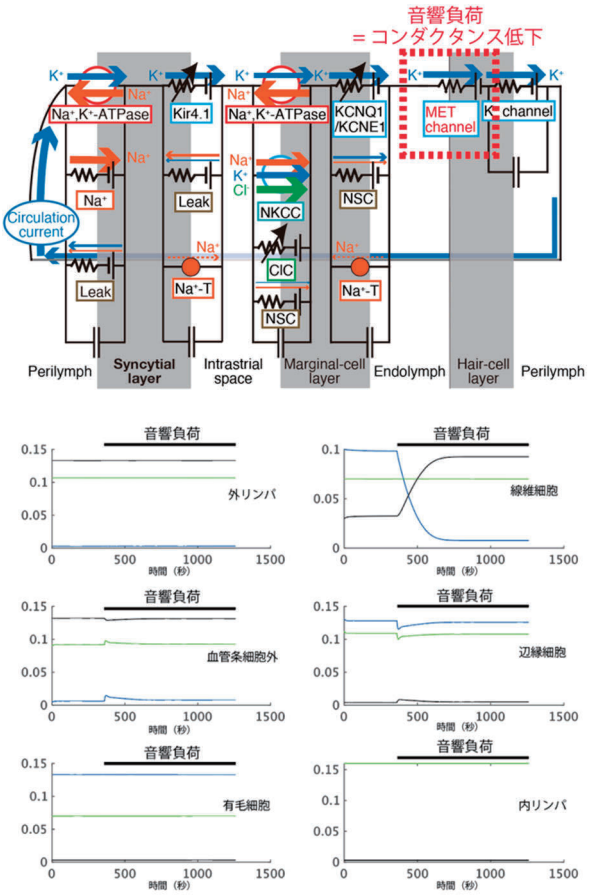
40　音響外傷における蝸牛血管条機能の実験・理論的解析	任　書晃

【目的】本研究では、蝸牛の生体内電気環境「内リンパ液高電位」を成立させる血管条内のイオン・電位環境に関して、音響外傷時に起こる変化を理論科学的にシミュレーションし、予測された変化を、生動物を用いた *in vivo* 電気生理実験により検証する研究を行った。

【方法】理論科学的手法として、過去に著者らが発表した蝸牛内のイオン濃度・電位を再現できる「fibrocyte- integrating Nin-Hibino-Kurachi model」を用いてシミュレーションを行った。電気生理実験としては、全身麻酔をかけたモルモットを対象に、ガラス微小電極法を用いた蝸牛内電位計測を行った。

【結果】音響外傷時には、有毛細胞が損傷することで感覚毛の先端にある機械・電気変換チャネルのコンダクタンスが上がることを想定した。数理モデル内では、同部位のコンダクタンスを 5 倍に増強し、この時におこる蝸牛内各部位でのイオン濃度と電位変化を計算した。その結果、パラメータを変化させた有毛細胞部位とは異なり、線維細胞部位で K^+濃度の低下と Na^+濃度の上昇が示唆された。さらに、内リンパ液、血管条細胞外の両方の部位での電位は、長時間の音響曝露により負の電位を示すことが予測された。この結果を検証すべく、電気生理実験を行ったが、半導体供給遅延などにより実験装置の整備に時間を要したため、本助成期間では内リンパ液の電位計測の実行に留まった。期間終了後も引き続き研究を進め、近い将来に血管条内の K^+濃度・電位計測を実行する予定である。

蝸牛血管条内イオン濃度・電位環境を再現する数理モデルを用いたコンピュータ・シミュレーション



40. 音響外傷における蝸牛血管条機能の実験・理論的解析

任　書晃

岐阜大学 大学院医学系研究科 生命原理学講座 生理学分野

Key words：内リンパ電位，シミュレーション，音響外傷

緒　言

我国には、現在 1,000 万人の内耳性聴覚障害患者が存在する。高齢化社会を迎え、大きな社会的問題でもある加齢性難聴は、今もその病因が不明である。これらの原因不明かつ難治性の難聴の多くは、内耳に起因するため、その仕組みの解明は、治療の発展のために急務である。内耳性難聴は、大きく分けて 1. 有毛細胞性、2. 蝸牛神経性、3. 血管条性の三つに分類される。しかし、臨床の現場においても、1 や 2 を診断する方法として、歪成分耳音響放射（DPOAE）や聴性脳幹反応（ABR）などの聴覚生理検査が広く活用されているが、現在まで血管条機能を評価する研究技術はない。本計画では、難聴動物を対象に、血管条機能の変化を実験と計算科学を相補的に駆使して定量的に観測し、病態解明に繋げることを目的とした。

＋80 mV の内リンパ液高電位は聴覚の成立に必須であり、電位の低下で難聴が生じる。この電位環境の維持には、蝸牛側壁と有毛細胞の両者のカリウム輸送により達成される蝸牛 K^+循環が重要な役割を果たす。我々はこれまでに、側壁や有毛細胞に発現するイオン輸送分子の局在と機能に立脚した蝸牛 K^+循環のメカニズムや［1，2］、それらによる内リンパ液高電位の制御機構を電気生理実験とコンピュータ・シミュレーションによる理論科学的手法を駆使して解析してきた［3］。特に、蝸牛 K^+循環に寄与する蝸牛側壁のイオン輸送体を電気生理実験により実証し［4，5］、さらに、蝸牛 K^+循環の詳細なメカニズムを理論科学的手法で解明してきた［6］。これらの成果は、血管条と有毛細胞の機能が音依存的にカリウム輸送を通じて関連し合っていることを明らかにした。本計画ではこれらの知見を難聴の病態解明に活用した。

まず、これまでに作成した蝸牛内の電位・イオン濃度を再現する数理モデル「fibrocyte-integrating Nin-Hibino-Kurachi model（fi-NHK model）」を用いたコンピュータ・シミュレーションを行った。音響外傷で想定されるパラメータの変化をモデル内に反映し、その結果から予測される各種蝸牛内の電位およびイオン濃度を導出した。さらに、ここで予測された電位変化を、実際の動物内にて検証することを計画していたが、半導体不足による実験装置購入に半年以上の遅れが生じたため、引き続き、装置の導入を待って、検証実験を行っていく予定である。

方　法

本研究では、コンピュータ・シミュレーションを用いた理論科学実験と、モルモットを用いた電気生理学実験とを相補的に活用することを計画した。

1. コンピュータ・シミュレーション

コンピュータ・シミュレーションでは、数理モデル「fi-NHK model」を、MATLAB（R2019a）内で走らせて数理計算を行った。コンピュータは、Mac Book Pro（macOS 12.6.3）を用いた。

2. 電気生理実験

電気生理実験では、生後 5 週齢以降のモルモットを用いて、全身麻酔下に蝸牛側壁および内リンパ液の電位測定を行った。測定電位は、－40 mV～ ＋90 mV の範囲の微弱な生体電位を対象とするため、米国 A-M systems 社の細胞外

電位増幅機 Model 3000 を用いた。測定電極は、Sutter 社のマイクロピペットプラーP-1000 を購入し、単管のガラス管から微小ガラスピペットを作製した。電極内には 3M の KCL 溶液を満たした。

結果および考察

1. 理論科学実験

イオン輸送体に依存して変化する膜電位と膜を介した電流の動態は、電気回路で表現できるため、計算式で表すことができる。我々は過去の実験結果をもとに、各膜上の輸送分子を回路で示し、有毛細胞を電球、内リンパ液電位を電池、K^+循環を電流とみなした、血管条の K^+輸送と蝸牛の K^+循環を再現した数理モデル「Nin-Hihibo-Kurachi model (NHK model)」を構築し、動脈経由で阻害薬を投与した際の電位・K^+濃度動態の再現に成功した［3］。さらに、このモデルには外リンパ液経由でウアバインを投与した時の蝸牛側壁（線維細胞 : fibrocyte）の変化が再現できていなかったため、新たにこの部位を追加して、さらに多くの実験結果を再現できる「fibrocyte-integrating Nin-Hibino-Kurachi model (fi-NHK model)」を構築した［6］。

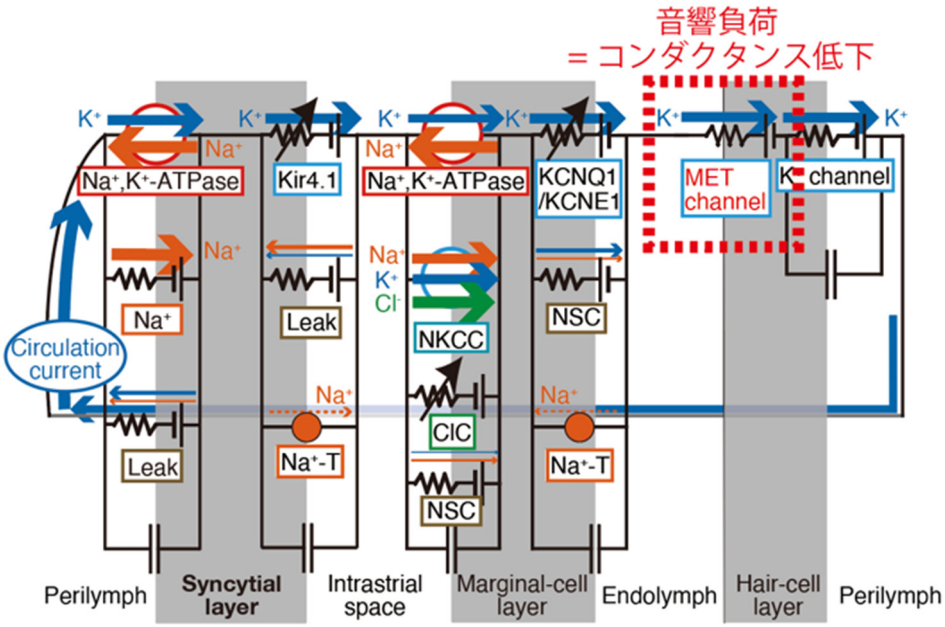


図 1. fi-NHK モデルの等価回路図

左から外リンパ（Perilymph）、線維細胞（Syncytial layer）、血管条細胞外（Intrastrial space）、辺縁細胞（Marginal-cell layer）、内リンパ（Endolymph）、有毛細胞（Hair-cell layer）、外リンパを示し、両端の外リンパは互いに交通している。音響外傷を再現するため、各コンパートメントに接して発現するイオン輸送体のパラメータには変化を加えず、一方で有毛細胞の頂上膜にある機械・電気変換チャネル（MET channel）のコンダクタンスは 5 倍に上昇させた。

音響外傷時におこる蝸牛内の電位・イオン濃度変化を予測するため、この fi-NHK model 内のパラメータを変化させた（図 2）。音響外傷では、主に有毛細胞が障害され、その結果難聴が惹起されることが知られている［7］。そこで、有毛細胞膜において機械電気変換チャネル Mechano-electrical transduction channel (MET channel)のコンダクタンスを 5 倍に大きく設定（過電流が流れる）することで、疾患の再現を試みた。

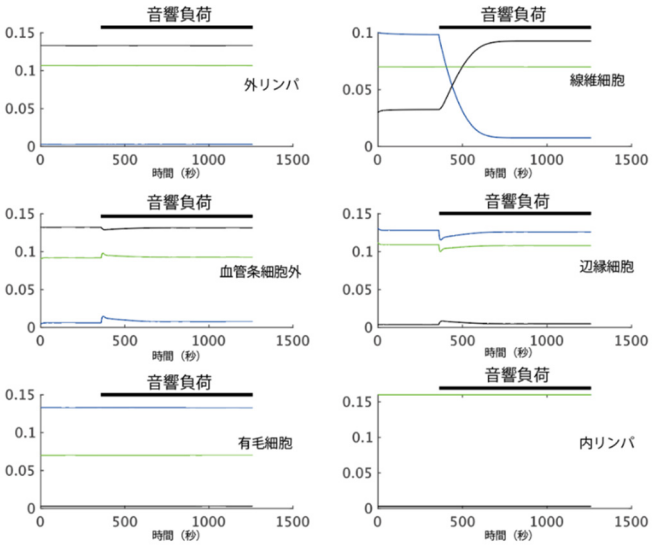


図 2. fi-NHK モデルを用いた蝸牛内の各コンパートメントのイオン濃度のシミュレーション

黒、青、緑色に線は、それぞれ K^+、Na^+、Cl^-濃度を示す。黒四角の領域は、音響負荷をかけた時間。

正常状態と疾患状態（音響障害）における蝸牛内の各コンパートメントの K^+、Na^+、Cl^-濃度の計算結果を図 2 に示す。コンパートメントとしては、内・外リンパ液、線維細胞、血管条細胞外、辺縁細胞、有毛細胞の 6 箇所とした。内・外リンパ液、有毛細胞の疾患状態では、各種イオン濃度にほとんど変化を認めなかった。一方、血管条細胞外と辺縁細胞では、負荷直後に一過性にイオン濃度の変化を認めたが、疾患状態にも関わらず時間の経過とともに元の濃度へと戻った。一番大きな変化を認めたのは、線維細胞であった。ここでは、K^+濃度が顕著に減少し、Na^+濃度は上昇した。Cl^-濃度には変化はなかった。この時の、内リンパ液電位および血管条細胞外電位をみると（図 3）、正常状態では＋80～90 mV 程度あった電位は、負荷とともに 50 mV 程度の急激な減少を認め、緩やかな減少へと変化した後、最終的に－30～40 mV 程度の負の電位を示すに至った。

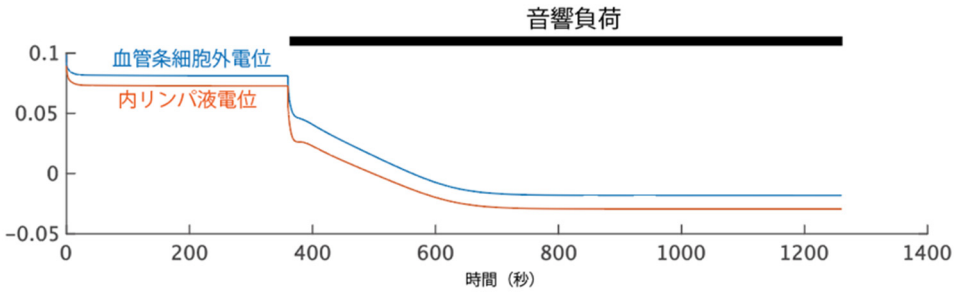


図 3. fi-NHK モデルを用いた蝸牛内の内リンパと血管条細胞外空間のシミュレーション

音響負荷以前は＋80～90 mV あった電位は、両者とも音響負荷後に負の電位まで低下を示した。

2. 電気生理実験

電気生理実験としては、計画では K^+イオン電極法を用いた、K^+濃度と電位の計測を予定していた。しかし、イオン電極作製に必要なドラフトの準備（電極内シラン化に必要な工程）ができず、また、電極によって測定された電位を持続的に保存する PC、およびデジタイザーが、半導体不足による影響から購入できず、計画に半年以上の遅れが生じた。そのため、本報告では、K^+濃度と電位の計測のために準備した実験装置と、これを用いて行った予備実験結果について、結果を記載する。

まず、微小ガラス微小電極の作製に必要なプラーを購入し、ピペット作製に必要な設定を確認した。さらに、PC を

購入した上で、PC にデジタイザーを挿入し、測定した電位データを持続的に保存できるプログラムを LabVIEW にて独自に作成した（図 4）。

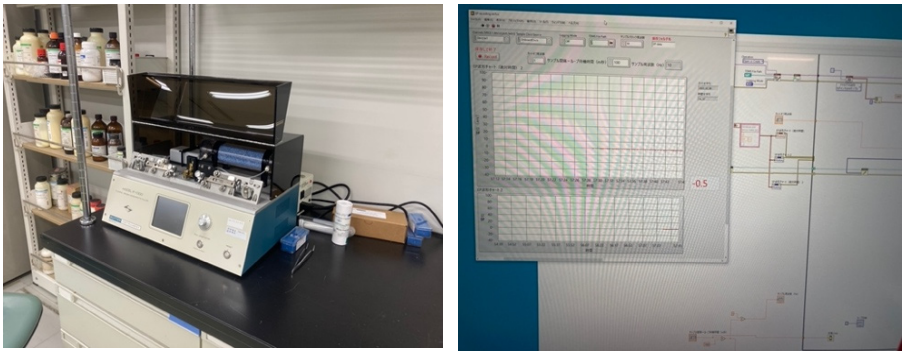


図 4. ピペットプラー（左）と自作の電位計測プログラム（右）
プラーにてガラス微小電極を作製し、解析用プログラムは LabVIEW にて作成した。

以上の実験装置を使って、内リンパ液高電位の測定を行った。この測定では、単管のガラス微小電極を作製し、モルモットに全身麻酔をかけた上で手術によって蝸牛を露出し、正円窓経由で内リンパへと電極を刺入した。以下に電極の刺入から内リンパに至るまでの電位変化を図 5 に示す。

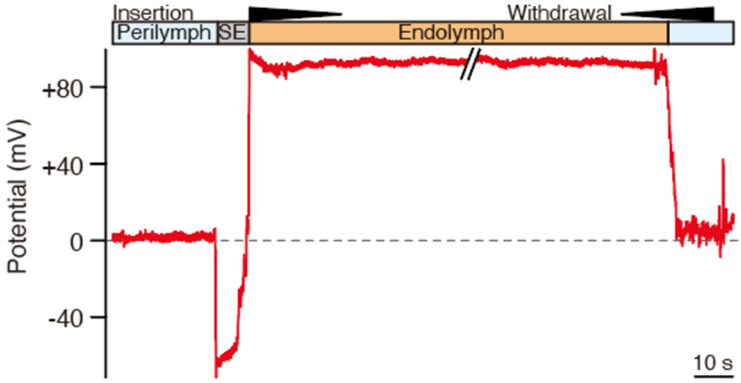


図 5. ガラス微小電極による内リンパ液高電位の測定。縦軸は電位、横軸は時間である
外リンパ液内を基準として電極を刺入すると、一過性の電位低下を認めた後、＋80 mV の高い電位を測定できた。その後、電極を引き抜いて外リンパへ達すると、電位は再び 0 mV 付近を示した。

正円窓から刺入されたガラス微小電極は、まず外リンパ（Perilymph）へと到達する。この場所を基準として電位を校正した上で、電極を内リンパへと押し進めると、一過性に－50～60 mV の電位を計測した。ここは、有毛細胞を含む感覚上皮帯層であると考えられた。その後さらに刺入を進めると、＋80 mV を超える電位変化を認め、内リンパ電位を確認できた。しばらくこの状態を維持した後、今度は電極を引き抜いていくと、再び電極は外リンパに達し、0 mV 付近の電位を示した。

今回の助成期間では、当初予定していたコンピュータ・シミュレーションを実行できた一方で、この予測の検証実験は、実験装置開発の遅れから実行できなかった。しかし、現段階で内リンパ液電位の測定まで成功しており、今後は過去に経験のあるイオン電極を作製した上で、購入した微動マニピュレータを活用して、当初計画していた蝸牛側壁の電位環境の測定、さらには既に装置を作製済みのスピーカーから音響負荷を与える予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岐阜大学大学院医学系研究科生理学分野の安部力、堀井和広、森元伊織、小川博史、長瀬典子である。

文　献

1） Nin F, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. The endocochlear potential depends on two K^+ diffusion potentials and an electrical barrier in the stria vascularis of the inner ear. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(5):1751-1756. doi: 10.1073/pnas.0711463105.

2） Adachi N, Yoshida T, Nin F, Ogata G, Yamaguchi S, Suzuki T, Komune S, Hisa Y, Hibino H, Kurachi Y. The mechanism underlying maintenance of the endocochlear potential by the K^+ transport system in fibrocytes of the inner ear. J Physiol. 2013;591(18):4459-72. doi: 10.1113/jphysiol.2013.258046.

3） Nin F, Hibino H, Murakami S, Suzuki T, Hisa Y, Kurachi Y. Computational model of a circulation current that controls electrochemical properties in the mammalian cochlea. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(23): 9191-9196. doi: 10.1073/pnas.1120067109.

4） Yoshida T, Nin F, Ogata G, Uetsuka S, Kitahara T, Inohara H, Akazawa K, Komune S, Kurachi Y, Hibino H. NKCCs in the fibrocytes of the spiral ligament are silent on the unidirectional K^+ transport that controls the electrochemical properties in the mammalian cochlea. Pflugers Arch. 2015;467(7):1577-89. doi: 10.1007/s00424-014-1597-9.

5） Zhang Q, Ota T, Yoshida T, Ino D, Sato P M, Doi K, Horii A, Nin F*, Hibino H*. Electrochemical properties of the non-excitable tissue stria vascularis of the mammalian cochlea are sensitive to sounds. J Physiol 2021;599(19):4497-4516. doi: 10.1113/JP281981.

6） Nin F, Yoshida T, Murakami S, Ogata G, Uetsuka S, Choi S, Doi K, Sawamura S, Inohara H, Komune S, Kurachi Y, Hibino H. Computer modeling defines the system driving a current crucial for homeostasis in the mammalian cochlea by integrating unique ion transports. npj Syst Biol Appl 2017;25;3:24. Doi: 10.1038/s41540-017-0025-0

7） Liberman MC. Noise-induced and age-related hearing loss: new perspectives and potential therapies. F1000Res 2022;6:927. doi: 10.12688/f1000research.11310.1.