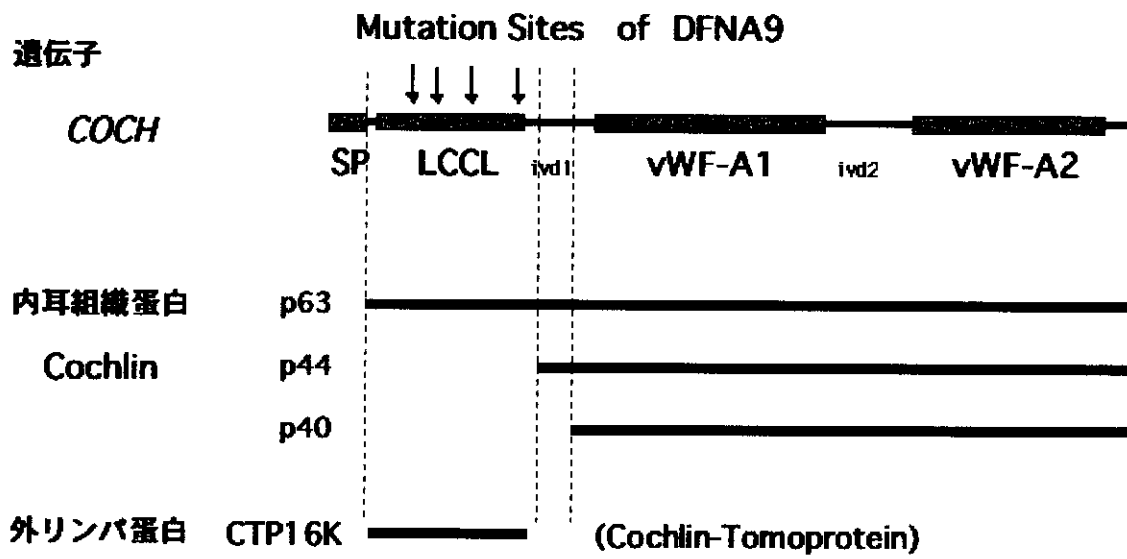


内耳と外リンパにおけるCochlinアイソフォーム



6. 内リンパ水腫例に対する GM 投与の長期成績

久保武, 堀井新, 北原紘, 宇野敦彦
(大阪大学耳鼻咽喉科)

[はじめに]

メニエール病のうちイソバイド等の保存的治療に抵抗性の難治症例に対する対処法として, 前庭神経切断術, 内リンパ嚢手術, ゲンタマイシン (GM) 鼓室内投与などが行われている¹⁾. これらのうち GM 鼓室内投与は最も簡便であるが, その長期成績についての報告は本邦ではいまだ少ない. そこで本研究では GM 鼓室内投与を行い観察期間が最低 1 年を経た 25 例につき, めまい頻度や聴力, 蝸電図, 血中バゾプレッシンの変化, 頭振後眼振(HSAN)の出現などについて検討した.

[対象と方法]

対象は 6 ヶ月間以上保存的治療に抵抗し日常生活に支障を来たしたメニエール病 21 例, 同側型遅発性内リンパ水腫 4 例で男性 9 例, 女性 16 例, 平均年齢 48.3 才であった. GM 処置後最低観察期間は 1 年で, 平均観察期間は 24.5 ヶ月であった. GM 投与は臥位で鼓膜切開後, 23G カテラン針で硫酸 GM(26.7-40mg/ml)を 0.2-0.4ml 鼓室内投与し 20 分間そのままの頭位を保ち, 嚥下禁止とする. 注入回数は 1 回 5 例, 2 回 2 例, 3 回 13 例, 4 回, 6 回, 9 回, 12 回, 15 回が 1 例ずつであった. めまいの判定にはめまい係数の算定²⁾, および大阪大学で開発しためまいふらつきのアンケート³⁾によった. 聴力の判定は GM 処置前 6 ヶ月の間の最悪および GM 処置後最新の平均聴力レベル(250-2000Hz の 4 分法)を検討した. CP に関しては CP%>20%で CP ありと判定した. グリセロールテストでは 10dB 以上の改善が 2 周波数以上で認められた場合陽性とした. 蝸電図は鼓室外誘導法で行い, 概ね-SP/AP>0.45 で陽性と判定した. HSAN は水平頭振を 20 回行い Frenzel 眼鏡下で判定した.

[結果と考察]

25 例中めまいコントロール不良で前庭神経切断術を行った例が 1 例あり, 対側も発症しコントロール不良で経過観察となった例が 1 例あった. これらコントロール不良例も含めた全 25 例の GM 処置前 6 ヶ月の月平均めまい発作回数は 2.4 回, GM 処置後最新観察時期 (平均 24.5 ヶ月) までの月平均めまい発作回数は 0.21 回で, めまい係数は 8.8 であった. 25 例中 10 例ではめまい係数ゼロ, 即ち処置後にめまい発作を一度も起こさなかった. めまいふらつきのアンケート (19 例に施行) では因子 1 (社会活動性の障害), 因子 2 (頭位, 視覚による増悪), 因子 3 (身体活動の制限), 因子 4 (感情障害), 因子 5 (対人関係の障害) の全ての因子について GM 処置後自覚的改善を認めた. 以上の結果より, GM 鼓室投与は比較的長期にわたってめまい発作を抑制し, かつ患者の満足度も高いことが判明した.

聴力に関しては全症例を平均すると GM 処置前後で聴力の悪化は認めなかったが(48.8 dB vs 46.4 dB), メニエール病 21 例中 5 例で 10dB 以上の悪化を認めた. しかしこれらの例でも聴力の悪化はめまい発作の再発に伴って起こっており, GM の副作用よりも現疾患の悪化によるものであると考えられた. GM 処置前後でカロリックテストを行った 14 例中 11 例で CP%の進行を認め, この変化は GM 処置後の HSAN の出現と相関した. GM 処置後に HSAN の出現した群の方が出現しなかった群より有意にめまい発作が抑制され(0.07 回/M vs 0.21 回/M), GM 投与による前庭障害の進行がめまい発作抑制に結びつくものと思われる.

一方, GM 処置前に蝸電図で dominant-SP を認めた 8 例中 3 例で GM 処置後 dominant-SP が消失しており, GM 投与は前庭障害を引き起こす一方で, 内リンパ水腫を軽減させる例も存在することが判明した.

血中バソプレッシン(AVP)はGM処置直後に有意に低下した。GM処置後6ヶ月後には低下傾向のみで有意な低下は消失したが、めまい発作完全制御例では低下したままの症例が多く4)、めまい発作の抑制によるストレスの低下がAVPを低下させ、ひいては内リンパ水腫の形成を抑制している可能性が考えられた。

【参考文献】

- 1) 久保武：メニエール病の外科的治療。耳鼻咽喉科診療プラクティス 6EBMに基づくめまいの診断と治療（文光堂）pp140-143, 2001.
- 2) 水越鉄理ほか：めまいに対する治療効果判定の基準案（メニエール病を中心に）-1993年めまいに対する治療効果判定基準化委員会答申- *Equilibrium Res Suppl.* 10, 117-122, 1994.
- 3) 西池季隆ほか：めまい患者の日常生活障害度 多変量解析を用いた評価。日耳鼻 98: 31-40, 1995
- 4) Horii A, Kitahara T, Uno A, Kondoh K, Morihana T, Okumura S, Nakagawa A, Mitani K, Masumura C, Kubo T: Vestibular function and vasopressin. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl.* submitted.

7. 内リンパ嚢手術前後における内リンパ水腫陽性率の変化

土井勝美, 福嶋宗久, 中川あや, 北原紘, 久保武
(大阪大学耳鼻咽喉科)

【研究要旨】

内科的治療に抵抗性を示すメニエール病および遅発性内リンパ水腫26例に対して内リンパ嚢開放術を施行した。めまい制御率は88% (25例中22例), 聴力改善率は35% (26例中9例)であった。術直後に蝸牛および前庭系の内リンパ水腫陽性率に低下がみられた。術側のみならず対側の内リンパ水腫にも影響があり, また, 術直後に血中抗利尿ホルモン (ADH) 値の低下がみられた。内リンパ嚢開放術の治療効果がどのような機序により発現するかさらに解析を続けていきたい。

【研究目的】

内科的治療に抵抗性を示すメニエール病および遅発性内リンパ水腫に対する外科的治療の一つとして内リンパ嚢開放術がある¹⁾。同手術法によるめまい制御率については, 短期成績では70~80%と比較的良好である。聴力改善率については, 20~30%と決して良好とは言えないが, 両側性メニエール病においては同手術が非術側 (対側) の聴力にも良い影響を与える可能性が示唆されている。残念ながら, 内リンパ嚢開放術により前庭系と蝸牛で異なった治療効果が観察される理由, 対側耳の聴力が改善する機序については十分には解明されていない。

本研究では, 内リンパ嚢開放術により治療効果が発現する機序を明らかにする目的で, 同手術前後における蝸牛および前庭系の内リンパ水腫陽性率の変化について検討を行った。

【研究方法】

対象は, 内科的治療に抵抗性を示し, 内リンパ嚢開放術を施行したメニエール病20例 (両側性3例, 一側性17例), 遅発性内リンパ水腫6例 (同側型3例, 対側型3例)である。男性9例, 女性17例, 年齢は21~74歳 (平均年齢51+11歳)で, 術後の平均観察期間は29.3ヶ月である。手術法を簡単に述べると, 乳突蜂巣の削開に続いて, S状静脈洞, 後頭蓋窩硬膜上の骨を薄く削りながら除去することで内リンパ嚢を同定, 開放した後, 内リンパ腔に短冊型に3~5枚重ねとしたゲルフィルムを挿入してパルーニングを行い, さらに, ステロイド (ソルメドロール 25mg/ml) を含むスポンジェルを周囲に少量留置して終了する。

内リンパ嚢開放術の成績に関しては, 1995年の日本平衡神経科学会の判定基準案に従った。すなわち, めまいの評価では, 術後1年の時点でめまい係数を算出して, 著明改善 (0), 改善 (1~40), 軽度改善 (41~80), 不変 (81~20), 悪化 (>120) に分類した。聴力の評価は, 純音聴力検査において250, 500, 1000, 2000ヘルツの平均聴力レベルを算出して, 聴力改善 (術後に10デシベル以上の改善), 不変 (+10デシベル未満の変動), 悪化 (10デシベル以上の悪化) に分類した。

内リンパ水腫の検出には, 蝸電図検査, グリセロール検査, フロセミドVOR検査を施行した。これらの内リンパ水腫検査は可能な限り手術の直前・直後 (入院中, 1~2週間以内) に施行した。また, これまでの基礎・臨床的研究から内リンパ水腫の形成に関与すると推察される血中抗利尿ホルモン (ADH) 値を, 同様に手術直前 (前日) と直後 (1日, 7日後) に測定した。

【研究結果】

1. めまい制御率と聴力改善率

めまいの評価では、著明改善が21例、改善1例、軽度改善1例、不変2例で、改善以上のものが25例中22例(88%)であった。聴力の評価では、改善が26例中9例(35%)、不変15例、悪化2例であった。両側性メニエール病3例中1例(33%)で対側聴力に改善がみられた。

2. 術前の内リンパ水腫陽性率

術側耳の内リンパ水腫陽性率は、蝸电图検査において24例中22例(92%)、グリセロール検査において24例中19例(79%)、フロセミドVOR検査における陽性率は13例中6例(46%)であった。

3. 術前後の内リンパ水腫陽性率の変化

術前の蝸电图検査において内リンパ水腫陽性を示した22例のうち、術直後に蝸电图検査が施行可能であった19例中9例(47%)が内リンパ水腫陰性となった。術前の蝸电图検査において対側耳に内リンパ水腫陽性を示した5例(両側性メニエール病2例を含む)中3例(60%)も術直後の蝸电图検査にて内リンパ水腫陰性となった。蝸电图検査の-SP/AP比を手術前後で比較したところ、術側、対側ともに統計学的(対応のあるt検定)に有意に-SP/AP比は術直後に低下していた。術前のグリセロール検査において内リンパ水腫陽性を示した19例のうち、術直後にグリセロール検査が施行可能であった9例中8例(89%)は内リンパ水腫陰性となった。術前のフロセミドVOR検査において内リンパ水腫陽性を示した6例のうち、術直後にフロセミドVOR検査が施行可能であった4例中4例(100%)とも内リンパ水腫陰性となった。

4. 術前後の血中ADH値の変化

手術前日の血中ADH値と比較して、手術1日後では同ホルモン値に変化はみられなかったが、手術7日後には統計学的に有意に低下していた。

【考察】

内科的治療に抵抗性を示すメニエール病および遅発性内リンパ水腫に対して我々が施行している内リンパ嚢開放術では、術後1年での評価ではあるが、従来の報告とほぼ同等のめまい制御率、聴力改善率が得られ、同手術法により前庭系および蝸牛の内リンパ水腫に対して何らかの影響があることが確認された。

手術前の内リンパ水腫の検査では、蝸牛の内リンパ水腫陽性率が高く、一方、検査法の信頼性という観点からは問題もあるものの、一般的には前庭系の内リンパ水腫を検出すると考えられているフロセミドVOR検査の陽性率はやや低めであり、同一症例においても蝸牛では内リンパ水腫陽性、前庭系では陰性(その逆もあり)と両者の検査結果に解離を示すものがかなり認められた。蝸牛および前庭系における実際の内リンパ水腫の状態を反映しているのか、異なった検査法での単なる検出感度の違いなのか、さらに検討していく必要がある。

術前後での内リンパ水腫陽性率の変化では、蝸牛および前庭系のいずれにおいても、術直後に内リンパ水腫の陽性率に低下がみられた。蝸电图検査では、術側のみならず対側においても約半数で内リンパ水腫が陰性化し、また、検査を施行できた全症例における術前後の比較では術側、対側ともに有意に-SP/AP比が低下した。対側聴力に改善を示した症例もあることから、内リンパ嚢開放術が術側だけでなく対側の内リンパ水腫にも影響を与える機序を解明する必要がある。フロセミドVOR検査では、術後に全例が内リンパ水腫陰性となったが、例数も極めて少なく、検査法の信頼性の問題もあり、内リンパ嚢開放術が前庭系の内リンパ水腫をより強く軽減するとの考察は現時点では適当とは思われない。内リンパ嚢開放術によるめまい制御率は70-80%と良好であるのに、聴力改善率が20-30%である理由を明らかにするには、術後の内リンパ水腫陽性率を蝸牛および前庭系それぞれでより長期に観察していく必要があると考えられる。

術直後の蝸牛および前庭系での内リンパ水腫陽性率の変化、あるいは対側耳の聴力や内リンパ水腫陽性率の変化を惹起する機序の一つとして血中抗利尿ホルモン(ADH)を介した内耳の液性制御機構を考

える時、本研究で観察された術前後での同ホルモン値の変化は興味深い。メニエール病および内リンパ水腫症例における血中 ADH 値の高値、発作期における血中 ADH 値の上昇、動物実験における ADH 投与による内リンパ水腫の形成、抗 ADH 受容体薬の投与による内リンパ水腫の軽減などのこれまでの報告(2,3)を考えると、手術7日後の同ホルモン値の有意な低下は、術直後に観察された内リンパ水腫の陰性化に何らかの関連を有すると推察される。

我々の以前の研究では、ラットおよびヒトの蝸牛内支持細胞および内リンパ嚢上皮細胞には水を選択的に透過させる水チャネルが発現することを確認している(4)。腎臓の集合管上皮細胞において、これらの水チャネルのうち AQP2 と呼ばれる水チャネルの発現量および膜の水透過性は血中抗利尿ホルモン (ADH) 濃度により制御されることが知られている。また、我々が施行している内リンパ嚢開放術では、内リンパ腔および内リンパ嚢周囲にステロイドを作用させているが、ラット蝸牛および内リンパ嚢に発現する水チャネルの一部では、その発現量がステロイドにより制御されることも確認している(5)。内リンパ嚢開放術直後に内リンパ水腫陽性率の低下がおこる機序については、ADH あるいはステロイドによる内耳水チャネルの質的・量的変化との関連からもさらに解析を続ける必要がある。

【結論】

内科的治療に抵抗性を示すメニエール病および遅発性内リンパ水腫に対する内リンパ嚢開放術により、術直後に内リンパ水腫の陽性率に低下がみられた。術側のみならず対側の内リンパ水腫にも影響が観察されることから、少なくとも、術直後の内リンパ水腫の陽性率の変化には、血中抗利尿ホルモン (ADH) を介した液性制御機構が何らかの関与を有するものと推察された。

内リンパ嚢開放術の治療効果がどのような機序により発現するかさらに解析を続けていきたい。

【参考文献】

- 1) 土井勝美, 久保武: 内リンパ嚢手術. *JOHNS* 14: 1253-1260, 1998.
- 2) Takeda T, Kakigi A, Saito H.: Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol Suppl* 519: 219-22, 1995.
- 3) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A.: Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res.* 140: 1-6, 2000.
- 4) 土井勝美, 岩倉進, 日比野浩, 藤井和敏, 久保武, 佐々木成: 内リンパ嚢における水チャネル AQP2 の発現 -内リンパ水腫形成との関連-. *Equilibrium Res* 55: 545-551, 1996.
- 5) Fukushima M, Kitahara T, Uno Y, Fuse Y, Doi K, Kubo T: Effects of intratympanic injection of steroids on changes in rat inner ear aquaporin expression. *Acta Otolaryngol* 122: 600-606, 2002.

8. 前庭代償におけるグルタミン酸および

GABA 関連遺伝子発現の変化

久保武, 堀井新, 宇野敦彦, 北原紀
(大阪大学耳鼻咽喉科)

[はじめに]

前庭代償は脳の可塑性や内耳障害後の平衡障害の回復メカニズムの研究のモデルとして広く研究されている。障害側の前庭神経核の自発発火の回復が前庭代償のメカニズムとして重要であるが、その分子生物学的な背景についての報告はいまだ少ない。そこで本研究ではラットを用いて、一側内耳破壊の中樞前庭系での主要な伝達物質であるグルタミン酸および GABA に関連する物質の遺伝子レベルでの変化を real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

[対象と方法]

実験には Wistar 系雄性ラット(230g)を用いた。内耳破壊は経鼓膜的に耳小骨を摘出し卵円窓および前庭に小孔を開け、リンパ液を吸引後 100%エタノールを環流することによって行った。内耳破壊あるいはシャム手術後 6 時間あるいは 50 時間後に断頭し実体顕微鏡下に左右の前庭神経核および小脳片葉を摘出した。摘出標本から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出し、DNase I にて genomic DNA を消化後、逆転写反応を行い cDNA を作成した。mRNA の定量は ABI7700 モデルによる real-time RT-PCR 法を用いた¹⁾。サンプル間の total RNA 量の差は house keeping gene (GAPDH) の発現を用いて補正した。標的遺伝子はグルタミン酸受容体に関しては NR1, NR2A, GluR2, KA2, mGluR1, mGluR7 とし、GABA に関しては GABAA・1, GABA BR1, GAD65, GAD67 とした。

[結果と考察]

前庭神経核では内耳破壊後 6 時間で破壊側の GluR2, NR2A, mGluR7 の down-regulation がみられた²⁾。これらの変化は障害を受けた内耳からの input 低下による denervation-induced downregulation と思われた。GABAA・1, GABA BR1 は内耳破壊後 6 時間で破壊側前庭神経核で発現増加し、前者は 50 時間後には両側の前庭神経核で増加した。脳幹スライスを用いた in vitro の実験では破壊側の内側前庭神経核の GABAA, GABA B 受容体の機能的 downregulation が報告されており³⁾、もしこれらの機能変化が受容体の internalization によるものだとすれば本研究における messenger レベルの変化は internalization-induced upregulation によるものと思われる。GABA 産生酵素である GAD67 の発現は内耳破壊後 6 時間で破壊側前庭神経核で増加し、50 時間後には両側の前庭神経核で増加した。GABA に対する抗体を用いた免疫組織化学では初めに破壊側で、後に両側での GABA immunoreactivity の増加が報告されており⁴⁾、本研究での messenger レベルでの変化と一致するものである。前庭神経核では GAD67 や GABA は type II neuron に存在するものと思われ、これらの変化は内耳破壊後の VOR の感受性低下を補うことに役立ち、dynamic compensation のメカニズムに関与する可能性があるものと思われる。

小脳片葉では内耳破壊後 50 時間で両側性に GAD65 の発現増加を認め、前庭神経核の小脳性抑制に関与するものと思われる。また、内耳破壊後 50 時間では破壊側小脳片葉で KA2 の発現増加を認めた²⁾。KA2 は presynaptic autoreceptor であり、この発現増加はプルキンエ細胞へのグルタミン酸性興奮伝達を低下させ、ひいては破壊側前庭神経核を disinhibition するものと思われた。また、対側小脳片葉では内耳破壊後 6 時間で mGluR1 の発現が低下し、破壊側での相対的発現増加がみられた²⁾。内耳破壊側

小脳片葉への mGluR blocker の注入は前庭代償に重要な compensatory increase in intrinsic excitability (CIE)を抑制することが報告されており 5), 本研究の結果と合わせて考えると内耳破壊後の破壊側小脳片葉の mGluR の活性化は前庭代償の発現に重要なメカニズムであると考えられる。

今回の研究で見られた変化が単なる内耳破壊の結果なのか, または前庭代償のメカニズムに積極的に関わる変化なのかは判断できない点もあり, また messenger レベルでの変化が蛋白や機能レベルでの変化を誘導しているかどうかについては今後の検討課題である。

[参考文献]

- 1) Horii A, Smith P F , Darlington C L : Application of real-time quantitative polymerase chain reaction to quantification of glutamate receptor gene expression in the vestibular brainstem and cerebellum. *Brain Res. Protocols* 9: 77-83, 2002.
- 2) Horii A, Smith P F , Darlington C L : Quantitative changes in gene expression of glutamate receptor subunits/subtypes in the vestibular nucleus, inferior olive and flocculus before and following unilateral labyrinthectomy in the rat: real-time quantitative PCR method. *Exp. Brain Res.* 139: 188-200, 2001.
- 3) Yamanaka T, Him A, Cameron S A, Dutia M B : Rapid compensatory changes in GABA receptor efficacy in rat vestibular neurones after unilateral labyrinthectomy. *J. Physiol.* 523: 413-424, 2000.
- 4) Tighilet B, and Lacour M : Gamma amino butyric acid (GABA) immunoreactivity in the vestibular nuclei of normal and unilateral vestibular neurectomized cats. *Eur. J. Neurosci.* 13: 2255-2267, 2001.
- 5) Johnston A R, Seckl J R, Dutia M B : Role of flocculus in mediating vestibular nucleus neuron plasticity during vestibular compensation in the rat. *J. Physiol.* 545: 903-911, 2002.

9. 薬剤による内耳障害治療の strategy—基礎的検討—

工田昌也, 夜陣紘治, 清水 顕
(広島大学耳鼻咽喉科, 東京医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

内耳障害の原因には内リンパ水腫をはじめとして感染, 耳毒性薬剤, 騒音など様々なものがあるが, 近年の研究によりこれらすべてに共通する内耳障害機構が存在し, なかでも一酸化窒素(NO)や活性酸素種(ROS)といったフリーラジカルやアポトーシスが大きな役割を果たしていると考えられるようになってきている. 我々は以前よりフリーラジカルの産生の抑制, 消去により内耳障害が予防できる可能性を明らかにしてきており 1,2), 加えて, ニューロトロフィンが内耳障害の予防・治療に役立つことも報告している 3,4). また, 近年, 内耳障害による感覚細胞死にはアポトーシスが関連しているということが明らかになって来ており, アポトーシスの抑制による内耳障害治療の可能性も示唆されている 5). 一方, 細胞が熱ショック, 虚血, 外傷, 酸素ラジカル, ウィルス感染などの様々なストレスにさらされたときに誘導される一群のタンパク質であり, ストレスタンパク質とも呼ばれる熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) が内耳障害の予防効果をもつことが示唆されるようになってきた 6). HSP は分子シャペロンとして細胞内タンパク質の品質管理を行っているが, 特にストレス誘導性の HSP70 を過剰発現した細胞は致命的な障害因子に対して抵抗性を示すことが明らかになっている. 今回は, すでに内耳障害の予防や治療に応用できることが明らかになっているフリーラジカル制御剤やニューロトロフィンに加えて, アポトーシスの抑制や HSP70 の誘導による内耳障害の予防効果を検討し, これまでの結果と合わせて薬剤による内耳障害の治療の strategy についてゲンタマイシン(GM)による実験的内耳障害モデルを用いて *in vitro* で検討した.

【対象と方法】

1) 内耳障害とアポトーシス

内耳障害によるアポトーシス関連酵素の発現に関してはプライエル反射正常の成熟, 有色モルモット (体重 250-300g) の鼓室内に 5mg ゲンタマイシン(GM)を注入し 24 時間後にネンブタールによる深麻酔下に断頭, 末梢前庭器を摘出し, caspase 3, m-calpain に対する免疫染色を行った. GM によるアポトーシスの発現に関しては, 深麻酔下にモルモットを断頭, 末梢前庭器を摘出し, Vibrant Apoptosis Assay Kit を使用し, 2 mg/ml GM 負荷による感覚細胞のアポトーシスの発現について *in vitro* で検討した.

2) アポトーシス制御, HSP 誘導による感覚細胞の障害予防効果

感覚細胞障害予防効果の検討には GM による感覚細胞死を指標にした. 摘出卵形囊, 半規管, 単離有毛細胞を用い, HBSS 中にて培養を行い, LIVE/DEAD system を使用し感覚細胞の生存率の検討を行った. 薬剤による障害には 2 mg/ml GM を使用し, calpain 阻害剤として 1mM leupeptin, caspase-3 阻害剤として 200 μ M Z-DEVD-FMK, HSP70 の誘導には 5mM 2-Deoxy-D-glucose (2DG), 3 μ M teprenon を使用し, GM 添加 0, 1, 2, 4, 8 時間後の感覚細胞生存率を検討した 4).

3) 薬剤の併用効果

薬剤の併用効果の検討にも同様に GM による感覚細胞死を指標にした. 摘出卵形囊, 半規管, 単離有毛細胞を用い, HBSS 中にて培養を行い, LIVE/DEAD system を使用し感覚細胞の生存率の検討を行った. 薬剤による障害には 2 mg/ml GM を使用し, 100 μ M L-NAME, 50mM D-methionine, 10ng/ml BDNF, 1mM leupeptin, 200 μ M Z-DEVD-FMK, 5mM 2DG, 3 μ M teprenon 各々単独あるいはその組み合わせによる障害予防効果を検討した 4).

[結果]

1) 内耳障害とアポトーシス

今回、アポトーシス関連酵素であるカスパーゼ、カルパインの発現を免疫組織学的に検討した結果、GM 投与により感覚細胞に一致してカスパーゼ、カルパインの反応が認められ、その反応は障害の程度が強い半規管膨大部稜頂部で強くなっており、カスパーゼ、カルパインの発現がアポトーシスに強く関連していると考えられた。次に Vybrant Apoptosis Assay Kit を使用し、GM 負荷による前庭感覚細胞でのアポトーシスの発現について *in vitro* で検討した結果、このキットを使用することにより正常細胞は無標識、アポトーシスに陥った細胞は緑、ネクローシスに陥った細胞は赤に染色され、簡便にアポトーシスを評価することが可能であった。GM 投与後の有毛細胞には正常細胞、アポトーシスに陥った細胞、ネクローシスに陥った細胞が混在するが、GM 投与直後はほとんどの細胞が正常であり、1 時間後にはアポトーシス優位、2 時間後にはアポトーシスに加えてネクローシスも多数認められるようになり GM によりアポトーシスが誘導されることが明らかとなり、傷害を受けた感覚細胞はアポトーシスからネクローシスという経過をたどっていくと考えられた。

2) アポトーシス制御、HSP 誘導による感覚細胞の障害予防効果

HBSS 中で感覚細胞は 8 時間まではほぼ 90%以上が生存するが、GM を添加したものでは感覚細胞の生存率は 1 時間後に $60 \pm 18.6\%$ 、2 時間後に $43 \pm 25.4\%$ 、4 時間後で $19 \pm 22.9\%$ と時間経過とともに有意に減少し ($p < 0.01$)、8 時間後には $3 \pm 4.4\%$ と殆どすべての細胞が死んでいた。これに対して、calpain 阻害剤として 1 mM leupeptin を使用した場合には、感覚細胞の生存率は 1 時間後に $78 \pm 13.6\%$ 、2 時間後に $73 \pm 11.9\%$ 、4 時間後で $60 \pm 14.7\%$ 、8 時間後では $48 \pm 21.6\%$ 、caspase-3 阻害剤として $200 \mu \text{ M}$ Z-DEVD-FMK を使用した場合には、感覚細胞の生存率は 1 時間後に $83 \pm 15.7\%$ 、2 時間後に $75 \pm 16.9\%$ 、4 時間後で $62 \pm 11.7\%$ 、8 時間後では $46 \pm 22.5\%$ 、HSP70 の誘導に 5 mM 2DG を使用した場合には、感覚細胞の生存率は 1 時間後に $82 \pm 15.7\%$ 、2 時間後に $76 \pm 16.9\%$ 、4 時間後で $60 \pm 19.2\%$ 、8 時間後では $46 \pm 22.5\%$ 、 $3 \mu \text{ M}$ teprenon を使用した場合には、感覚細胞の生存率は 1 時間後に $85 \pm 17.0\%$ 、2 時間後に $77 \pm 11.2\%$ 、4 時間後で $64 \pm 11.1\%$ 、8 時間後では $48 \pm 21.6\%$ といずれも感覚細胞の生存率は有意に高くなっていった。

3) 薬剤の併用効果

GM による感覚細胞の生存率の低下に及ぼす各種薬剤の影響を GM 投与 4 時間後の時点で比較すると L-NAME を添加することで $56 \pm 12.0\%$ 、D-methionine で $56 \pm 24.6\%$ 、BDNF で $63 \pm 20.4\%$ 、leupeptin で $61 \pm 9.9\%$ 、Z-DEVD-FMK で $64 \pm 11.1\%$ 、2DG で $60 \pm 19.2\%$ 、teprenon で $64 \pm 11.1\%$ 、と有意に軽減された ($p < 0.01$) が、各種薬剤の間で生存率に有意差は認められなかった。薬剤の併用効果についての検討では L-NAME と BDNF を同時に併用したものでは感覚細胞の生存率は $92 \pm 4.1\%$ 、L-NAME+leupeptin で $80 \pm 18.5\%$ 、L-NAME+teprenon で $85 \pm 17.0\%$ 、L-NAME+2DG で $89 \pm 10.5\%$ 、D-methionine+BDNF では $80 \pm 11.1\%$ と相乗効果が認められ、各単独投与群と比較しても有意に優れた結果 ($p < 0.01$) であった。これに対して L-NAME+D-methionine では $53 \pm 25.4\%$ 、BDNF+leupeptin で $61 \pm 14.9\%$ 、BDNF+2DG で $61 \pm 12.3\%$ 、と単独投与群と比較して有意差はなく相乗効果は認められなかった (図)。

[考察]

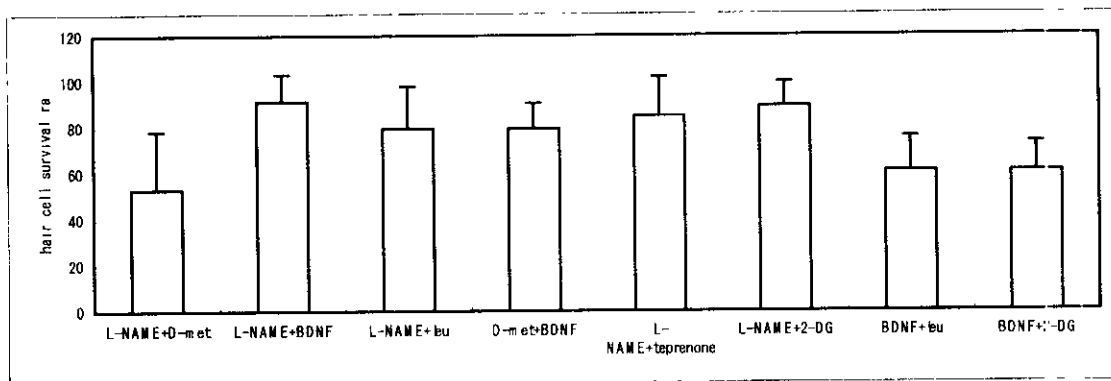
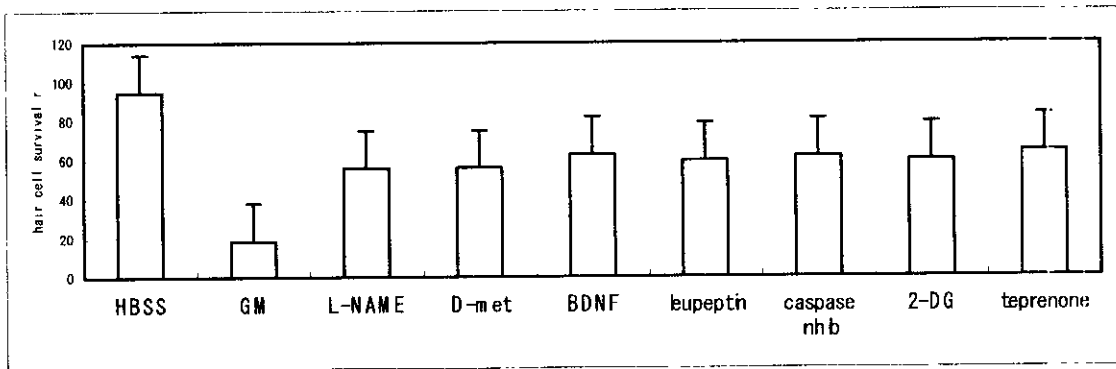
内耳障害の原因には感染、老化、耳毒性薬剤など様々なものが考えられるが、近年の研究により、内耳障害をきたすような病態では、その原因のいかんに関らず共通した障害機構が存在することが明らかになっており、なかでも NO や活性酸素をはじめとするフリーラジカルが大きな役割を果たしている (1,2)。これらに加えて近年アポトーシスと内耳障害との関係が検討されるようになり内耳障害の発現に感覚細胞のアポトーシスが大きな役割を果たしていることが明らかとなって来ている (5)。実際、今回の

研究でも GM による内耳障害には感覚細胞にアポトーシスが生じていることが明らかとなり、アポトーシス関連酵素である **calpain**, **caspase** を阻害することより内耳障害の予防効果が発現することが明らかとなった。また、内耳障害時の HSP の発現についても徐々に明らかになって来ているが 6), HSP を誘導することにより内耳障害の予防が可能となることも今回の検討で明らかとなった。これらの結果をもとに、実際に臨床的に内耳障害を予防・治療することを考えると、使用薬剤の選択に関してはフリーラジカル抑制剤 (NO 合成阻害剤, 活性酸素消去剤), ニューロトロフィン, アポトーシス制御剤 (**calpain**, **caspase** 阻害剤), HSP 誘導剤などが考えられる。これらの薬剤について *in vitro* での GM 障害予防効果を基に検討した結果, とともにフリーラジカル系を制御する NOS 阻害薬と **radical scavenger** あるいはアポトーシスを制御するニューロトロフィンと **calpain inhibitor** という作用機序の類似する薬剤の組み合わせでは併用効果は認められなかったが, NOS 阻害剤あるいは **radical scavenger**+ニューロトロフィンあるいは **calpain inhibitor** という異なった作用機序を有する薬剤の組み合わせでは, それぞれ単独で使用するよりも高い効果を得ることができた。さらに HSP 誘導剤に関してはフリーラジカル制御剤との併用が有効であった。今回, 相乗効果を上げることができる併用方法を確認できたことは実際の臨床応用を考える段階での薬剤の選択に大きな助けになるものと思われた。

[参考文献]

- 1) Takumida M, Anniko M: Localization of nitric oxide synthase isoforms (NOS I, II and III) in the vestibular end organs of the guinea pig. *ORL* 60:67-72. 1998.
- 2) Takumida M, Anniko M, Popa R, Zhang DM: Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide. *Acta Otolaryngol* 121:16-20. 2001.
- 3) Zheng JL, Stewart RR, Gao W-Q: Neurotrophin-4/5, brain derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 promote survival of cultured vestibular ganglion and protect them against neurotoxicity of ototoxins. *J Neurobio*:28:330-340. 1995.
- 4) Takumida M, Anniko M: Brain derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol (Stockh)*; in press.
- 5) Cheng AG, Huang T, Stracher A, et al: Calpain inhibitors protect auditory sensory cells from hypoxia and neurotrophin-withdrawal induced apoptosis. *Brain Res* 850:234-243. 1999.
- 6) Altschuler RA, Fairfield D, Cho Y, Leonova E, Benjamin IJ, Miller JM, Lomax ML: Stress pathways in the rat cochlea and potential for protection from acquired deafness. *Audiol Neurootol* 7:152-156. 2002.

図：ゲンタマイシンによる感覚細胞生存率に及ぼす各種薬剤の影響



10. 抗酸化剤によるメニエール病の治療

工田昌也，夜陣紘治
(広島大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

メニエール病の治療には急性期には炭酸水素ナトリウム，鎮静剤，鎮量剤などが用いられるが，発作自体は長くても数日程度で軽快する．しかし，発作を繰り返すためその予防として利尿剤，内耳循環改善剤，自律神経調節剤，鎮静剤，抗不安剤，抗うつ剤などが用いられ，なかでも内リンパ水腫の改善のためにイソソルビドが多く使用されている．メニエール病の3大症状のうちめまい発作は長期経過で見ると自発的に寛解していく傾向があるが，なかにはめまい発作が反復し，制御し難い例も存在する．一方，聴力および耳鳴などの聴覚症状は変動しがたく著明に自然寛解はしない傾向にあると推察されている 1-4)．実際，現在，頻用されているイソソルビドの治療効果もめまいに対しては比較的有効であるが難聴，耳鳴に対しては有効性が低く，各種治療にも関わらず難聴が次第に進行していく例のあることは良く知られており，患者のQOLを悪化させる大きな要因となっている 4)．我々は各種内耳障害の発生機序に関する研究で内耳感覚細胞の障害にはフリーラジカルが大きく関与していること，フリーラジカルを制御することで内耳障害の予防，治療ができる可能性があることを明らかにしてきた 5-7)．そこで，今回，従来の治療でコントロール不良であったメニエール病患者に対して抗酸化剤を投与し，その治療効果を検討したので報告する．

【対象と方法】

対象：厚生省判定基準で確実例と診断されたメニエール病症例のうち，少なくとも2ヶ月以上の通常の治療を行ってもめまい発作の制御が不十分なもの，難聴が持続あるいは進行するものなどコントロール不良例のうちインフォームドコンセントにより患者からの同意が得られたもの 25例（男性9例，女性16例）を対象とした．年齢は27～65歳，平均49.8才，患側は右側12例，左側11例，両側2例であった．抗酸化剤としてはレバミピド（ムコスタ®）300mg/日を中心にビタミンC（シナール®）600mg/日，グルタチオン（タチオン®）300mg/日を症例に応じて原則として8週間以上経口投与した．検討項目：検討項目にはメニエール病の3大症状であるめまい（定型的発作：20分～数時間～数日続く自発性の典型的な発作），難聴（聴力），耳鳴，さらには患者の日常生活支障度ならびに満足度を表す能力低下を用いた．めまいについては，定型的発作の観察後1～4週および5～8週の回数を観察前4週間の回数で除して観察4週および8週後のめまい係数を算出し，定型的発作の観察後12ヶ月間の月平均発作回数を観察前6ヶ月間のそれで除して観察1年後のめまい係数を算出した．聴力については標準純音聴力検査ならびに250,500,1000および2000Hzの4分法平均聴力レベルを求めた．耳鳴はその気になり方の程度を5段階スコア（1：ほとんど気にならない，2：仕事中は忘れる，3：仕事中心もときどき気になる，4：気になるが仕事はできる，5：気になって仕事ができない）で，能力低下は非定型的めまい発作（定型的めまい発作の間に生じ，2，3分間の誘発性の附属的発作）と随伴症状（悪心，嘔吐，頭痛）も含めて4段階スコア（1：障害なし，2：軽度障害-危険な労働のみできない，3：中等度障害

- 軽労働のみできる, 4: 高度障害- 日常生活に支障あり勤務できない) で分類した 4,8).

評価方法: 1993 年日本平衡神経科学会めまいに対する治療効果判定の基準案 8) に従い, めまい発作についてはめまい係数を 0: 著明改善, 1-40: 改善, 41-80: 軽度改善, 81-120: 不変, >120: 悪化の 5 段階に分類して評価した. 聴力は短期評価には観察前 4 週間と観察後 1~4 週および 5~8 週との最悪聴力レベルを, 長期評価には抗酸化剤投与前 6 ヶ月間と投与後 6~12 ヶ月の間との最悪聴力レベルを比較し, それぞれの閾値が 10dB 以上低下したものを改善, 10dB 未満の変動であったものを不変, 10dB 以上上昇したものを悪化とした. 耳鳴および能力低下は短期評価には観察前 4 週間と観察後 1-4 週および 5-8 週との最悪スコアを, 長期評価にはレバミピド投与前 6 ヶ月間と投与後 6~12 ヶ月の間との最悪聴力スコアを比較し, スコアが低下したものを改善, 変化しなかったものを不変, 上昇したものを悪化とした.

【結果】

今回の抗酸化剤によるメニエール病の治療効果は 1 年経過した時点でめまいは著明改善: 16/25, 改善: 5/25, 軽度改善: 0/25, 不変: 4/25, 悪化: 0/25 であり, 聴力は改善: 12/27, 不変: 14/27, 悪化: 1/27, 耳鳴は改善: 17/27, 不変: 10/27, 悪化: 0/19, 能力低下は改善: 18/25, 不変: 7/25, 悪化: 0/25 であった (図). また, 抗酸化剤投与 4 週間, 8 週間での成績の比較では投与開始後 4 週という比較的早い時期にすでに効果が現れた. さらに聴力に対する効果を周波数別に検討してみると 125, 250, 500, 1000Hz では危険率 1% 以下, 2kHz では危険率 5% 以下で有意に聴力が改善していたが, 4, 8kHz では聴力の有意な改善は認められなかった. また, 今回, 薬剤の種類による聴力の改善効果を検討したところ, レバミピド単独では聴力改善は平均 5.7dB, レバミピド+ビタミン C では 9.3dB, レバミピド+グルタチオンでは 17.3dB, レバミピド+ビタミン C+グルタチオンでは 11.6dB とレバミピド単独よりも複数の薬剤を組み合わせた例で聴力改善が高い傾向があった.

【考察】

メニエール病の治療には薬物療法, 手術療法などが行われるが長期観察で薬物療法により約 80% は小康を得ているという報告がある. 一方, 種々の治療に抵抗し, 聴力が改善せず, 悪化したままの状態にとどまる症例に遭遇することも事実である. 発症初期はめまい発作が重積して生じる場合も多く, めまいが難病となるが, 経過とともにめまいは改善あるいは消失していく. 一方, 聴力レベルはしだいに悪化, 進行していき, 長期的に見ると難聴がもっとも難病である 1-4). 実際, メニエール病の自然経過を検討したものでは Friberg ら 9) は 9 年以上経過を追うことのできたメニエール病症例について, めまい発作回数は徐々に減少していく経過が認められ, 聴力は 1~4 年で 5-10dB 低下したと報告している. また, 山中ら 4) は 1 年の観察ではあるが, めまいおよび能力低下は, 自発的に寛解していく傾向があり, 一方, 聴力および耳鳴などの聴覚症状は変動しがたく, 著明に自然寛解はしない傾向にあると推察している. 治療を行った場合, 松永ら 3) は 1~15 年の観察でめまい症状は経過とともに徐々に改善し, 発作回数も年平均 5-6 回から 10 年後には 1-2 回に同様の経過で減少し, 聴力レベルは 3 年以内から低および高音部が順次低下し始め, 次いで高音部が 4 年後から悪化し始め, 10 年後には中音部が 50dB, 低および高音部が 60dB で安定する傾向を示したと報告している. また, 竹田ら 2) は長期観察された約 2 割の症例で聴力低下が見られたと報告している. このようにしてみるとメニエール病

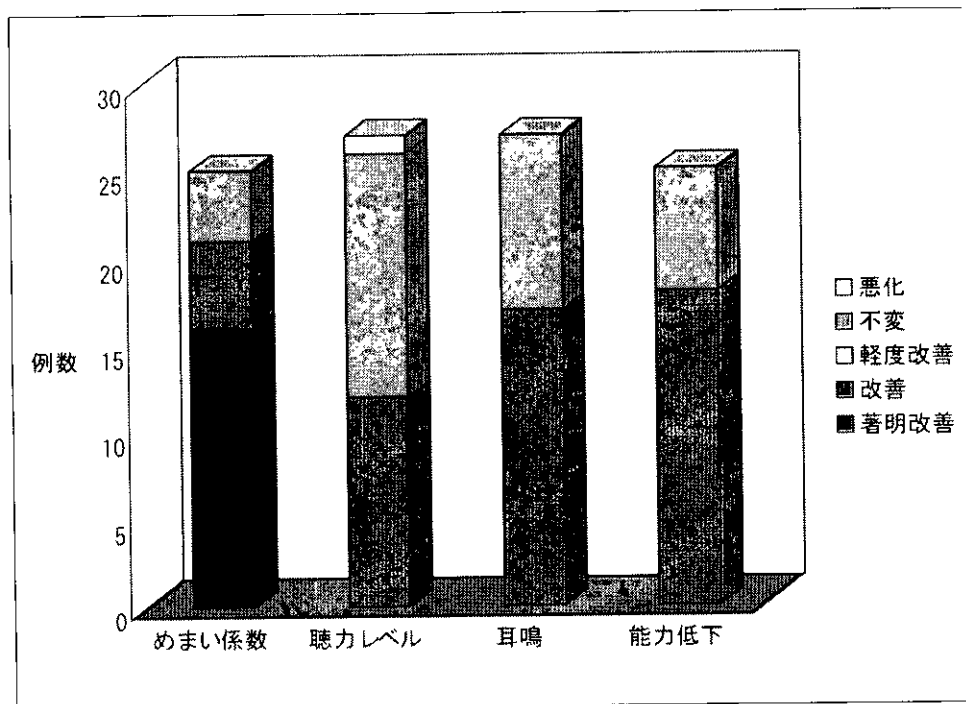
の治療にあたっては聴力予後の改善が大きな課題であると考えられる。メニエール病の薬物療法の代表的なものには、内耳血流改善薬、浸透圧利尿剤、ステロイド薬、鎮静薬や、特殊なものとして前庭機能の廃絶を目的として用いられるアミノグリコシド等があげられる。実際の治療にはこれらの薬剤を適宜選択して用いているのが現状である。なかでも浸透圧利尿剤であるイソソルビドはよく用いられている。また、聴力の急性悪化時などではステロイドも多く用いられている。しかしながらこれらの薬剤による治療にもかかわらず聴力の悪化する例のあることは事実であり新しい治療薬の開発が待ち望まれている。我々は、これまで内耳障害とフリーラジカルとの関連から原因のいかに関わらず内耳障害が生じる時にはフリーラジカルが重要な役割を果たしており、フリーラジカルを制御することで内耳障害の軽減あるいは治療の可能性があることを明らかにしてきた(5-7)。そこで今回、メニエール病の内耳障害機序が完全に解明されたとは言い難いものの、内耳性の聴力障害にはフリーラジカルがなんらかの関与をしているとの仮定に基づいてメニエール病患者にレバミピドを中心とした活性酸素消去薬を投与しその効果を検討した(10)。その結果、従来の治療でコントロール不良であった症例に少なからず効果をあげることができた。特に聴力に関していえば27例中12例で聴力の改善が認められた。この聴力改善効果は低音域でより著しく高音域になると効果が低下した。むしろ聴力の改善した症例のすべてが抗酸化剤の効果と考えることはできないものの今回の対象が従来の方法でコントロール不良であったことを考えると何らかの効果があつたと考えられる。今回の成績はあくまでプレリミナリーな研究であり、今後は厳密なケースコントロールスタディーを行い、抗酸化剤治療が本当に有効かどうかの検討を行う予定である。

[参考文献]

- 1) 竹森節子：メニエール病の長期観察.厚生省特定疾患 前庭機能異常調査研究班平成7年度研究報告書.142-143,1996.
- 2) 竹田泰三：メニエール病難聴の長期観察.厚生省特定疾患 前庭機能異常調査研究班平成7年度研究報告書.144-145,1996.
- 3) 松永 喬, 他：メニエール病の長期観察例の検討.厚生省特定疾患 前庭機能異常調査研究班平成7年度研究報告書.146-147,1996.
- 4) 山中敏彰, 他.メニエール病に対する薬物療法の短期および長期評価- 自然経過を考慮した検討-. *Equilibrium Res* 56:594-600,1997.
- 5) Takumida M, Zhang DM, Anniko M: Localization of nitric oxide synthase isoforms (I, II and III) in the endolymphatic sac of the guinea pig. *ORL* 59:317-321,1997.
- 6) Takumida M, Anniko M, Popa R: Possible involvement of free radicals in lipopolysaccharide-induced labyrinthitis in the guinea pig: a morphological and functional investigation. *ORL* 60:246-253,1998.
- 7) Takumida M, Popa R, Anniko M: Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL* 61:63-70,1999.
- 8) 水越鉄理, 他：めまいに対する治療効果判定の基準案.メニエール病を中心に.*Equilibrium Res Suppl* 11:80-85,1995.
- 9) 八木聰明, 他：メニエール病の重症度分類について.*Equilibrium Res* 58:61-64,1999.

- 10) Friberg U, Stahle J, Svedberg A: The natural course of Meniere's disease. Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl 406:72-77,1984.
- 11) Yoshikawa T, Naito Y, Tanigawa T et al: Free radical scavenging activity of the novel anti-ulcer agent, rebamipide studied by electron spin resonance. Drug Res 43:363-366,1993.

図：抗酸化剤による治療効果



11. ヒスタミン受容体 mRNA のラット内耳における発現

東 祐史, 竹田泰三, 澤田正一, 柿木章伸, 竹内俊二
(高知医科大学耳鼻咽喉科)

[目的]

ヒスタミン受容体は, H1R, H2R および H3R に分類され, 様々な生理学的な働きを担っている [1]. ヒスタミン受容体のサブタイプは G 蛋白結合受容体で, それぞれは最近クローニングされた [2,3,4]. ヒスタミン H1R は気管や血管平滑筋の収縮, 血管透過性の増加, H2R は胃酸の分泌, 気管や血管平滑筋の弛緩などの働きがある [5]. H3R は主にシナプス神経終末に存在し, ヒスタミン遊離のネガティブフィードバック機構として働くことが知られている [6]. また脳ではヒスタミンニューロンは, 脊髄も含め至る所にその軸索が分布しており, 様々な機能を担っていると考えられている [7,8]. しかしながら蝸牛においては, ヒスタミンニューロンやヒスタミン受容体の内耳における存在に関しての報告はない. 今回我々は, RT-PCR を用いてヒスタミン受容体 mRNA の内耳における発現を調べたので報告する.

[方法]

Wistar 系ラット(200-350g) 12 匹を使用した. ペントバルビタール深麻酔下に (NaCl 110 mmol/l, Na-aspartate 40 mmol/l, KCl 3.6 mmol/l, MgCl₂ 1 mmol/l, HEPES 6 mmol/l, glucose 5 mmol/l, pH 7.4) にて, 経心灌流施行. 続いて脳組織 (5mg), 内耳 (whole cochlea, 6 耳) を直ちに摘出し, total RNA を抽出した (Rneasy Mini Kit, Qiagen). 上記とは別に内耳を lateral portion (血管条, ラセン靭帯), medial portion (コルチ器), modiolus に実体顕微鏡下に分離採取し (各 6 耳), 同様に total RNA を抽出した. さらに Total RNA を RNase-free DNase set (Qiagen, Hilden, Germany) で処理し, genomic DNA を除去. 抽出した total RNA から, 逆転写酵素を用いて cDNA を合成 (SuperScriptII kit, Promega). また, 逆転写しなかったものをコントロールとして用いた. 内耳および脳組織の cDNA について, H1R, H2R および H3R に対する特異的な primer を用いて PCR を施行した (Qiagen HotStar Taq/ TP3000, Takara). PCR 産物は 3% アガロースゲルにて伝導依移動を行い, エチジウムブロマイドにてバンドを確認した. それぞれの PCR 産物をサイクルシーケンス法にて塩基配列の確認をした (PE Applied Biosystems).

[結果]

- 1) 内耳及び脳組織から RT-PCR で H1R, H2R 及び H3R のそれぞれに特異的なバンドが確認された (Fig.1)
- 2) medial portion, lateral portion ではヒスタミン受容体の発現は認めなかったが, modiolus で H1R, H2R 及び H3R すべての mRNA の発現を認めた (Fig.2).
- 3) シークエンスを施行し, PCR 産物の塩基配列は, それぞれ既知の配列 (H1R: GenBank AF387889, H2R: NM012965) と合致していることを確認した. H3R の PCR 産物は 2 つのバンドを呈し, H3L (393 bp, GenBank AY009370) と H3S (251 bp, GenBank AY009371) の H3R の isoform であった.

[考察]

内耳におけるヒスタミンの生理学的な機能については, いくつかの報告があるが, 明らかでない点が多い. カエルの平衡器官の電気生理学的な実験で, ヒスタミンは有毛細胞の伝達物質として働く可能性を示唆している [11, 12, 13]. しかしながら蝸牛については, 哺乳類内耳におけるヒスタミンの電気生理学的な報告が 2 つあるだけである [14, 15]. モルモットの鼓室階に 10mM のヒスタミンを灌流した実

験で CAP 電位の僅かな減少を認めたのみであり[14], ヒスタミンの neurotransmitter としての可能性は否定的としている。しかしながら, Minoda らは 10~50microM の鼓室階へのヒスタミン灌流では, CAP 電位の増加を認め, 10mM では CAP 電位の低下を報告している[15]. 彼らは, 低濃度のヒスタミンは神経伝達物質, もしくは neuromodulator として働くのではないかと推察している。これまでの報告では, ヒスタミンが内耳において生理学的な役割を果たしていることを示唆しているが, ヒスタミン受容体の発現に関する報告は今までにない。今回の我々の研究でヒスタミン受容体 mRNA がラット内耳の modiolus に発現していることが明らかになり, その役割などについては今後さらに研究していく必要があると思われた。

[参考文献]

- 1) Arrang JM: Cell Mol Biol 40, 273-279, 1994.
- 2) Yamashita M, Fukui H, Sugama K et al: Proc Natl Acad Sci USA 88:11515-11519,1991.
- 3) Gantz I, Schaffer M, Delvalle J et al: Proc Natl Acad Sci USA 88: 429-433,1991.
- 4) Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ et al: Mol Pharmacol 55:1101-1107 ,1999.
- 5) Hill SJ:Pharmacol Rev 42: 45-83,1990.
- 6) Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC: Nature 302: 832-837,1983.
- 7) Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg H et al: Physiol Rev 71: 1-51 ,1991.
- 8) Wada H, Inagaki N, Yamatodani A et al:TINS 14: 415-418 ,1994.
- 9) Panula P, Yang HY, Costa E: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 2572-2576,1984.
- 10) Watanabe T, Taguchi Y, Shiosaka S et al: Brain Res 295: 13-25 ,1984.
- 11) Bobbin RP, Thompson MH: Ann Otol Rhinol Laryngol 87:185-190 ,1978.
- 12) Minoda R, Toriya T, Masuyama K et al: Auris Nasus Larynx 28:219-222,2001.
- 13) Norris CH, Guth PS, Quine DB: Proc. Annu. Meet. Assoc. Res. Otolaryngol. 10th Clearwater Beach FL, pp102,1987.
- 14) Housley GD, Norris CH, Guth PS: Hear. Res 35: 87-98,1998.
- 15) Bledsoe SC Jr, Sinard RJ, Allen SJ: Hear. Res 38: 81-93,1989.
- 16) Brown RE, Stevens DR, Haas HL: Progress in Neurobiology 63:637-672,2001.

Fig.1

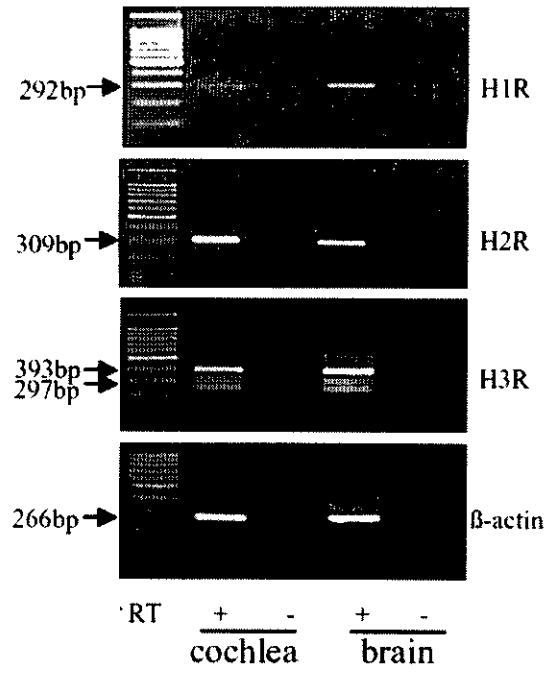
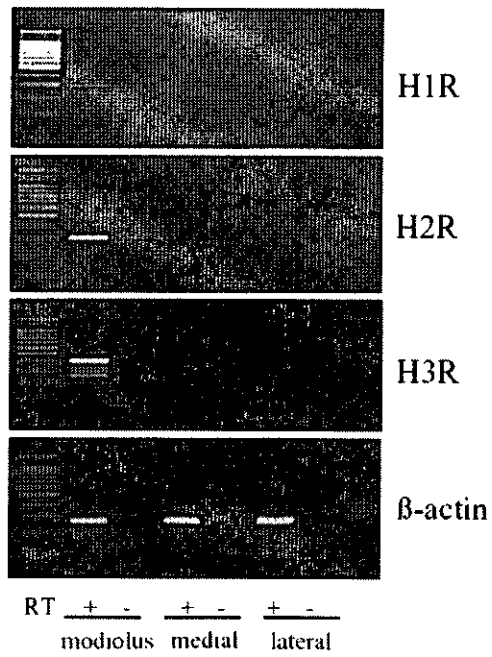


Fig.2



12. 内リンパ水腫が及ぼす内耳フリーラジカルへの影響

竹田泰三, 工田昌也, 柿木章伸, 澤田正一, 竹内俊二
(高知医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

緒言：内リンパ液の過剰貯留である内リンパ水腫は、ライスネル膜の進展だけでなく、血管条萎縮、有毛細胞の変性など、内耳の各組織にある程度の損傷を及ぼすことが知られている。一般に、組織損傷にはフリーラジカル反応が関与することが知られているので、内リンパ液の貯留のような軽度の負荷でも、フリーラジカルが内耳で発生している可能性が考えられる。本稿では、内リンパ嚢閉塞による内リンパ液の貯留が内耳にフリーラジカルの発生を促しているかどうかを検討するとともに、ラジカルスカベンジャーによって内耳のフリーラジカルの発生を抑制すれば、内リンパ水腫の形成にいかなる影響を及ぼすか二つの実験系をデザインして検討した。

【方法】

実験動物には白色成熟モルモット28匹を用いた。すべて、ketamine (30mg/kg)とxylazine (5mg/kg)による全麻下で硬膜外より前庭水管外孔を明視下に置き、微小ダイヤモンドバーで挫滅、閉塞した。

Reactive Oxygen Species (ROS) の検出

内リンパ嚢閉塞後二日目に蝸牛でのROS発生を検討した。この実験系に2匹の前庭水管閉塞動物を用いた。一匹では前庭水管閉塞術施行直後よりedaravone (3.0 mg/kg/日)を二日間筋注した。ROSの検出には、Molecular Probes社のdihydropyridine (DHTMROS)を検出probeとして用いた。励起光は550 nm, 蛍光は574 nmである。ROSの検出は二日目のedaravone筋注後6時間後に行った。Nembutalによる深麻酔下に蝸牛を摘出、蝸牛骨壁を実体顕微鏡下ではずし、蝸牛外側壁と蝸牛基底板を採取した。検体はDHTMROS負荷後、人工外リンパ液で洗浄、人工外リンパ液で満たしたチャンバーキットに入れ、蛍光顕微鏡（ニコン製、Eclipse E600）で観察した。

内リンパ水腫の形態学的評価

上述した前庭水管閉塞処置を施行した成熟白色モルモット26匹を、各15匹で二分し、内リンパ嚢閉塞術施行直後よりedaravone (3mg/kg/日)を筋注したedaravone投与群とedaravoneを全く投与しないedaravone非投与群の二群に分けた。それぞれ、前庭水管閉塞術施行後一週間目に内耳を摘出し、顕微鏡用組織標本作製、HE染色で内リンパ水腫の程度をPaparellaの基準で評価した。

【結果】

1) Reactive Oxygen Species (ROS) の検出