EPは血管条に存在する基底細胞のK<sup>+</sup>の拡散電位により発生する血管条の間質の電位から成り立っているという従来の説ではなく、辺縁細胞の側底膜におけるNa<sup>+</sup>の拡散電位によって形成されており、その細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の変化により調節されていることを報告してきた。本研究では、1) 内リンパ腔表面細胞 (endolymphatic surface cells: ESC) のCa<sup>2+</sup>濃度を変化させた際のEPと蝸牛管経上皮細胞電位変化(cochlear transepithelial voltage

deflection : CoTVD)を電気生理学的手法により測定する。2) その結果について上皮細胞の電氣的回路解析を行い、ESCの膜およびESC細胞間隙のNa<sup>+</sup>及びK<sup>+</sup>の透過性に対するCa<sup>2+</sup>調節機構について検討する。さらに、3) 無呼吸負荷時のEPとCoTVDの変化についても検討を加え、末梢性感音難聴の原因にESC細胞のCa<sup>2+</sup>濃度変化が関わっているかどうかを検討することを目的とする。

#### 《対象と方法》

実験動物として、Preyer反射陽性、300～400 gのメス白色モルモットの内耳を用い、ペントバルビタールナトリウム(28 mg/g)にて腹腔内麻酔後、気管切開を行いroom air下に人工換気にて呼吸管理を行った。筋収縮を抑制するために、50 mg/kg塩化スキサメトニウムを筋注し、心電図にて全身状態をモニターのうえ実験を施行した。

内耳を露出後、蝸牛第2回転に小孔を開け、ここから内リンパ腔へEP測定用ガラス微小電極と、通電兼内リンパ灌流用ガラス微小電極の計2本を刺入した。ガラス電極は、0.5 MKClにて満たし、実験中の無呼吸負荷は人工換気を100秒間停止することにより得た。一方、通電用ガラス微小電極からは、内リンパ腔に1  $\mu$  A(通電時間 3 sec, インターバル 9 sec)の矩形波パルスを通電し、0.5 MKClで満たされたガラス微小電極にてEPの変化を測定した。なお、通電によるCoTVDの変化を指数曲線に適合させて時定数 ( $\tau$ ) を求めた。内リンパ腔への薬剤を含む注入液は145 mM K<sup>+</sup>のリンゲル液に以下の物質を溶解した。nifedipine (1  $\mu$ g/ml), GdCl<sub>3</sub> (100  $\mu$ M), (S)-Bay K8644 (100  $\mu$ M), LaCl<sub>3</sub> (100  $\mu$ M)はリンゲル液にそのまま溶かしたが、tetraethylammonium (TEA; 30 mM TEACl)と CaCl<sub>2</sub> (20 mM CaCl<sub>2</sub>)を含む溶液は浸透圧を一定にする為、リンゲル液の 30 mM KClと置き換えた。また、1 mM EGTAを加えて内リンパ灌流液のCa<sup>2+</sup>濃度を10<sup>-7</sup> Mとした。

#### 《結 果》

本実験により以下の結果を得た。対照時では、(1)対照液を内リンパ灌流すると、EP増大を認めたが非灌流時との有意差を認めなかった。CoTVDは不変であったが、時定数 ( $\tau$ )

は422から567 msecへと上昇した。(2)L型-  $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル阻害剤であるニフェジピンの内リンパ灌流では、CoTVDと  $\Delta \tau$ は減少した。(3)容積調節性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル (TRPV5) の阻害剤である $\text{Gd}^{3+}$ の内リンパ灌流では、CoTVDは変化しなかったが、 $\Delta \tau$  (灌流時と非灌流時の差) は減少した。(4)(S)-BayK8644 (L-型 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネル作動薬) あるいは20mM  $\text{Ca}^{2+}$ の内リンパ灌流では、EPの低下と共にCoTVDも有意に低下したが、 $\tau$ は著名に増加した。無呼吸負荷時には、(1)ニフェジピン灌流では無呼吸負荷による EP の低下は抑制され、CoTVD は上昇した。(2) BayK8644 あるいは  $\text{Ca}^{2+}$ 灌流下での無呼吸負荷は、 $\tau$ を有意に減少させた。

#### 《考 察》

内リンパ液や外リンパ液の酸素濃度は $\sim 20$  mmHgと非常に低いが、血管条の辺縁細胞や基底細胞は酸素濃度が高く、細胞膜に  $\text{Na}^{+}$ や  $\text{K}^{+}$ なども同定されており、血管条の細胞群ではイオン輸送が盛んに行われていると考えられる。したがって、血管条の細胞群では他のESCに比べて電気抵抗が低く、外部より流した電流はほとんど血管条のみ通ると考えられた。このことより、血管条細胞(特に辺縁細胞)の電気回路解析を行い、以下のように推測した。(1)ニフェジピン投与によるEPの上昇とCoTVDの低下は、主として辺縁細胞側底膜の $\text{Na}^{+}$ チャンネルの活性化が関与していると考えられた。(2)無呼吸負荷時は、辺縁細胞の $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、基底側膜の $\text{Na}^{+}$ チャンネルが不活性化する。しかし、同時に細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇により活性化される側底膜のBKチャンネル(全ての細胞に存在し、大きなコンダクタンスを持つ $\text{K}^{+}$ チャンネル)が開き、辺縁細胞内電位はプラスからマイナスへと変化する。それに伴い、辺縁細胞の局所電流は対照時とは逆向きに流れ、その結果、内リンパ腔がマイナス電位となると考えられた。(3)  $\tau = RC$  ( $R$ :抵抗、 $C$ :電気容量)であるので、 $\text{Gd}^{3+}$ は主として細胞表面積を増加させたと考えられた。したがって、容積調節性 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルは細胞容積の調節には関与しているが、細胞膜の抵抗やEPの調節への関与は少ないと考えられた。以上より、辺縁細胞の $\text{Ca}^{2+}$ 透過性チャンネルは、辺縁細胞の $\text{Na}^{+}$ や $\text{K}^{+}$ チャンネルのコンダクタンスや細胞容積を調節していると考えられた。特に、血流障害にともなうEPの低下は、L

型-  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルやおそらく他の $\text{Ca}^{2+}$ 透過性チャネルの活性化による辺縁細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が原因であると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

蝸牛内リンパ腔は+80 mV程度の蝸牛内直流電位 (Endocochlear potential; 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た電位が起源となっ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、モルモット蝸牛において内リンパ腔に薬剤を投与しながら、電気生理学的手法を用いてその時の蝸牛内電位および蝸牛絨上皮細胞電位変化 (Cochlear transepithelial voltage deflection; CoTVD) を測定し、無呼吸負荷に伴うそれらの変化をも検討しながら理論的回路解析を行って以下の結果を得ている。

対照時においては、(1) L型-Ca<sup>2+</sup>チャンネル阻害剤であるニフェジピンの内リンパ灌流では、CoTVD と  $\Delta \tau$  (灌流時と非灌流時の差) は減少した。(2)容積調節性 Ca<sup>2+</sup>チャンネル (TRPV5) の阻害剤である Gd<sup>3+</sup>の内リンパ灌流では、CoTVD は変化せず、 $\Delta \tau$ は減少した。(3)(S)-BayK8644 (L型 Ca<sup>2+</sup>チャンネル作動薬) あるいは 20mM Ca<sup>2+</sup>の内リンパ灌流では、EP、CoTVD とも低下したが、 $\tau$ は増加した。ここで、 $\tau = RC$  ( $R$ :抵抗、 $C$ :電気容量) であるので、ニフェジピンは辺縁細胞の側底膜抵抗を低下させ、Gd<sup>3+</sup>は主として細胞表面積を低下させたと解析している。したがって、容積調節性 Ca<sup>2+</sup>チャンネルは細胞容積の調節には関与しているが、細胞膜の抵抗や EP の調節への関与は少ないと推測している。

また、無呼吸負荷時には、

(1)ニフェジピン灌流では無呼吸負荷による EP の低下は有意に抑制され、CoTVD は上昇した。これは、無呼吸負荷時でも辺縁細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度が比較的強く保たれるために、辺縁細胞側底膜の Na<sup>+</sup>チャンネルの不活性化が遅れ、結果、EP が維持できている。(2) BayK8644 あるいは Ca<sup>2+</sup>灌流下での無呼吸負荷は、CoTVD を低下させる傾向があり、灌流により一旦増加させた $\tau$ を有意に減少させた。したがって、辺縁細胞内 Ca<sup>2+</sup>の上昇は細胞膜抵抗のみならず細胞表面積をも著明に変化させると推測している。

これらの実験結果と考察から、辺縁細胞のCa<sup>2+</sup>濃度の変化は、辺縁細胞側底膜の表面積やコンダクタンスを容易に変化することを指摘している。特に、無呼吸負荷時にCa<sup>2+</sup>濃度が上昇し、側底膜のNa<sup>+</sup>チャンネルが不活性化すると同時に活性化される側底膜のBKチャネ

ル（全ての細胞に存在し、大きなコンダクタンスを持つK<sup>+</sup>チャンネル）の関与を推論し、無呼吸負荷時の負のEPについても検討を加えたことは、EPの変化に新知見を提供している。さらには、急性虚血性感音難聴の治療を行うにあたり、細胞膜抵抗（特に辺縁細胞の）に影響を及ぼすCa<sup>2+</sup>透過性チャンネル抑制剤の投与の有効性を示唆している。

以上により、本論文は本学大学院学則第11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）

Bulletin of the Osaka Medical College 59(2): 2013, in press