

研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2009～2010
課題番号：	21791653
研究課題名(和文)	蝸牛虚血再灌流時における内リンパカルシウムイオンの役割
研究課題名(英文)	Role of endolymphatic Ca ²⁺ in reperfusion after acute ischemia
研究代表者	
	森 京子(高巻京子) (Mori Atsuko)
	大阪医科大学・医学部・助教
	研究者番号： 40368105

研究成果の概要(和文)：

虚血などの低酸素時には内リンパ直流電位(EP)の著明な低下が観察されるが、これには血管条辺縁細胞内 Ca²⁺濃度の上昇が関与している。EP および蝸牛管抵抗の同時測定を行い無呼吸負荷を行うと、EP の低下と蝸牛管抵抗の上昇が観察される。しかし、L 型 Ca²⁺チャネル活性化剤を内リンパ腔に投与したところ、EP は低下するが蝸牛管抵抗は低下し、無呼吸負荷を行うと蝸牛管抵抗の上昇が観察された。よって、無呼吸負荷時には細胞内 Ca²⁺濃度上昇とは異なる機序で蝸牛管抵抗が上昇することが判明した。

研究成果の概要(英文)：

We measured the changes in EP and cochlear partition resistance (CoPR) induced by asphyxia. The CoPR was decreased after the perfusion with control artificial endolymph, and was increased after the asphyxia. The perfusion with artificial endolymph containing BAY K8644 decreased both the CoPR and the EP, and the CoPR was increased by the asphyxia. These results suggest that increase in the CoPR induced by the asphyxia might not be mediated by the elevation of cytosolic Ca²⁺ in the cochlear cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：内耳電気生理，蝸牛内直流電位，蝸牛管抵抗，細胞内カルシウム，低酸素負荷

1. 研究開始当初の背景

1978年に Boshier と Warren により蝸牛内リンパ液の Ca²⁺濃度([Ca]_o)は、細胞外液と比べて低く約 10⁻⁵ M であると報告された。しかし申請者は、Ca²⁺交換剤を PVC (polyvinylchloride) で固めて安定性を改善した PVC-resin Ca²⁺電極を用いてモルモットにおける[Ca]_oを測定し、[Ca]_oが従来報告されていた値よりも非常に低く約 10⁻⁷ M で

あると報告した(Takamaki et al., 2003)。同時に蝸牛内直流電位 (endochochlear potential; EP) EP を測定し、EP の変化にともない[Ca]_oが大きく変化する事を発見した。また、内リンパ液中に高濃度 CaCl₂溶液や細胞膜透過性でない EGTA 溶液を灌流して[Ca]_oを変化させても EP は変化しないことから、[Ca]_oと細胞外液との Ca²⁺濃度差が EP を決定しているのではない事を明らかにし

た。

さらに我々のグループでは細胞膜透過性の EGTA/AM や nifedipine を内リンパ灌流すると、人工呼吸器の停止による無呼吸負荷時の EP の低下が、コントロール条件と比較し有意に抑制されることを発見した (Mineharu A. et al., 2005, Nimura Y. et al., 2007)。以上のことから無呼吸負荷時には、血管条など内リンパ腔周囲の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca]_e$) が細胞外からの Ca^{2+} の流入によって上昇し、さらに $[Ca]_e$ の上昇をきたすのではないかと推察した。EGTA/AM や nifedipine は $[Ca]_e$ の上昇を抑制することで無呼吸負荷時の EP の低下を抑制するのではないかと仮説をたてた。

2. 研究の目的

蝸牛中央階には +80 mV 程度の蝸牛内直流電位が (EP) 存在し、この電位の正の部分は蝸牛血管条で発生し、負の部分はコルチ器で発生すると考えられている。これまで、申請者らは血管条で発生される EP の正の部分に着目し、無呼吸負荷や高濃度利尿剤投与による EP の低下は、これらの刺激により血管条側基底膜の Ca^{2+} 透過性チャネルが開孔し、辺縁細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇することで EP 発生機構が障害されることにより生じることを明らかにしてきた (Inui T. et al., 2007, Mori Y. et al., 2009)。電圧 (EP) はオームの法則 ($V = I \times R$) により形成されるため、EP はチャネルを介したイオンの拡散により発生した電流と、細胞膜や細胞間隙により形成される抵抗の積により形成されるものと考えられる。これまで、血管条における EP の発生機構に関する研究では、現在は中間細胞における K^+ の拡散により EP が生じるとする説が有力であるが、ここで論じられている EP は K^+ の拡散により発生するのは電流のみであり電気回路における抵抗は全く考慮されておらず、これまで内リンパ腔の抵抗を測定した研究もきわめて少ない。

そこで、本申請では電池と抵抗により構成される簡略化した回路モデルを作成し、回路の各要素がどのように EP の形成に関わっているのかを検討するために、微小電極法を用いて EP を測定するとともに、カレント・インジェクション法を用いて内リンパ腔に一定の電流を注入することで EP の変化を測定し、蝸牛管抵抗を測定した。これにより、EP の維持に対しイオンの拡散電位と細胞膜および細胞間隙の抵抗がどのように関わっているのか、また血管条辺縁細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇がこれらにどのように関わるのか、さらに虚血時において内耳の viability を維持するにはどのような方法が適切であるのかを検討することが可能となった。

3. 研究の方法

実験動物として白色モルモットを用いる。気管切開による人工呼吸下に蝸牛を露出し、経血管条的にガラス微小電極およびガラス微小ピペットを刺入することで内リンパ腔に各種薬剤を投与しながら、EP とカレント・インジェクション法による蝸牛管抵抗を同時測定した。EP 測定用電極には 0.5 M の KCl 溶液を充填し、カレント・インジェクション用電極は先端を研磨したガラス電極に 140 mM KCl 溶液を充填したガラス微小電極を用いた。EP 測定用電極は電極ホルダーを介してエレクトロメーター

(WPI, FD223) に接続した。EP 測定用電極を内リンパ腔に刺入し EP を測定した状態でカレント・インジェクション用電極を内リンパ腔に刺入し、カレント・インジェクション用電極にアイソレーター (WPI, A320RC) にて発生させた 1 μ A の矩形波パルスを通電し、このときの EP 変化を測定して蝸牛管抵抗 (CoPR) を測定し、MacLab 8s (ADInstrument) にて記録した (図 1)。また、カレント・インジェクション用電極は電極抵抗を低下させるために先端を研磨してあるため、薬剤を内リンパ腔に投与する内リンパ注入用ピペットとしても用いた。内リンパ腔に投与した薬剤として、電依存性 K^+ チャネル阻害剤である tetraethylammonium (TEA) や TRP チャネル阻害剤である Gd^{3+} および La^{3+} 、L 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤である nifedipine および L 型 Ca^{2+} チャネル活性化剤である (S)-BAY K8644 を使用した。また、人工呼吸器停止により無呼吸とすることにより虚血状態を誘発した。

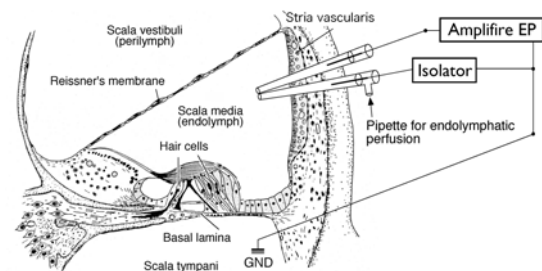


図 1 : 方法

4. 研究成果

正常内リンパ液に近い組成の人工内リンパ液を 5 分間灌流し、灌流前、灌流後、無呼吸負荷 5 分後の EP および蝸牛管抵抗を測定し、これを対照実験とした。この結果、内リンパ灌流により EP は殆ど変化しないものの蝸牛管抵抗は有意に低下した。さらに無呼吸負荷を行うと、EP の低下に伴い蝸牛管抵抗は灌流前よりも上昇することが判明した (図 2 および図 6)。

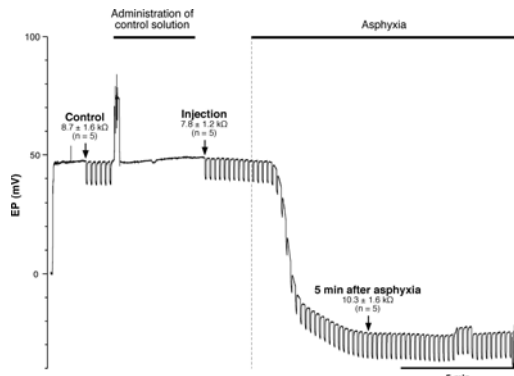


図 2 : 対照実験

そこで、無呼吸負荷により蝸牛管抵抗が上昇する機序の検討を行った。まず、無呼吸負荷により蝸牛管抵抗が上昇するメカニズムとして、内リンパ腔に面した細胞膜のイオンチャネルの活性が低下した結果蝸牛管抵抗が上昇した可能性を考え、同部位に存在することが報告されている電依存性 K^+ チャネルおよびTRPチャネルの阻害剤を投与し、無呼吸負荷による蝸牛管抵抗の変化を観察した。電依存性 K^+ チャネル阻害剤であるTEA(図3および図6)やTRPチャネル阻害剤である La^{3+} (図4および図6)および Gd^{3+} (図5および図6)を内リンパ腔に投与すると、蝸牛管抵抗は対照条件と比べて上昇を認めた。したがって、対照実験における人工内リンパ液注入時の蝸牛管抵抗低下は、内リンパ腔の圧力上昇に伴う伸展受容チャネルの開孔によるものと推察された。しかし、これらの薬剤の投与時にも無呼吸負荷によるEP低下に伴う蝸牛管抵抗の上昇が観察されたため、内リンパ腔に面した細胞膜のイオンチャネルは、無呼吸負荷に伴う蝸牛管抵抗の上昇に殆ど関与していないことが明らかになった。

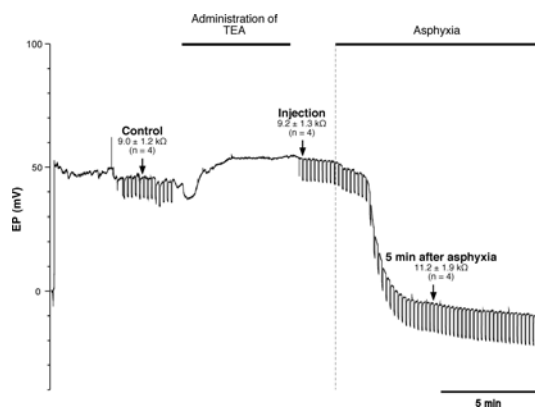


図 3 : TEA の効果

これまで我々は、無呼吸負荷時には蝸牛血管条の辺縁細胞の側基底膜に存在するL型 Ca^{2+} チャネルが開孔することで、辺縁細胞の $[Ca]_c$ が上昇し、EPが低下することを見出し

ている(Inui T. et al., 2007, Mori Y. et al., 2009)。そこで、L型 Ca^{2+} チャネル阻害剤であるnifedipineおよびL型 Ca^{2+} チャネル活性化剤である(S)-BAY K8644を内リンパ腔に投与し、EPおよび蝸牛管抵抗の変化を観察した。

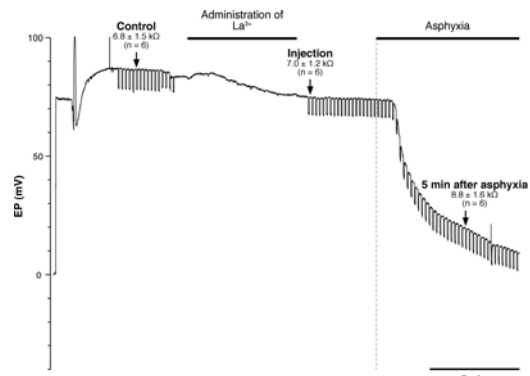


図 4 : La^{3+} の効果

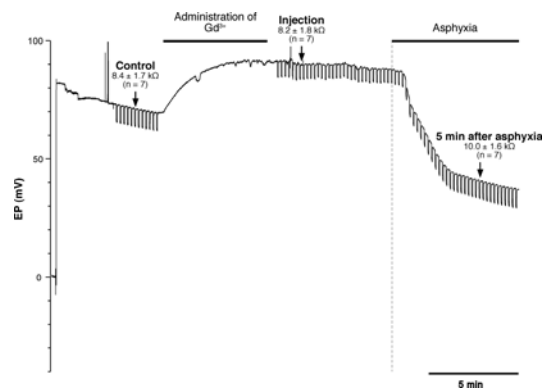


図 5 : Gd^{3+} の効果

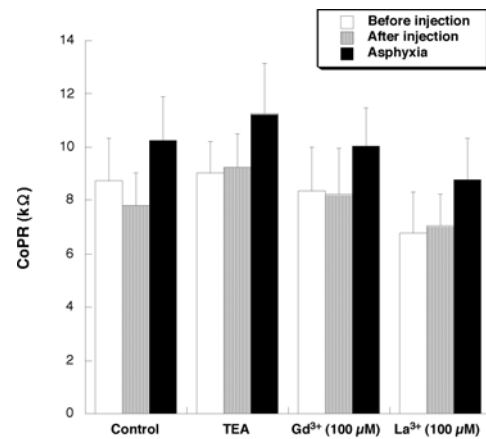


図 6 : 蝸牛管抵抗 (CoPR) の比較

Nifedipineの投与では、これまでの報告と同様に投与後のEP上昇と無呼吸によるEP低下の遅延が観察されたが、蝸牛管抵抗の変化は対照実験に準じたものであり、無呼吸負荷による蝸牛管抵抗の上昇が観察された(図7および図9)。一方、(S)-BAY K8644を内リンパ腔に投与すると、辺縁細胞の $[Ca]_c$ 上昇によ

り EP は低下するにもかかわらず蝸牛管抵抗は低下した。この状態で無呼吸負荷を行うと、EP がさらに低下するとともに蝸牛管抵抗の明らかな上昇が観察された(図8および図9)。このことは、無呼吸負荷に伴う CoPR の上昇には、辺縁細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が関与していないことを示している。

以上より、無呼吸負荷時には EP の低下と蝸牛管抵抗の上昇が観察されるが、このうち細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は EP の低下には関与するものの、蝸牛管抵抗の上昇には関与しないことが明らかとなった。すなわち、無呼吸負荷時には $[Ca]_c$ 上昇に伴うイオンチャネルの閉鎖とは異なる機序によりイオンチャネルの閉鎖や細胞間結合の変化が生じ、蝸牛管抵抗が上昇するものと推察される。したがって、血流障害に伴う感音性難聴の治療には、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を防ぐのみならず、酸素負荷等を行う必要があるものと考えられた。

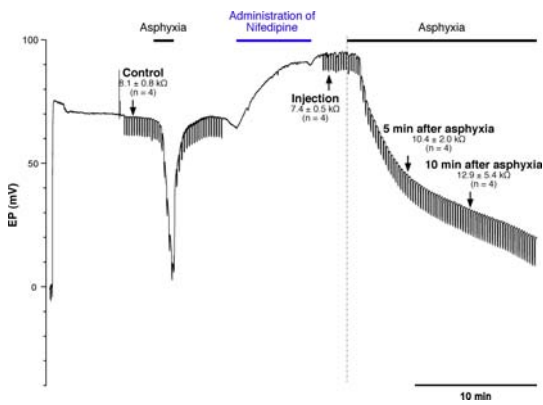


図7: Nifedipine の効果

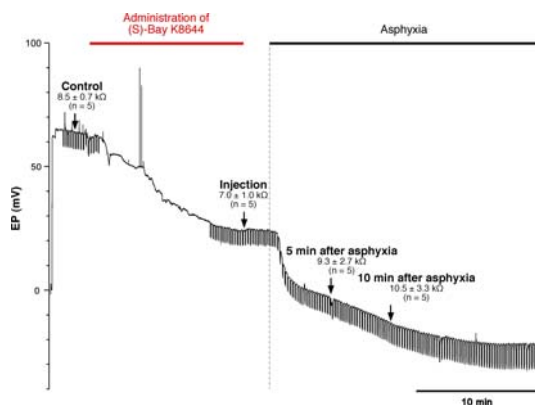


図8: (S)-BAY K8644 の効果

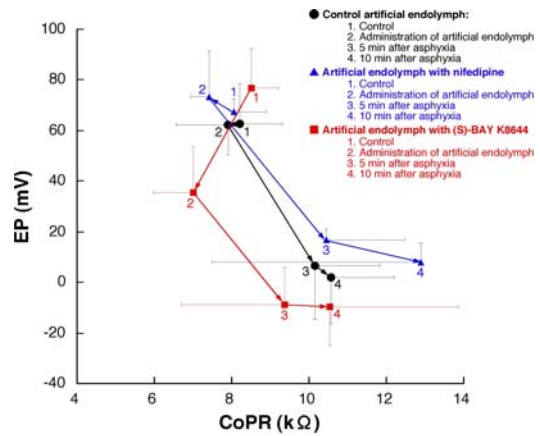


図9: 対照条件、Nifedipine および(S)-BAY K8644 投与時の EP と蝸牛管抵抗 (CoPR) の変化

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 11 件)

1. 櫛原崇宏, 萩森伸一, 森京子, 金沢敦子, 河田了: 両側の聾および顔面神経麻痺を呈した乳癌による髄膜癌腫例. Facial N Res Jpn 2010;30, 143-45.
2. 和田晋一, 萩森伸一, 森京子, 金沢敦子, 櫛原崇宏, 野中隆三郎, 河田了: Electroneurography における最大上刺激の至適電流量について. Facial N Res Jpn 2010;30, 40-42.
3. 萩森伸一, 和田晋一, 森京子, 金沢敦子, 櫛原崇宏, 野中隆三郎, 河田了: 正中法 Electroneurography による顔面神経麻痺の予後診断. Facial N Res Jpn 2010;30, 37-39
4. 櫛原崇宏, 河田了, 森京子, 萩森伸一, 竹中洋: 外傷を契機に発見された小児血管奇形例. 耳鼻臨床 2010; 103, 373-78.
5. 金沢敦子, 森京子, 萩森伸一, 櫛原崇宏, 野中隆三郎, 河田了: 糖尿病合併患者におけるステロイド短期投与の影響について. Facial N Res Jpn 2010;30, 80-83.
6. Haginomori S, Wada S, Takamaki A, Kanazawa A, Nonaka R, Takenaka H, Takubo T: A novel electroneurography method in facial palsy. Acta Otolaryngol 2010;130, 520-4.
7. 櫛原崇宏, 荒木倫利, 森京子, 乾崇樹, 吉村勝弘, 萩森伸一, 東川雅彦, 竹中洋: 鼻中隔より発生した悪性神経鞘腫の1例. 耳喉頭頸 2009; 81, 713-7.
8. Haginomori S, Mori A, Kanazawa A,

- Takenaka H: Endoscopy-assisted surgery with topical mitomycin for a cholesterol granuloma in the petrous apex, *Laryngoscope*. 2009;119, 2437-40
9. Haginomori SI, Takamaki A, Nonaka R, Mineharu A, Kanazawa A, Takenaka H: Postoperative aeration in the middle ear and hearing outcome after canal wall down tympanoplasty with soft-wall reconstruction for cholesteatoma. *Otol Neurotol* 2009;30, 478-83.
 10. Haginomori S, Miyatake S, Inui T, Araki M, Kawabata S, Takamaki A, Lee K, Takenaka H, Kuroiwa T, Uesugi Y, Kumada H, Ono K: Planned fractionated boron neutron capture therapy using epithermal neutrons for a patient with recurrent squamous cell carcinoma in the temporal bone: a case report. *Head Neck* 2009;31, 412-8.
 11. Kawata R, Lee K, Takamaki A, Yoshimura K, Takenaka H: Ultrasonography for preoperative localization of enlarged parathyroid glands in secondary hyperparathyroidism. *Auris Nasus Larynx* 2009;36, 461-5.

〔学会発表〕 (計 13 件)

1. 森 禎章, 乾 崇樹, 森 京子, 長谷川恵子, 荒木倫利, 萩森伸一, 河田 了, 窪田隆裕, 無呼吸負荷による蝸牛内直流電位低下における PKC 依存性蛋白リン酸化過程の関与, 第 20 回日本耳科学会, 2010 年 10 月, 松山市・ひめぎんホール
2. 乾 崇樹, 森 禎章, 森 京子, 渡辺正仁, 長谷川恵子, 荒木倫利, 萩森伸一, 窪田隆裕, 河田 了, 蝸牛内直流電位の維持に対する血管条辺縁細胞の Ca^{2+} 透過性チャネルの役割, 第 20 回日本耳科学会, 2010 年 10 月, 松山市・ひめぎんホール
3. 森 京子, 萩森伸一, 金沢敦子, 櫛原崇宏, 河田 了, 慢性中耳炎におけるパッチテストの重要性, 第 20 回日本耳科学会, 2010 年 10 月, 松山市・ひめぎんホール
4. 萩森伸一, 森 京子, 櫛原崇宏, 金沢敦子, 野中隆三郎, 河田 了, 軟素材を用いた外耳道後壁再建を行う鼓室形成術大阪医科大学における工夫, 第 20 回日本耳科学会, 2010 年 10 月, 松山市・ひめぎんホール
5. 櫛原崇宏, 萩森伸一, 森 京子, 金沢敦子, 河田 了, 換気チューブ留置を行った小児滲出性中耳炎例の術後経過について, 第 20 回日本耳科学会, 2010 年 10 月, 松山市・ひめぎんホール
6. 森 京子, 萩森伸一, 櫛原崇宏, 金沢敦子, 但吉民江, 河田 了, 慢性中耳炎手術におけるパッチテストの有用性, 第 72 回耳鼻咽喉科臨床学会, 2010 年 7 月, 倉敷市・倉敷市芸文館
7. Mori Y et al., PKC-dependent phosphorylation pathway(s) contribute to the decrease in endocochlear potential induced by the transient asphyxia., 第 87 回日本生理学会大会, 2010 年 5 月, 盛岡市・盛岡市文化ホール
8. 櫛原崇宏, 萩森伸一, 森 京子, 金沢敦子, 野中隆三郎, 竹中 洋, 軟素材による外耳道後壁再建を行った鼓室形成術における長期聴力成績について, 第 19 回日本耳科学会, 2009 年 10 月, 東京都・京王プラザホテル
9. 乾 崇樹, 森 禎章, 渡辺正仁, 森 京子, 荒木倫利, 窪田隆裕, 竹中 洋, 無呼吸負荷および furosemide 投与時の蝸牛内直流電位低下における血管条辺縁細胞 Ca^{2+} 透過性チャネルの関与, 第 19 回日本耳科学会, 2009 年 10 月, 東京都・京王プラザホテル
10. 峰晴昭仁, 金沢敦子, 萩森伸一, 森 京子, 野中隆三郎, 竹中 洋, ステロイド大量療法が糖尿病に与える影響について, 第 19 回日本耳科学会, 2009 年 10 月, 東京都・京王プラザホテル
11. 萩森伸一, 森 京子, 金沢敦子, 竹中洋, 内視鏡下操作を併用した錐体部コレステリン肉芽腫の一例, 第 19 回日本耳科学会, 2009 年 10 月, 東京都・京王プラザホテル
12. Yoshiaki Mori, Masahito Watanabe, Takaki Inui, Atsuko Mori, Yoshitugu Nimura, Akihito Mineharu, Michitoshi Araki, Hiroshi Takenaka, and Takahiro Kubotam, XXXVI International Congress of Physiological Sciences, 2009 年 7 月, 京都市・京都国際会館
13. 櫛原崇宏, 河田了, 森 京子, 萩森伸一, 竹中 洋, 外傷を契機に発見された嚢胞性リンパ管腫, 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会総会, 2009 年 5 月, 大阪市・大阪国際会議場

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 京子 (高巻京子) (Mori Atsuko)

研究者番号：40368105