

蝸牛内カリウム循環電流が担う超音波聴覚の電気生理学的解明

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

概 要 難聴はヒトが聞くことのできる 20 kHz までの可聴域の音が聞こえなくなることを意味し、可聴域を超える超音波はイルカやコウモリなど限られた動物のみが聴取可能とされてきた。しかし実は、ヒトでも骨を介した(骨導)音刺激では、超音波を聴取できる(Pumphrey R. J., Nature 1950)。超音波聴覚と呼ばれるこの生理機能を活かした「骨導超音波補聴器」の応用が近年国内でも検討されている(Nakagawa S et al., Jpn Soc Med Biol Eng 2006)が、超音波聴覚のメカニズムは、その発見以来謎のままである。

本研究では、骨を介して蝸牛に至る超音波が蝸牛にある有毛細胞により受容されるという仮説を立て、有毛細胞を介した K^+ を電気生理学的に測定することで、これを証明する計画を立てた。音を受容する内耳蝸牛は、体液に含まれる塩類の K^+ によりシグナル伝達が行われる稀な臓器である。蝸牛では、音の機械的刺激により、内リンパ液に接する有毛細胞の感覚毛の陽イオンチャネル(MET チャネル)が大きく開口し、内リンパに豊富な K^+ が蝸牛内を循環することで細胞が電気興奮する。

我々は、この有毛細胞電流を観察する方法として「蝸電マイクロフォン電位(Cochlear microphonics: CM)」の測定を行った。その結果、非可聴領域の超音波に同期した CM が計測された。すなわち、蝸牛内に超音波を受容する有毛細胞が存在することが実証された。さらに、その応答の解析を進めると、CM 振幅は刺激音圧に対して非線形に増幅を受けていることが明らかとなった。この CM の応答が有毛細胞由来であることを検証するため、蝸牛にサリチル酸を投与してその変化を追跡したところ、薬物の投与に伴って、CM の応答は動物死後の応答と同等まで低下した。これらの成果は、超音波聴覚というこれまで謎とされたきた生理機能の根源的なシステムの解明に寄与する。また、その機能が蝸牛内の環境を反映する新たな指標として着目できることから、各種難聴病態の解明や予後予測に資する検査装置の開発などに活用されることが期待される。

1. 研究目的

1.1 研究の背景

難聴はヒトが聞くことのできる 20 kHz までの可聴域の音が聞こえなくなることを意味し、可聴域を超える超音波はイルカやコウモリなど限られた動物のみが聴取可能とされてきた。しかし実は、ヒトでも骨を介した(骨導)音刺激では、超音波を聴取できる(Pumphrey R. J., Nature 1950)。これを活かした「骨導超音波補聴器」の応用が近年国内でも検討されている(Nakagawa S et al., Jpn Soc Med Biol Eng

2006)。しかし、超音波がどのようなメカニズムで聴覚として受容されるのかは、その発見以来謎のままである。

1.2 研究目的

本計画では、過去に貴財団からの支援を基盤に展開してきた聴覚電気生理学研究を、超音波聴覚の起源解明を目的として展開する。聴覚の末梢器官である内耳蝸牛は、音刺激により一次受容細胞である「有毛細胞」にカリウムを主とする機械-電気変換電流「蝸牛カリウム循環電流」が流入することが、聴覚の発端となる(図1桃楕円)。

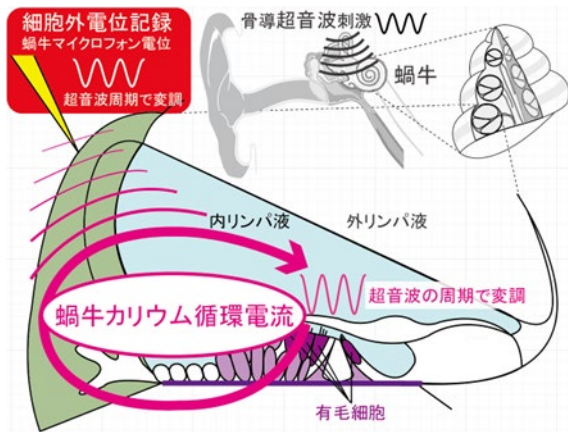


図1 内耳蝸牛のカリウム循環電流(循環矢印)と、細胞外電位記録(赤塗り)

入力音の周波数に一致して変化するこの電流は、細胞外電位記録「蝸牛マイクロフォン電位(Cochlear Microphonics: CM)」として蝸牛外から測定できる(図1左上)。そのため、蝸牛カリウム循環電流がCMとして観測されれば、蝸牛内に超音波を受容できる有毛細胞が備わっていることを実証できる。

【仮説】

- 1) 超音波聴覚は蝸牛が超音波を受容することを発端とする。
- 2) 超音波が惹起する蝸牛カリウム循環電流は、有毛細胞による生物学的増幅を受ける。

1.3 研究の意義

第一に、蝸牛では聴取できないと想定されてきた非可聴域の超音波が受容できることが実証されれば、その発見以来長きにわたって不明とされてきた超音波聴覚のメカニズムが、解き明かされることになり、蝸牛機能の理解が大きく書き換えられる成果となる。また、本邦で取り組まれている補聴器開発や耳鳴り治療にも大きな根拠と意義を付与できる。

蝸牛は、その精緻な機構ゆえに、難聴が起こった際でも手術や治療などで内部にアクセスすれば忽ち聾となる。そのため、機能を諦めて神経刺激電極を刺入する「人工内耳」手術以外では、蝸牛に直接接触することは許されない。超音波聴覚は、その機序の解明により蝸牛機能の一側面を観察していると捉えることができたため、蝸牛全体に影響

が及ぶ病態の診断や治療予後の判定に有用な蝸牛機能検査としての臨床応用が期待できる。臨床応用の可能性を支える研究基盤として、本計画の動物実験系は、ヒトでは介入しにくい難聴疾患(騒音性難聴や薬剤性難聴など)と超音波聴覚と関係解明に役立てることができる。

2. 研究方法

2.1 実験材料

電気生理学的手法として、生動物であるモルモットを用いた。局所麻酔にて動物に気管切開を施し、人工呼吸器に繋いだ。

2.2 聴性脳幹反応(Auditory brainstem response: ABR)の測定

モルモットの頭頂部と耳前部の2箇所針電極を留置し、これらを増幅機に繋げて計測を行なった。鼓膜と側頭骨の2箇所、すなわち、気導と骨導の2ルートから音刺激を行なった。音刺激は、立ち上がり、立ち下がり時間 0.5 ms, 純音持続時間 5 ms のトーンバースト波形を用いた。なお、この際、鼓膜へはスピーカー、耳小骨へは圧電素子とその先端に繋いだガラス管、側頭骨へは圧電素子とその先端に接着させたセラミックロッドから、それぞれ入力を行なった。増幅機からのデータは、コンピュータへと送り、自作の ABR 測定プログラムにて、500 回加算平均を行ない、III 波の振幅がノイズの振幅を超えたものを応答ありと判定した。

2.3 蝸牛マイクロフォン電位(蝸牛カリウム循環電流)の測定

モルモットの全身麻酔下に手術を行い、まず蝸牛を露出させた。その上で、測定電極を中耳内に、一方の基準電極を体部に留置した。両電極を増幅機に繋ぎ、ABR 同様に、気導と骨導の2ルートから音刺激を行なった。音刺激は、立ち上がり、立ち下がり時間 20 ms, 純音持続時間 200 ms のトーンバースト波形を用いた。増幅機からのデータは、コンピュータへで処理を行い、自作の CM 測定プログラムで 8 回加算平均を行ない、純音部の電位振幅の RMS 値を測定した。

2.4 有毛細胞機能を障害する薬物の投与方法

全身麻酔下に蝸牛を露出した際に、正円窓が明視下に確認できるように体位を調節し、正円窓膜上にサリチル酸溶液を滴下した。15 分間薬物が外リンパ液へ拡散するのを待ち、その後中耳内の溶液を吸い取った。

3. 研究結果

3.1 各種音刺激ルートから計測した ABR とその閾値

まず、超音波聴覚の有無をモルモットで検証するため、全身麻酔下の動物に可聴域・非可聴域の音刺激を、鼓膜を介した「気導入力」と骨を介した「骨導入力」の両者で行い、どの周波数において聴覚が成立するか否かを検証した。その結果、気導入力時には、従来モルモットの可聴域とされ～40 kHz までの音刺激に応答した ABR が認められたが、80 kHz ではその応答が消失した。一方で、骨導入力では、可聴域外である 80 kHz を超えて、201 kHz に至る周波数の超音波まで、ABR を認めた。以上から、モルモットでは超音波聴覚として、従来の可聴域上限よりも約4倍以上高い音まで聴取できることが確認できた(図 2)。

3.2 蝸牛マイクロフォン電位(蝸牛カリウム循環電流)の周波数応答と音圧依存性

次に、側頭骨を介して音刺激を与えた際の正円窓周囲での細胞外電位変動を測定した(図 3A)。103 kHz 85 dB の音を与えた際の細胞外電位の周波数分布を図 3B に示す。103 kHz, 206 kHz, 245.84 kHz の 3 箇所ピークが見られ、それぞれの波形と刺激入力の波形を比較すると、103 kHz, 206 kHz の波形は刺激時間と一致した刺激波形を確認したが、245.84 kHz ではその一致は見られなかった(図 3D)。したがって、245.84 kHz は測定環境からくる電気的なノイズと考えられた。ここで、刺激を 176 kHz 85 dB に変化させると、

103 kHz にあった信号のピークが 176 kHz へと変化した(図 3C)。この周波数の波形は、刺激周波数と同じ 176 kHz であったことから、蝸牛有毛細胞を流れる電流を反映する蝸牛マイクロフォン電位(Cochlear microphonics: CM)であると考えられた(図 3E)。すなわち、蝸牛内に超音波を受容できる有毛細胞が存在することが強く示唆された。

次に、CM 振幅と刺激音圧との関係を調べた(図 4)。過去の文献により、可聴音刺激では CM 振幅が音圧依存的に増加し、かつ、CM 振幅と音圧との関係は「非線形」の関係があることが知られている¹⁾。そこで、非可聴超音波刺激の CM 振幅と音圧の関係を調べると、80 kHz から 127 kHz の刺激では、可聴域刺激と同様「非線形性」を認めたが、152 kHz 以上の刺激ではその「非線形性」は殆ど認めなかった。また、生体由来の信号であることを実証するため、死後動物の CM 波形と比較を行うと、死後動物では CM の波形が大きく減弱した。

3.3 サリチル酸投与前後の蝸牛マイクロフォン電位(蝸牛カリウム循環電流)の変化

この非線形応答を示す CM 振幅が、有毛細胞、特に外有毛細胞を流れるカリウム電流であること示すため、外有毛細胞機能の一つである「細胞伸縮能」を阻害するサリチル酸を蝸牛に投与した(図 5)。CM は、サリチル酸投与により著明に減弱し、その振幅は、死後に計測した CM 振幅とほぼ同じであった。

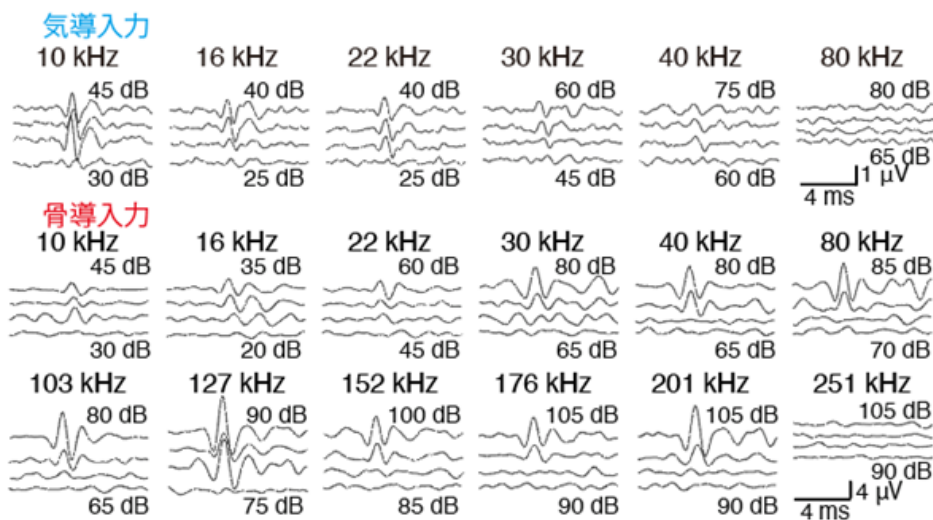


図 2 全身麻酔下のモルモットを用いた ABR 測定結果

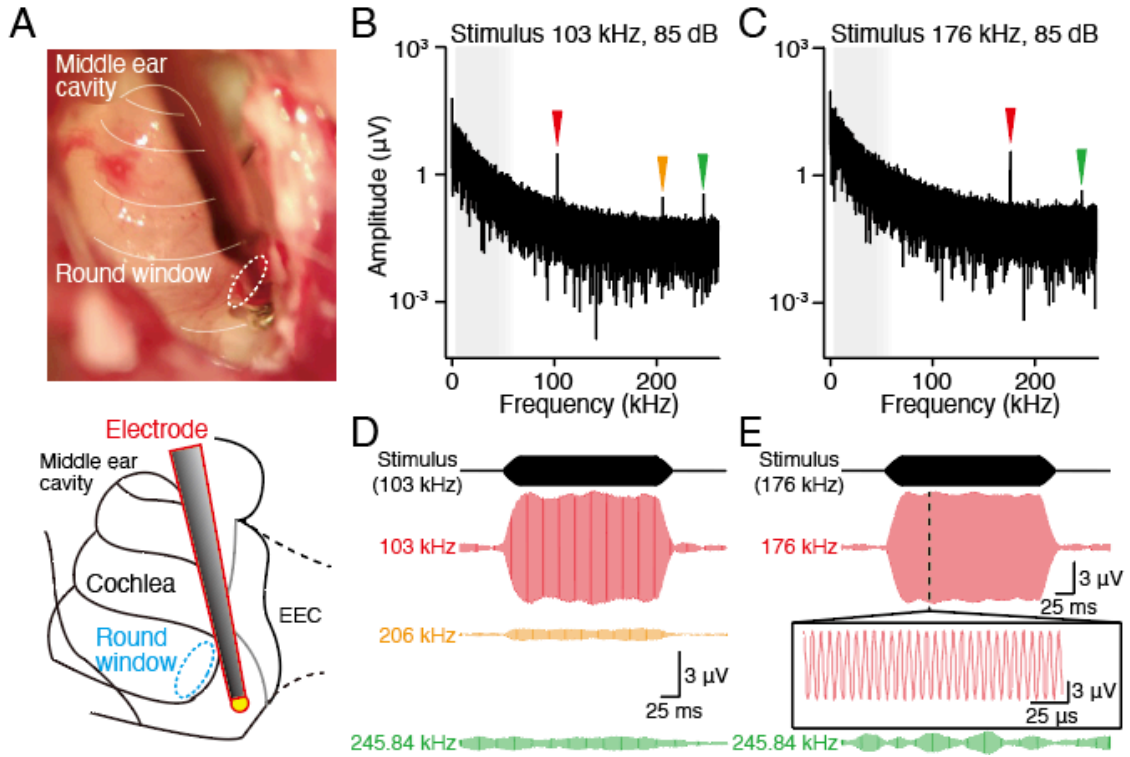


図3 全身麻酔下でのモルモットを用いた蝸牛マイクロフォン電位の測定。
 A: 電極挿入時の中耳内の写真。B, C: 細胞外電位の周波数別の強度。D, E: 各周波数の電位波形。

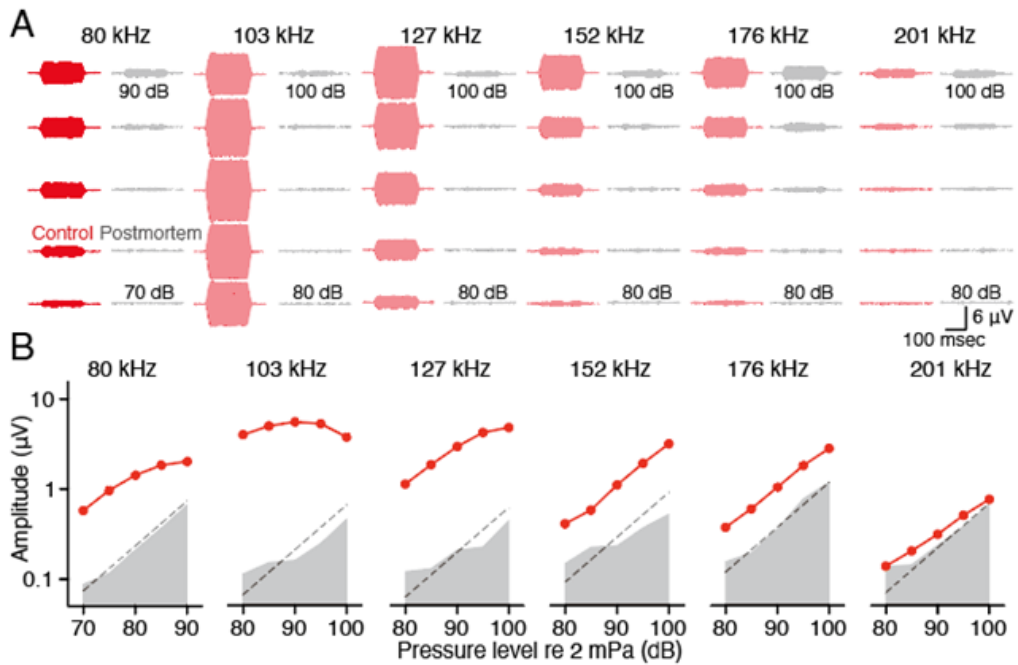


図4 蝸牛マイクロフォン電位(A)とその音圧依存性(B)。

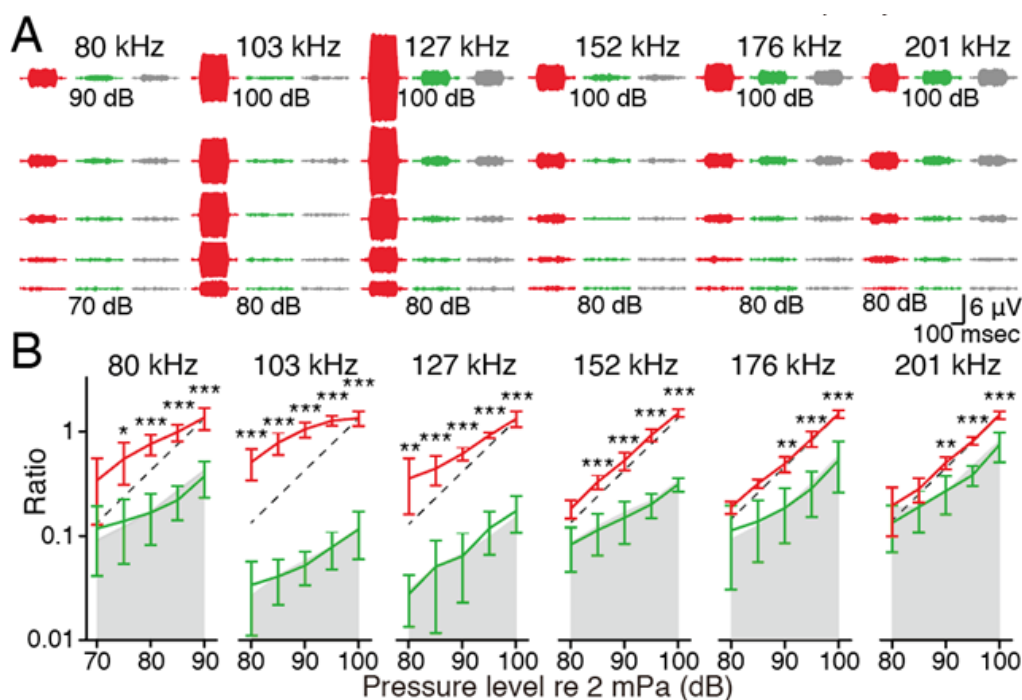


図5 サリチル酸投与後のCM波形の変化。

4. まとめ

我々は、有毛細胞電流を観察する方法として「蝸電マイクロフォン電位(Cochlear microphonics: CM)」の測定を行った。その結果、非可聴領域の超音波に同期したCMが計測された。すなわち、蝸牛内に超音波を受容する有毛細胞が存在することが実証された。

さらに、その応答の解析を進めると、CM振幅は刺激音圧に対して非線形に増幅を受けていることが明らかとなった。このCMの応答が有毛細胞由来であることを検証するため、蝸牛にサリチル酸を投与してその変化を追跡したところ、薬物の投与に伴って、CMの応答は動物死後の応答と同等まで低下した。

これらの成果は、超音波聴覚というこれまで謎とされたきた生理機能の根源的なシステムの解明に寄与する。また、その機能が蝸牛内の環境を反映する新たな指標として着目できることから、各種難聴病態の解明や予後予測に資する検査装置の開発などに活用されることが期待される。

5. 文献

- 1) Honrubia V, Ward P H. Longitudinal distribution of the cochlear microphonics inside the cochlear duct. J Acoust Soc Am. 44(4): 951-958, 1968.

Electrophysiological Study of Inaudible Ultrasonic Hearing Achieved by Cochlear K^+ -Circulation Current.

Fumiaki Nin

Division of Biological Principles, Department of Physiology, Gifu University

Summary

Although the hearing range of humans is under 20 kHz, we hear inaudible-ultrasound via bone conduction. However, details of its physiological mechanism are unknown. In this study, to investigate the possibility of ultrasound reception in the cochlea, we measured the local field potentials (LFP) evoked by sound and ultrasound stimulations. Under general anesthesia, we recorded the potentials from the temporal bone in guinea pigs. The stimulus waveform was 103 kHz 85 dB tone burst with a duration of 200 msec. 103 kHz is above the guinea pig's hearing range. We performed frequency analysis by fast Fourier transform on LFP. In the analysis, we observed three signal peaks: 103 kHz, 206 kHz, 245.84 kHz. Examining the relationship between these signals and stimuli in waveforms, only 103 kHz was synchronized with the stimulus. This synchronized LFP is likely the cochlear microphonics (CM), which reflects the excitation of the primary auditory receptor cells. Furthermore, as we increased the strength of the stimulus at 103 kHz, CM amplitude gradually increased. Its stimulus-potential relationship was 'nonlinear'; cochlear amplifies smaller sound more, and bigger sound less. Additionally, in comparison with the potential recorded under anoxia, CM was actively amplified. We finally measured CM at frequencies within the range from 80 to 201 kHz. At a frequency of 127 kHz or lower, CM exhibited significant nonlinearity and amplification. To the contrary, these features were lessened in more than 127 kHz, and disappeared at frequencies over 201 kHz.