

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870248

研究課題名(和文)内耳内リンパ液カルシウム恒常性維持機構と聴覚機能障害に関する研究

研究課題名(英文)Analysis of calcium homeostasis of endolymph in the cochlea.

研究代表者

任 書晃(NIN, Fumiaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80644905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内耳蝸牛におけるカルシウム輸送の機構に迫るため、血管条にカルシウム濃度と電位を同時に測定できる二連管ガラス電極を、生きた動物において刺入し、無酸素負荷時に起こる変化を記録した。血管条細胞外空間内のカルシウム濃度は無酸素負荷後から徐々に増加を示し、その後無酸素負荷からの解放により低下を示した。内リンパ液のカルシウム濃度は、無酸素負荷により増加を示すことが知られていることから、内リンパから蝸牛側壁の外層へ向かう方向に、カルシウムが一方向性に輸送されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the mechanism of calcium transport in the cochlea of the inner ear, we used double-barreled ion-selective electrode which can measure the calcium concentration and potential at the same time. We inserted the electrode into the cochlear lateral wall and then measure the change of calcium and potential in vivo under anoxic condition. Calcium concentration in the intrastrial space of the lateral wall increase after the onset of anoxia. When we release the perturbation, calcium concentration decreased and returned to the normal level. The previous study reported that the calcium concentration in endolymph increases under anoxic condition, therefore, these results indicates that the calcium unidirectional transport from endolymph to the lateral wall is endowed in the cochlea.

研究分野：聴覚生理学

キーワード：カルシウム イオン輸送 内リンパ液電位 血管条

1. 研究開始当初の背景

内耳蝸牛を満たす細胞外液「内リンパ液」は、150 mM の高 K^+ 濃度と+80 mV の高電位を呈すると共に、20 μ M と極めて低い Ca^{2+} 濃度を示す¹⁾。この特殊な Ca^{2+} 環境は、聴覚機能に必須である。 Ca^{2+} 濃度の異常は難聴を誘引する²⁾。しかし、内リンパ液の Ca^{2+} 環境の維持機構は未だ不明であった。

2. 研究の目的

応募者は、以前に、内リンパ液の高電位の成立が、蝸牛の上皮組織「血管条」におけるイオン動態に基づくことを明らかにした。そこで本課題では、盛んなイオン輸送の場であるこの血管条が、内リンパ液の Ca^{2+} 恒常性にも中心的役割を担うという仮説をたて、実験科学と計算科学の手法を駆使して、多角的・定量的・理論的にこれを実証することを目的とする。そして、本研究を通じて、難聴治療への新たな着眼点を探る。

3. 研究の方法

(1) Ca^{2+} 濃度を測定するための二連管イオン電極の作製

Ca^{2+} 濃度の測定については、応募者が過去に行ったイオン電極による K^+ 濃度の測定法を応用すれば、実現が可能である。まず、 Ca^{2+} 交換液を二連管ガラス電極に充填し、基準溶液での電位反応の妥当性を評価する。二連管ガラス電極による方法は、内リンパ液のように高電位を示す空間でイオン濃度動態を検出するために必須の技術である。一方のガラス管で「電位」を、もう一方で「電位と Ca^{2+} 拡散電位(平衡電位)の和」が測定され、その差分から Ca^{2+} 濃度が算出される。

(2) 内リンパ液の Ca^{2+} 濃度測定

(1)で作製した Ca^{2+} 用イオン電極を用いて、生きたモルモットの正常状態の内リンパ液 Ca^{2+} 濃度を測定する。これまでに応募者が習得した内リンパ腔への電極刺入法を活用する。

(3) 血管条組織での Ca^{2+} 濃度測定

正常状態の蝸牛を対象に、15 nm と極めて狭い血管条細胞外空間、および細胞内空間へ、イオン電極を刺入する。同箇所への刺入方法

は、応募者が既に持つ技術である(*PNAS* 105: 1751-1756, 2008)。

4. 研究成果

(1) Ca^{2+} 交換液を二連管ガラス電極に充填し、基準溶液での電位反応の妥当性を評価した。

(2) 二連管ガラス電極により溶液の Ca^{2+} 濃度が計測できることを確認し、キャリブレーションを行った後、内リンパ腔内に電極を刺入し、内リンパ液の Ca^{2+} 濃度を測定した。

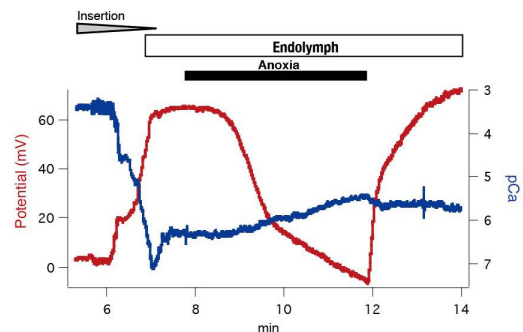


図1: 無酸素負荷時の内リンパ液内の Ca^{2+} 濃度の変化

図1に示すように、内リンパ液内の Ca^{2+} 濃度は無酸素負荷後から徐々に増加を示し、その後無酸素負荷からの解放により、低下を示した。この結果は、これまでの報告の追試であり、申請者の計測技術が正確に過去の報告を再現できることを意味している。

(3) 血管条にある細胞外空間は、通常の細胞外液同様に、 Ca^{2+} 濃度が細胞内に比べて高いことが報告されている。そこで、蝸牛側壁の外リンパ液側から電極を刺入し、電位が高く、かつ、 Ca^{2+} 濃度が高い場所をもって血管条細胞空間と認識し、その場所で無酸素負荷を行った。

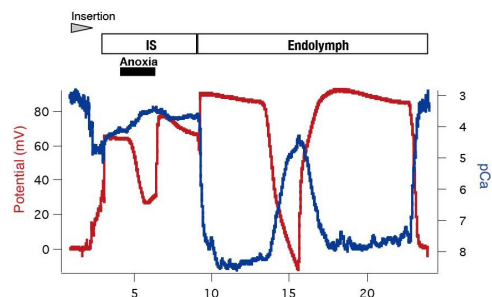


図2: 無酸素負荷時の血管条細胞外空間の Ca^{2+} 濃度の変化

濃度は無酸素負荷後から徐々に増加を示し、その後無酸素負荷からの解放により、低下を示した。

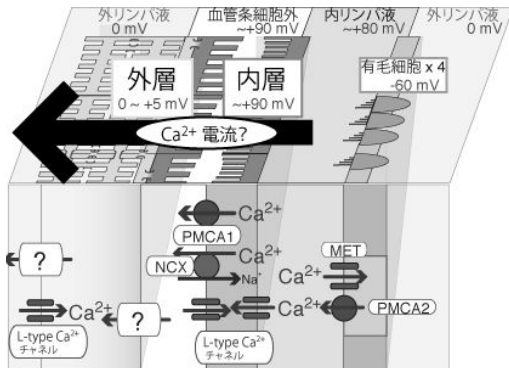


図3: 蝸牛側壁における Ca^{2+} 一方向性輸送仮説

以上の血管条細胞外での Ca^{2+} 濃度の変化はこれまでに計測されたことのない新たな計測結果である。この実験結果は、図3の仮説で示す Ca^{2+} の一方向性輸送を強く示唆するものである。しかし、今回の実験結果からは、内リンパ液から内層を介して、血管条細胞外空間までの Ca^{2+} 輸送の存在を予測させるが、一方で、仮説にある外層、すなわち血管条細胞外空間から外リンパ液への一方向性輸送は、未だ確認ができていない。今後外層の Ca^{2+} 濃度を計測しつつ、無酸素負荷時の変化を捉えることで、仮説を実証したいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

1) Takamasa Yoshida, Fumiaki Nin, Genki Ogata, Satoru Uetsuka, Tadashi Kitahara, Hidenori Inohara, Kohei Akazawa, Shizuo Komune, Yoshihisa Kurachi, Hiroshi Hibino. NKCCs in the fibrocytes of the spiral ligament are silent on the unidirectional K^+ -transport that controls the electrochemical properties in the mammalian cochlea. *Pfluger Arch.* 467 : 1577-1589 2015. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- 1) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、佐藤 満雄、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 . カリウム循環電流は内耳蝸牛の電気化学的特性を制御する。(ポスター) 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会大会 2015年3月21~23日; 兵庫県、神戸市

剖学会・第92回日本生理学会大会 2015年3月21~23日; 兵庫県、神戸市

- 2) 任 書晃、吉田 崇正、村上 慎吾、緒方 元気、上塚 学、倉智 嘉久、日比野 浩 . 局所性 Na^+ 電流は内リンパ液高電位に不可欠な内耳上皮組織の電位環境を形成する。(ポスター) 第120回日本解剖学会・第92回日本生理学会大会 2015年3月21~23日; 兵庫県、神戸市
- 3) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、佐藤 満雄、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 . カリウム循環電流は内耳蝸牛の電気化学的特性を制御する。第88回日本薬理学会年会 2015年3月18~20日; 愛知県、名古屋
- 4) 任 書晃、吉田 崇正、緒方 元気、倉智 嘉久、日比野 浩 . 聴覚に必須な蝸牛 K^+ 循環に寄与するらせん靭帯 Na^+ 輸送系の理論的解析 第65回日本薬理学会北部会 2014年9月27日; 福島県、福島市
- 5) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 . 内リンパ液高電位の成立における $Na^+, K^+, 2Cl^-$ 共輸送体の機能解析 第87回日本薬理学会年会 2014年3月21日; 宮城県、仙台市
- 6) 吉田 崇正、任 書晃、緒方 元気、上塚 学、小宗 静男、倉智 嘉久、日比野 浩 . 内リンパ液高電位の成立における $Na^+, K^+, 2Cl^-$ 共輸送体の機能解析 第91回日本生理学会大会 2014年3月16日; 鹿児島県、鹿児島市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

任 書晃 (NIN Fumiaki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：80644905