

内耳を満たす特殊体液の電位環境の成立機序

日比野 浩

新潟大学 医学部第二生理学

The Mechanism Underlying the Electrical Property of Cochlear Endolymph in the Inner Ear

Hiroshi HIBINO

Department of Physiology II, Niigata University School of Medicine

要 旨

聴覚は動物に必須である。音は、外・中耳を介して内耳蝸牛に到達し、基底膜の振動として受容される。この機械的な刺激は、聴覚の一次受容器である有毛細胞により電気信号に変換され、脳へと伝達される。その際に、蝸牛は、内リンパ液と呼ばれる細胞外液の特殊な電位・イオン環境を用いて、効率的かつ感受性高く有毛細胞を興奮させる。従って内リンパ液環境は、内耳機能に不可欠である。本稿では、高度に分化した基底膜と有毛細胞の機能を概略した後、筆者の研究主題である内リンパ液環境の生理的役割と成立機構を紹介し、内耳聴覚研究の面白さを示す。

キーワード：聴覚 (hearing), 蝸牛 (cochlea), カリウム輸送 (K^+ transport), 上皮 (epithelia)

はじめに

聴覚は動物に必須の感覚である。その末梢受容器である内耳蝸牛は、音を鋭敏に受容するため、極めてユニークに分化している。本稿では、最初に、音シグナルが内耳蝸牛でどのように処理されるかを概説する。その後、蝸牛を満たす不思議な液体「内リンパ液」についての筆者の主な研究成果を紹介する。少々難解であるので、具体的な実験結果を示しながら説明する。内耳に少しでも興味を持って頂けたら幸いである。

音シグナルの端緒 — 基底膜と有毛細胞

音が外耳・中耳を伝わり、内耳蝸牛に到達すると、まず、基底膜が振動し(図 1A, 1B)、その上にある有毛細胞が刺激される(図 1A, 1C)。基底膜の長さは、ヒトでは 33 mm である。特定の周波数の音が蝸牛に入力された場合、基底膜は音に反応して一様に全体が上下動するわけではない。実際には、音は基底膜上を基底部(鼓膜側)から頂上部へと伝わり、しかもある程度進んだ所で急に振幅が大きくなり、そして直ぐに消失する(図 1B)。この「進行波」は、海岸に白波を立てて打

Reprint requests to: Hiroshi HIBINO
Department of Physiology II
Niigata University School of Medicine
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学 医学部 第二生理学 日比野 浩

ち寄せたあと、砂浜上では即座に消える海の波をイメージすると理解し易い。我々が聴く音は、色々な周波数の音波が混じっている。基底膜は頂上部へ行く程、軟らかく且つ幅広くなっており、より低周波、即ち低音の音を受容して振動するようになっている(図1B)。従って、音は周波数別に基底膜の特定の部位で分析され、その上に分布する有毛細胞が刺激される。

蝸牛の有毛細胞は、音の一次受容器であり、頂上膜に感覚毛を持つ(図1C)。感覚毛は、内リンパ液という細胞外液に触れている(図1A, 1C)。この液体は、150mMのカリウムイオン(K^+)を含み、血液や通常の細胞外液と同じイオン組成をもつ蝸牛の外リンパ液を基準とすると+80mVの高電位を示す(図1C)¹⁾。基底膜運動により、有毛細胞の感覚毛は屈曲する。その結果、感覚毛の頂部に局在する機械感受性チャンネルが開口し、内リンパ液の K^+ が有毛細胞へ流入することで、細胞は電気興奮する(図1C)。これが音伝達の端緒となり、音は電気信号として幾つかの過程を経た後、神経線維を脳へと伝わる。有毛細胞の細胞体は、低 K^+ 濃度の外リンパ液に浸されており、静止時の電位は-60mVである(図1C)。有毛細胞が微小の音、即ち、僅かな感覚毛の屈曲にも敏感に反応するには、感覚毛のチャンネルを介した K^+ 流入の駆動力を増大し、それを加速させる必要がある。この手段として、 K^+ 濃度は有毛細胞内—内リンパ液間でほぼ等しいため、 K^+ 濃度勾配を用いることはできない。代わりに、内リンパ液の高電位が有毛細胞との間に差し引き140mVもの大きな電位差を作り、いわば「生体電池」として K^+ 流入を加速させ、音シグナルを増幅している(図1C)。これは、動物が微小音を聞くことのできる一つの理由である。

内リンパ液の高電位

上記から明らかなように、内リンパ液の高電位は聴覚に必須であり、この破綻で難聴が惹起される。筆者は、この成立機構の解明を目的に、現在まで研究を行ってきた。以前より、内リンパ液高

電位の成立は、蝸牛側壁の組織である「血管条」が駆動する外リンパ液—内リンパ液間の K^+ 循環に立脚すると考えられてきた(図1A)。血管条は、内・外2層の上皮層と、その間を走る多数の血管から構成される(図1D)。組織学的検討や、阻害薬の内耳投与下での電気生理実験から、各層の基底側には、 $Na^+, K^+ - ATPase \cdot Na^+, K^+, 2Cl^-$ 共輸送体の K^+ 取込み体が、頂上側には K^+ チャンネル(外層： $Kir4.1$ 、内層： I_{KS})が分布していることが明らかになり(図1D)^{2)–4)}、内リンパ液環境の維持に不可欠であると考えられるようになった。しかし、そのメカニズムの詳細は、長年、謎であった。

血管条の特徴と内リンパ液高電位の成立機構の仮説

血管条の解剖学的特徴として、①内層・外層・血管内皮細胞はタイトジャンクションという防御バリアで繋がれ、これが血管条内部を内・外リンパ液と血液から物理的に隔離している、②内層の基底膜と外層の頂上膜はひだ状で互いに絡み合い、それらに挟まれた血管条細胞外空間(IS: Intrastrial Space)の間隔は15nmと狭い、という点が挙げられる(図1D)⁴⁾。ISを満たす溶液は、通常の細胞外液と同じく5mM程度の低 K^+ 濃度を有するが、内リンパ液の電位と同程度の高電位を示す(図1D)⁵⁾⁶⁾。この電位はIntrastrial Potential: IS電位と呼ばれ、内リンパ液高電位の維持における重要性が考えられていた⁵⁾。また、 K^+ チャンネル阻害薬を蝸牛の血管に投与すると、内リンパ液の高電位が大きく低下するため、IS電位及び内リンパ液高電位の維持には、血管条の血管に面している K^+ チャンネル $Kir4.1$ が深く関わり示唆されてきた(図1D)。しかしこれらの仮説は、狭いISに電極を留置する実験が困難なため、実証されてこなかった。

K^+ 拡散電位とは

ここで内リンパ液高電位の成立過程を理解する

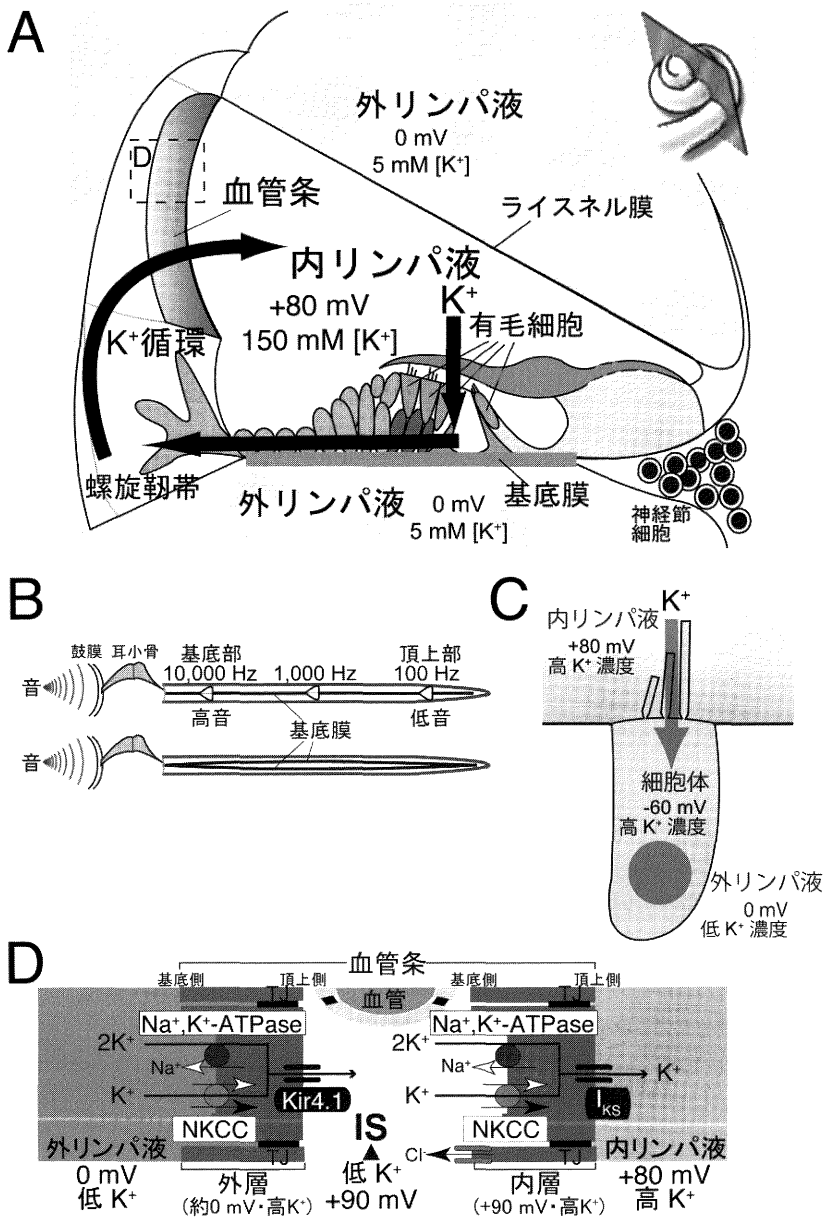


図1 内耳蝸牛の基本構造と機能

- A, 内耳蝸牛の構造 蝸牛を縦切り（右上図）にした断面図を示す。
 - B, 基底膜の運動 音が蝸牛に入ると、基底膜は下段のように全体が一様に振動するのではなく、上段のように頂上部は低音（低周波）に、基底部は高音（高周波）に反応する。
 - C, 有毛細胞 感覚毛を有する頂上膜は内リンパ液に、細胞体は外リンパ液に接する。感覚毛が音刺激により屈曲すると、細胞へ K^+ が流入する。
 - D, 血管条の構造 K^+ 循環・内リンパ液高電位の維持に関わる血管条の輸送分子も示す。NKCC: $Na^+, K^+, 2Cl^-$ 共輸送体, TJ: タイトジャンクション
- A, D は文献 (13) から改変

ために、「K⁺拡散電位」という概念が必要となる。今、図2Aに示す如く、空間Aには高濃度のK⁺が、空間Bには低濃度のK⁺が入っていると仮定する。AとBが何の変哲もない膜で仕切られているときは、何も起こらない(図2A上段)。しかし、膜がK⁺を選択的に透過させる孔を有する場合は(図2A下段)、K⁺はAからBへと濃度勾配に従って移動する。陽電荷が移るので、Aの膜直下が相対的に負電荷を帯び、膜を介した電位差が生ずる。濃度勾配に依存してK⁺は引き続き移動しようとするが、同時に、膜を介して相対的にA側が負電位となっているため、これが陽電荷であるK⁺の移動を妨げようとする。K⁺濃度勾配による移動力と、この電位差による反発力が釣り合ったとき、K⁺は移動しなくなる。この時の膜の電位、若しくは電位差を、「K⁺平衡電位」または「K⁺拡散電位」と称し、その大きさは、AとBのK⁺濃度差に依存する。以下、「K⁺拡散電位」と呼ぶ。この電位E_Kは、次の式で表される。

$$E_K = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{[K^+]_A}{[K^+]_B} \right) \text{-----(a)}$$

Fはファラデー定数、Rはガス定数、Tは温度、[K⁺]_Aと[K⁺]_Bは空間AとBのK⁺濃度である。膜のK⁺選択的な孔が、生体細胞においては、K⁺チャンネル、つまりK⁺を選択的に通す蛋白質に相当し、実験系ではK⁺のみを透過させる油成分を先端に有したK⁺選択的イオン電極となる。また、この概念は、全てのイオンに当てはまる。臨床で日常茶飯事に見る血中の電解質データも、溶液のpHも、この拡散電位を測定することにより、逆算して求められる。

K⁺取込み輸送体阻害下におけるISと 内リンパ液の環境変化

筆者らは、内リンパ液高電位の成立機構を理解するため、K⁺選択的イオン電極(K⁺電極)をモルモット血管条の細胞内外の各微小区域に挿入して、その環境を検討した。この電極は、二連管となっており、K⁺濃度・電位が一本で測定可能である。同時に通常の一連管電極で内リンパ液の電

位変化も観察した⁷⁾。

図2Ba上段は、K⁺電極を外リンパ液から血管条・内リンパ液(図1D)へと進めた際の、電位(黒)とK⁺濃度(灰色)の変化を示し、下段は、別の電極で内リンパ液の電位を経時的に観察したものである。濃度は、活量という単位で表しているため、一般的な濃度より低く示される。また、血管条に薬剤を投与するため、血管条毛細血管の源流である椎骨動脈にカテーテルを留置した。外リンパ液(0 mV・低K⁺)よりK⁺電極を進めると、最初にK⁺濃度が65~85 mMと高く、電位が+2~3 mVと軽度正の値を示す地点(黒矢印)を見出した(図2Ba上段)。解剖学的に、これは外層の内部を観察していると考えられた(図1D)。更に電極を進めると、電位が+70 mVと高く、K⁺濃度が4 mMと低いISを認めた(白矢印)。電極を留置して、無酸素負荷により血管条内層のNa⁺,K⁺-ATPaseを阻害したところ、IS電位は+70 mVから+22 mVへと下降して3 mVだけ上昇し、K⁺濃度は4 mMから28 mMへと上昇して2 mMのみ下降する、二層性変化を認めた(図2Ba上段の点線四角と図2Bb)。同時に内リンパ液電位は-14 mVの負値まで下降し(図2Ba下段)、正の値で留まったIS電位との差が認められた(白矢頭)。無酸素を解除すると、ISの電位とK⁺濃度、内リンパ液電位の値は、全て元に戻った。また、外層の電位とK⁺濃度は、無酸素負荷によって殆ど影響されないことを見出した(データ示さず)。

これらの結果、特に無酸素負荷時のISの電位とK⁺濃度の鏡像反応は、外層頂上膜のK⁺チャンネルKir4.1を介して発生するK⁺拡散電位がIS電位の主要素であることを示唆する。よって、IS電位は以下の式で求められると予想できる。

$$ISP = V_{Outer} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{\alpha K^+_{i(Outer)}}{\alpha K^+_{IS}} \right) \text{-----(b)}$$

ISPはIS電位、V_{Outer}は外層の電位、αK⁺_{i(Outer)}とαK⁺_{IS}は外層内とISのK⁺濃度(活量)である。V_{Outer}とαK⁺_{i(Outer)}は常に一定であるので、図2Ba上段の実測値(黒矢印)を代入した。更に(b)の式へ、無酸素時におけるISのK⁺濃度変化の実測値(図2Ba上段点線四角と図2Bb下段)

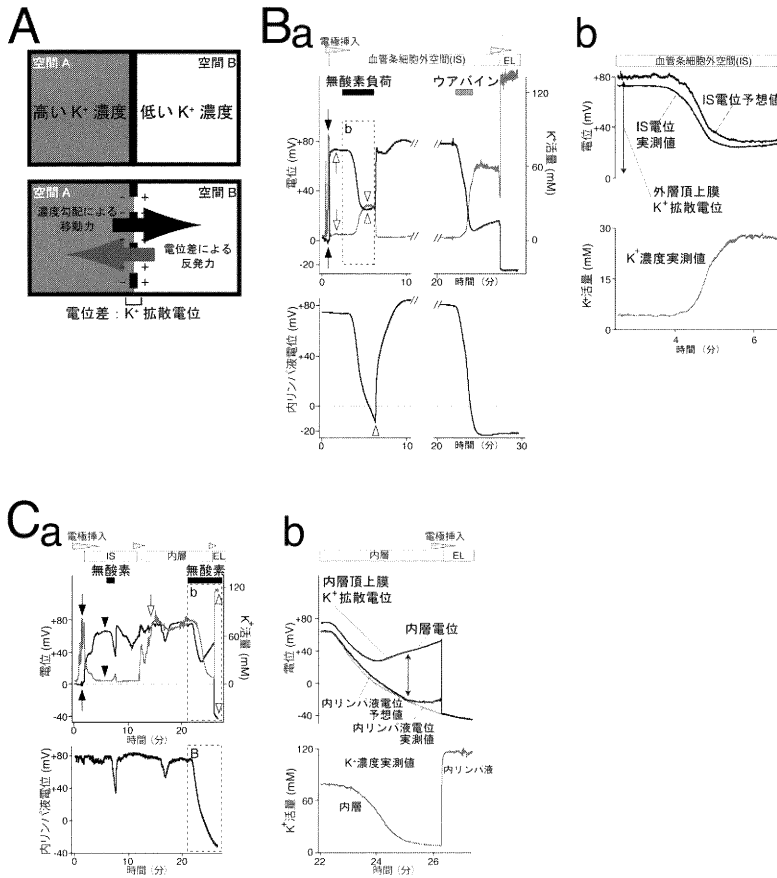


図2 内リンパ液高電位の成立機構

- A, K⁺ 拡散電位の発生 空間Aには高濃度のK⁺が、空間Bには低濃度のK⁺が入っていると仮定する(上段)。両空間を仕切っている膜がK⁺を選択的に透過させる場合(下段)、陽電荷であるK⁺はAからBへと濃度勾配に従って移動する。すると、膜を介してAの方がBより低電位となる。この電位差、つまりK⁺の移動を妨げる反発力が、濃度勾配に依存したK⁺の移動力と釣り合ったとき、K⁺は移動しなくなる。この時の膜の電位、もしくは膜を介した電位差を、「K⁺拡散電位」と称し、その大きさは、AとBのK⁺濃度差に依存する。
- B, Na⁺,K⁺-ATPase 阻害の効果
- (a) 黒線は電位を、灰色線はK⁺濃度(活量)の変化を示す。無酸素負荷及びウアバインの還流で内層のNa⁺,K⁺-ATPaseを阻害した。上段: K⁺電極による血管条の各区分のK⁺濃度と電位の測定。下段: 別電極による内リンパ液電位の経時変化。
 - (b) 無酸素下でのISのK⁺濃度の変化(下段; aの点線四角内のデータ)からIS電位の予想値を求め、その実測値(下段; a点線四角内の黒線と同じ)と比較した。EL; 内リンパ液
- C, 内層の解析
- (a) 上段: K⁺電極による測定。外層(黒矢印)、IS(黒矢頭)を通過後、高電位・高K⁺を示す内層内部(白矢印)に到達。無酸素負荷の後、内リンパ液へ挿入した。下段: 内リンパ液電位の変化。
 - (b) 無酸素による内層K⁺濃度の実測値(下段; aの点線四角内の灰色線と同じ)と内リンパ液K⁺濃度の実測値(aの上段白矢頭; 一定値)から内層頂上膜のK⁺拡散電位を求め、内層の電位の実測値との和を内リンパ液電位の予想値(上段黒線)として示した。更に内リンパ液電位の変化の実測値(上段灰色線; a下段点線四角内の内リンパ液電位の変化値と同じ)を重ねた。EL; 内リンパ液
- B, Cは文献(7)から改変

を代入して、IS電位の変化の予想値を求め、IS電位の実測値と比較した(図2Bb上段)。両者はよく一致した。よって、IS電位は主に外層のKir4.1を介したK⁺拡散電位により成立することが示された。Na⁺,K⁺,2Cl⁻共輸送体の阻害薬であるブメタニドも、無酸素負荷と同じ効果を呈した(データ示さず)。

EP成立における辺縁細胞の役割

図2Baの無酸素負荷時に認められたIS電位と内リンパ液電位との差(白矢頭)から、内リンパ液電位の成立にはIS電位以外の要素が必要であると予想された。無酸素解除後、引き続きK⁺電極をISに留め、Na⁺,K⁺-ATPase阻害薬のウアバインを血管灌流した(図2Ba上段)。無酸素時と同様に、IS電位の低下と軽度回復、ISのK⁺濃度の上昇と軽度回復という二層性変化を認めた。また、IS電位が負値を示さなかったのに対し、内リンパ液電位は約-20 mVまで低下した。更にK⁺電極をISから内リンパ液へ進めると、K⁺濃度は100 mM以上に上昇すると共に、電位は大きく低下し、別電極で測定されている内リンパ液電位の値とほぼ同じとなった。故に、IS電位と内リンパ液電位の差は、内層で生じていることが判明した。

次に、この電位差が内層のどの部分で起こるかを検討した。電極を外リンパ液から進めていくと(図2Ca上段)、僅かに正電位かつ高K⁺濃度を示す外層(黒矢印)、高電位かつ低K⁺濃度を示すIS(黒矢頭)を認めた。更にK⁺電極を進めると、高電位のままでK⁺濃度が急に約80 mMと高くなる点を見出した(白矢印)。内リンパ液のK⁺濃度は100 mM以上であるため(図2Ba上段)、この場所は内層の内部であると考えられた(図1D)。電極を留置し、無酸素を負荷したところ、電位は+74 mVから+27 mVへ大きく下降した後、+52 mVへ回復したが、K⁺濃度はS字状に低下した(図2Ca上段の点線四角内)。この内層の電位変化は、無酸素時・ウアバイン投与時のIS電位の二層性変化に類似している(図2Ba)。一方、内リンパ液の電位は低下し続け、-40 mVを示した(図2Ca下段の点線四角内)。更にK⁺電極を内層

内から内リンパ液へと進めると、K⁺濃度は約100 mMへ上昇し、電位は大きく下降して内リンパ液電位とほぼ同じ負値を示した(図2Ca上段の白矢頭)。従って、図2Baで観察されたIS電位と内リンパ液電位の差は、内層の頂上膜で生じていたことになる。

内層の基底側にはK⁺チャンネルが実験的に認められないことが報告されているが⁸⁾、頂上膜にはK⁺チャンネルI_{K5}が分布する(図1D)。故に、内リンパ液のK⁺濃度は変わらないので⁹⁾、図2Ca上段の如く内層内部のK⁺濃度が低下すると、膜を介した濃度勾配が大きくなる。その結果、内層頂上膜におけるK⁺拡散電位が増大し、内リンパ液電位と内層との電位差が拡大する。従って、内リンパ液の電位は内層の電位と頂上膜のK⁺拡散電位の和として以下のように計算できる。

$$EP = V_{inner} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{(Inner)}}{aK^+_{EL}} \right) \text{---(C)}$$

EPは内リンパ液の電位、 $V_{inner} \cdot aK^+_{(Inner)}$ はそれぞれ内層の電位・K⁺濃度である。内リンパ液のK⁺濃度(aK^+_{EL})は無酸素負荷により変化しないため⁹⁾、一定であり、図2Ca上段の実験の場合には白矢頭の値となる。(C)式へ、無酸素時の内層の電位・K⁺濃度変化の実測値(図2Ca上段の点線四角内)を代入し、内リンパ液電位の予想値を求めた(図2Cb上段)。これは、内リンパ液電位の変化の実測値(図2Ca下段の点線四角内)と図2Cb上段の灰色線とよく合致した。従って、無酸素負荷時に拡大する内層頂上膜を介した電位差は、主にI_{K5}チャンネルが発生するK⁺拡散電位によることが明らかとなった。

総括

以上より、内リンパ液高電位の主な起源がIS電位であること、またこの電位は、K⁺チャンネルKir4.1が発生するK⁺拡散電位であることを示し(図2B)、従来の仮説⁵⁾をはじめて実証した。この拡散電位を生むISの低いK⁺濃度は、内層のK⁺取込み輸送体を介したK⁺の一方方向性輸送(ISから内層・内リンパ液方向へ)により維持されるこ

とも強く示唆される (図 1D, 2B). また, 高い IS 電位は, タイトジャンクションによって IS が隣接する細胞外液から電氣的にバリアされていることにより保たれると考えられる (図 1D).

また, 内層の頂上膜を介した K^+ 拡散も内リンパ液の電位に深く関わることを見出した (図 2C). 内層の $Na^+, K^+ - ATPase$ を阻害した際に, IS 電位と内リンパ液の電位の間に差が見られた (図 2Ba). これは, 内層内の K^+ 濃度の低下によって拡大する内層頂上膜の K^+ 拡散電位により説明できた (図 2C). また内層の基底側には K^+ チャネルが殆どないため (図 1D)⁸⁾, 内層の電位は IS の K^+ 濃度変化の影響を受けず, ほぼ IS 電位と同値と考えられる. 事実, 無酸素負荷時の内層の二層性電位変化パターンは, IS のそれに類似している (図 2B, 2C). よって, 内リンパ液電位 (EP) は, (b) と (c) より以下の式で求められる.

$$EP = V_{Outer} + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{(Outer)}}{aK^+_{IS}} \right) + \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{aK^+_{(Inner)}}{aK^+_{EL}} \right) \text{-----(d)}$$

即ち, 内リンパ液高電位は, 血管条の 2 つの K^+ チャネルが発生する拡散電位により成立する.

今後の抱負

内リンパ液高電位の最初の測定から¹⁾ 半世紀以上が経過するが, 本研究により, その成立機構は定性的にほぼ理解できたと考えられる. しかし K^+ 循環と高電位の協関は, 十分に解明されていない. 高電位の種々の条件下での制御には, 更に未知の分子も関わる可能性もある. また, 内リンパ液の高電位やイオン環境のみならず, 未だ生理的意義が明らかでない高粘性や, 同定されていない含有成分の解析を進め, それらの恒常性の破綻に立脚する疾患を探索し, 難聴に対する新しい治療法の開発などにも挑戦していきたい.

謝 辞

本研究にあたり, 直接ご指導頂きました大阪大学大学院医学系研究科分子細胞薬理学の倉智嘉久教授に, 厚く御礼申し上げます. また, 多大なご協力を頂いた, 京都府立医科大学耳鼻科の任書晃先生・鈴木敏弘先生・久

育男教授, 近畿大学医学部耳鼻科の土井勝美先生に感謝いたします. 最後に, 本稿を作成する機会を与えてくださった, 新潟大学医学部の味岡洋一教授, 河内裕教授, 編集部の先生方に深謝申し上げます.

文 献

- 1) von Békésy G: DC resting potentials inside the cochlear partition. *J Acoust Soc Am* 24: 72 - 76, 1952.
- 2) Marcus DC, Rokugo M and Thalmann R: Effects of barium and ion substitutions in artificial blood on endocochlear potential. *Hear Res* 17: 79 - 86, 1985.
- 3) Kusakari J, Ise I, Comegys TH, Thalmann I and Thalmann R: Effect of ethacrynic acid, furosemide, and ouabain upon the endolymphatic potential and upon high energy phosphates of the stria vascularis. *Laryngoscope* 88: 12 - 37, 1978.
- 4) Hibino H and Kurachi Y: Molecular and physiological bases of the K^+ circulation in the mammalian inner ear. *Physiology (Bethesda)* 21: 336 - 345, 2006.
- 5) Salt AN, Melichar I and Thalmann R: Mechanisms of endocochlear potential generation by stria vascularis. *Laryngoscope* 97: 984 - 991, 1987.
- 6) Ikeda K and Morizono T: Electrochemical profiles for monovalent ions in the stria vascularis: cellular model of ion transport mechanisms. *Hear Res* 39: 279 - 286, 1989.
- 7) Nin F, Hibino H, Doi K, Suzuki T, Hisa Y and 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 USA* 105: 1751 - 1756, 2008.
- 8) Takeuchi S, Ando M, Kozakura K, Saito H and Irimajiri A: Ion channels in basolateral membrane of marginal cells dissociated from gerbil stria vascularis. *Hear Res* 83: 89 - 100, 1995.
- 9) Melichar I and Syka J: Time course of anoxia-induced K^+ concentration changes in the cochlea measured with K^+ specific microelectrodes. *Pflugers Arch* 372: 207 - 213, 1977.