

除去することでクプラの機能を検索した(3)。クプラ除去の実験を模して耳石層を除去して回転を加えると、自発放電は残るものの刺激に対する反応は著明に低下した。このことは耳石が卵形囊上で振動体として働いて直線加速度への感受性を高めていることをしめすものである。

耳石塊を卵形囊上に置くと、直後一時的に放電が増加し、その後も回転に応じる放電は持続的に増加した。BPPV症例に Epley 法などの頭位変換療法を行うと、その直後に一時的なめまいが起こったり、翌日まで浮動感が持続することは临床上しばしば経験する。直後の比較的激しいめまいは、耳石塊を置いた後の一時的な電位の上昇によるものと考えられる。すでに報告した方法(4)を応用すると、遊離耳石を後半規管から卵形囊へ返還させて頭位変換療法のモデルを作成することができる。この際卵形囊へ返還した耳石塊は卵形囊耳石層の上に到達するが、卵形囊の向きを変えると耳石塊は耳石層上で不安定に動くのが実体顕微鏡下に観察された。この動きが頭位変換療法後の不安定化の一因と推測される。なお、不安定な耳石塊は数分後には安定化し不動となった。今回の実験で、卵形囊上に耳石塊を置くと、耳石塊が安定化しても卵形囊全体の被刺激性が上昇することから持続する浮動感の原因になることが想像された。また、頭位変換療法後のみでなく、加齢などの原因で耳石が安定しない場合も同様の機序で慢性的な浮動感が起こる可能性が示唆された。

【結語】

摘出卵形囊に振子様回転刺激を加えて、耳石塊設置前後で活動電位を比較した。耳石塊設置後回転に応じる電位は増加し、これがBPPVにおける浮動感の一因となりうるものと考えた。

【参考文献】

- 1) Epley J M. Positional vertigo related to semicircular canalithiasis. Otolaryngology-Head and Neck Surgery 112:154-161.
- 2) Semon L, et al. Curing the BPPV with a Liberatory Maneuver. Adv. Oto-rhino-laryngol 1988 ;42:290-293.
- 3) Suzuki M, et al. An experimental study on a function of the cupula. Effect of cupula removal on the ampullary nerve action potential. Arch Otorhinolaryng 1984 ;241:75-81.
- 4) Suzuki M, et al. Functional model of benign paroxysmal positional vertigo using an isolated frog semicircular canal. J. Vestibular.Res 1996;6:121-125.

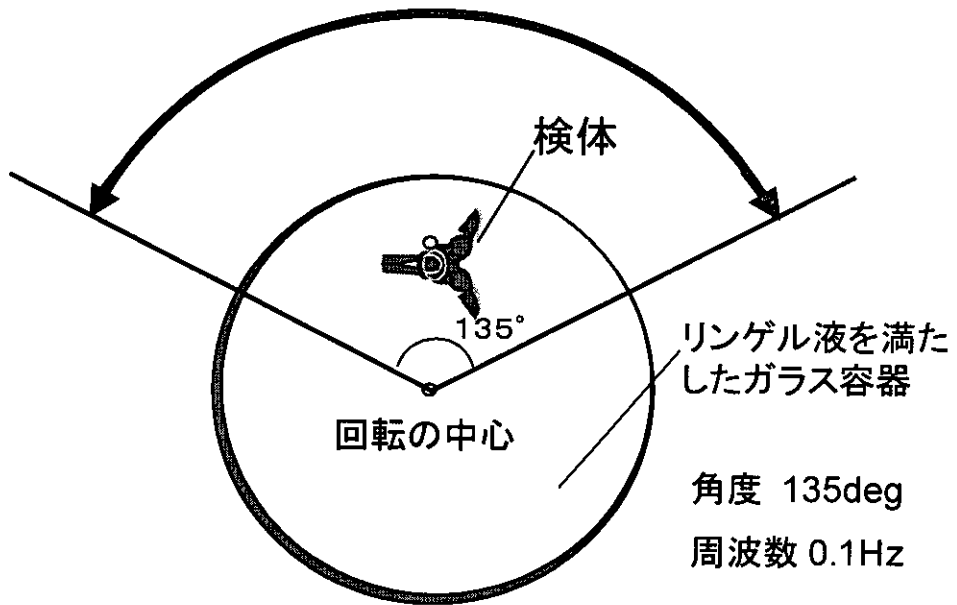


図1. 実験の模式図

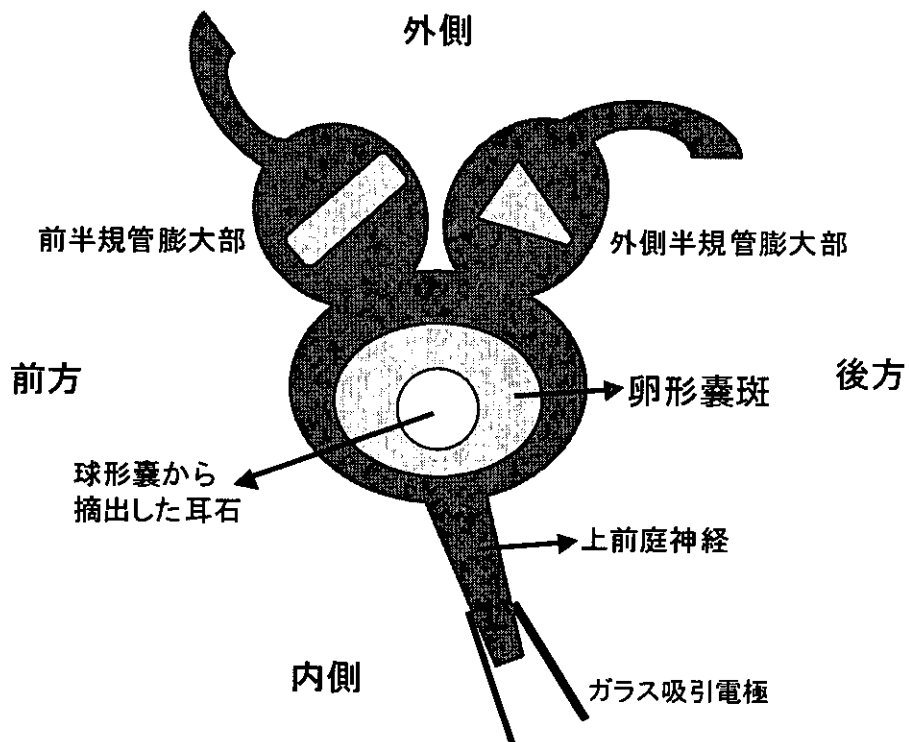


図2. 摘出検体の模式図

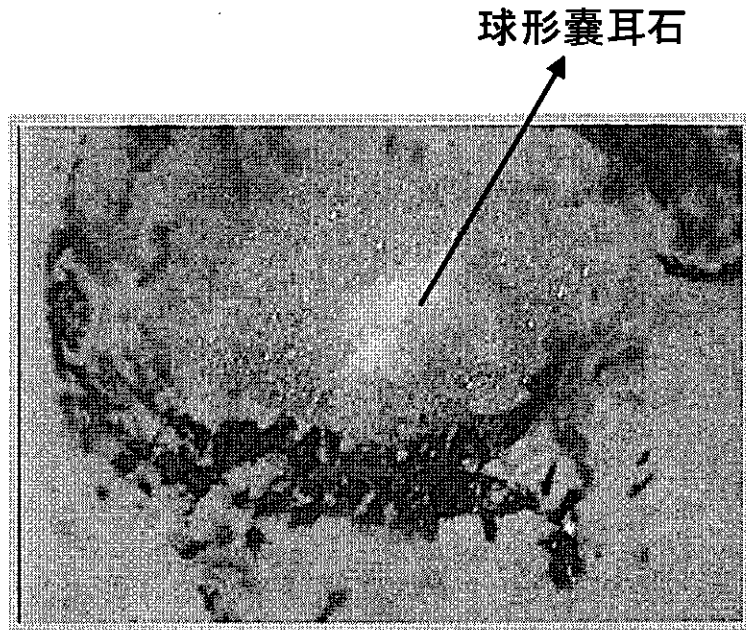


図3. 卵形囊上に置いた球形囊耳石塊

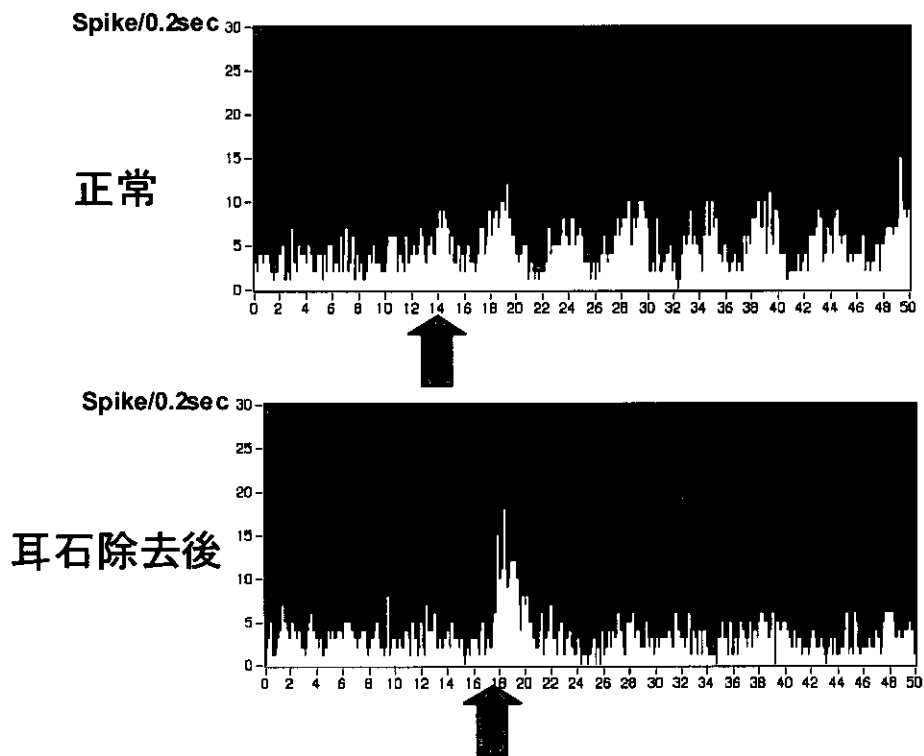


図4. 正常(上)と耳石除去後の回転刺激に対する反応のスパイク密度ヒストグラム
矢印は回転開始時をしめす。横軸のスケールは 50 秒

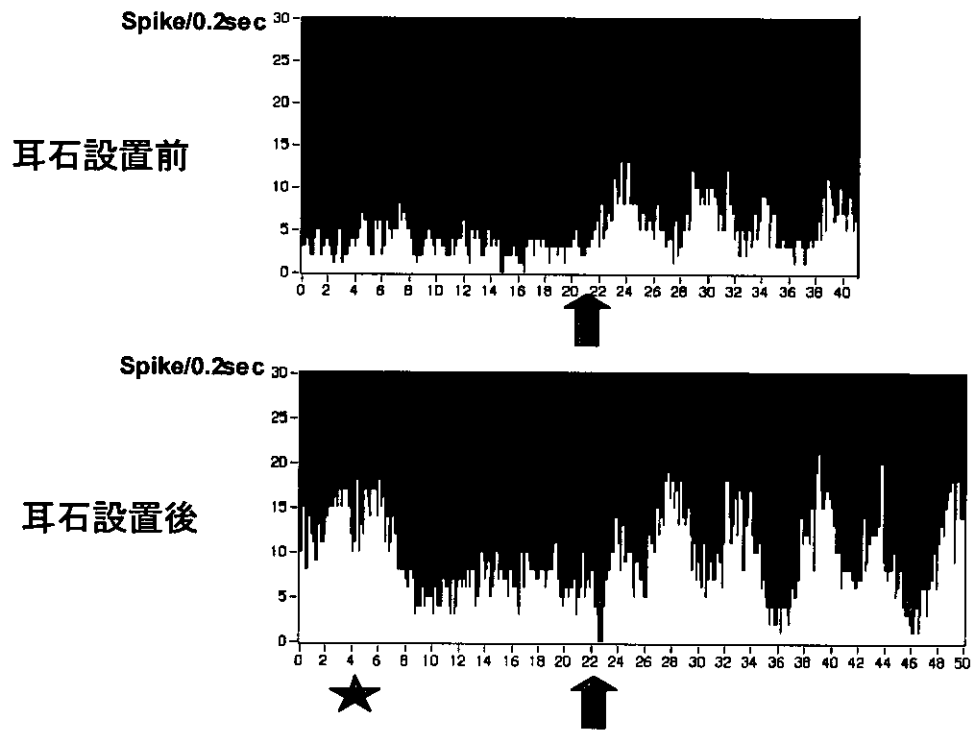


図5. 球形囊耳石設置前後の卵形囊神経の比較
 設置後(下), 電位は増加している. 矢印は回転開始時点, 星印は耳石設置直後の電位の増加をしめす.

感覚細胞障害の治療に関する研究

分担研究者 工田 昌也 広島大学講師

研究要旨 メニエール病の新しい治療薬剤の開発を目的として、インソルビドの作用機序の検討ならびに HSP による内耳障害の軽減効果について検討した。その結果、インソルビドは内耳での NO, ROS の産生を抑制し、内耳感覚細胞障害予防効果を有すること、GGA は内耳に安全に HSP を誘導し、内耳障害軽減効果をしめすことが明らかとなった。臨床的にはゲンタマイシン鼓室内投与の研究を基礎的に検討し、論文のレビューを行った結果、ゲンタマイシンの投与量は 1 回 10mg 以下で 3-4 週ごとに観察し投与を繰り返すいわゆる titration 法が推奨された。また、難治性メニエール病に対する抗酸化剤治療のまとめを行った。

A. 研究目的

メニエール病の新しい治療法の開発を目的に、基礎的にはインソルビドのフリーラジカル抑制作用、heat shock protein (HSP) 誘導による内耳障害軽減作用の検討を行った。また、臨床的にはゲンタマイシン(GM)鼓室内投与の最適な方法を検討するとともに抗酸化剤による治療のまとめを行った。

B. 研究方法

1) メニエール病の新しい治療薬剤の検討

i) インソルビドの感覚細胞障害軽減作用

インソルビドのフリーラジカル産生に対する作用を前庭器での NO, 活性酸素種(ROS)の産生を指標に検討した。プライエル反射正常の成熟、有色モルモット(体重 250-300g)を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、一部は機械的方法により単離有毛細胞を作製した。摘出卵形囊、半規管ならびに単離有毛細胞は、10 μM DAF-2DA, 20 μM DHTMRos により 20 分間の loading を行い、1mM GM の負荷による NO, ROS の産生を検討した。加えて 100 μM L-NAME, 50mM D-methionine, 10ng/ml BDNF, 1mM leupeptin, 1mM D-mannitol, 1mM インソルビドによる NO, ROS の産生の抑制能を検討した。

インソルビドの感覚細胞障害予防効果の検討には摘出卵形囊、半規管、単離有毛細胞を用い、HBSS 中にて培養を行い、2mg/ml GM 添加 2 時間後の 1mM インソルビド、100 μM L-NAME,

50mM D-methionine, 10ng/ml BDNF, 1mM leupeptin による感覚細胞の障害予防効果を LIVE/DEAD system を使用し検討した。

ii) GGA による感覚細胞障害軽減効果

プライエル反射正常の成熟、有色モルモット(体重 250-300g)を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、3 μM GGA を含む HBSS 中にて 4 時間培養し HSP70 を誘導した。前庭器での HSP70 の発現については抗 HSP-70 抗体を用いて免疫組織学的に検討した。感覚細胞障害予防効果の検討には 2mg/ml GM による感覚細胞死を指標にし、GM 添加 0, 1, 2, 4, 8 時間後の感覚細胞の生存率の検討を行った。

2) GM 鼓室内注入療法の検討

i) 基礎的検討

GM 鼓室内投与による障害の検討では有色モルモットを使用し、GM 5mg を系鼓膜的に鼓室内に 1 回投与し、前庭器に対する障害の程度を系時的に投与後 1, 2 週, 1, 3, 6 ヶ月の時点で走査電顕にて観察した。

薬剤の中耳腔より内耳への移行に関してはモルモット鼓室内に蛍光標識 LPS(LPS from E. Coli, Alexa Fluor 488 or 568 conjugates) 150 μg を注入し 3, 12, 48 時間後に断頭し、LPS の移行部位を蛍光顕微鏡で観察した。

ii) 過去の報告の検討

1997~2003 年の GM 鼓室内投与による治療成績を述べた論文 27 編のレビューを行った。評価項目は GM の投与方法、すなわち、1 回投与量、投与回数、最大投与量、投与経路(鼓膜穿刺、経

鼓膜チューブ, マイクロカテーテル, など), めまい改善率, 聴力低下の割合であり, 聴力低下については各々の論文の聴力低下の割合と実際の症例数(総計 960 人)の両者を用いて検討した.

3) 抗酸化剤によるメニエール病の治療

臨床的にはコントロール不良のメニエール病患者 25 例を対象とし, レバミピド(300mg/日), ビタミン C(600mg/日), グルタチオン(300mg/日)などの抗酸化剤を8週間以上投与し, その効果のまとめを行った.

倫理面の配慮に関しては, 動物実験に際しては広島大学医学部動物実験規定を遵守し, 臨床では十分なインフォームドコンセントを行い同意の得られた患者を対象とした.

C. 研究結果

1) メニエール病の新しい治療薬剤の検討

i) イソソルビドの感覚細胞障害軽減作用

GM 刺激による NO, ROS の産生に及ぼす各種薬剤の影響について, L-NAME は, NO の産生をほぼ完全に阻害したが, ROS の産生は抑制しなかった. D-methionine や BDNF は ROS の産生を半分程度に抑制したが, NO の産生は増加した. mannitol は ROS の産生を抑制したが NO の産生は変化せず, イソソルビドは NO と ROS の両者の産生を抑制した. leupeptin の投与では NO, ROS いずれの産生にも変化は認められなかった.

イソソルビドの GM による感覚細胞の生存率の低下に及ぼす影響を GM 投与2時間後の時点で比較すると GM 投与で $51 \pm 8.0\%$ に低下した感覚細胞生存率が L-NAME を添加することで $73 \pm 12.0\%$, BDNF で $78 \pm 11.9\%$, leupeptin で $78 \pm 13.6\%$, イソソルビドで $81 \pm 13.0\%$ と有意に軽減された($p < 0.01$)が, 各種薬剤の間で有意差は認められなかった.

ii) GGA による感覚細胞障害軽減効果

GGA 投与による HSP70 の発現を免疫組織学的に検討した結果, GGA の前処置により感覚細胞に一致して HSP70 の発現が増強し, 移行上皮, 暗細胞でも HSP70 の発現の増強が認められた.

HBSS 中で感覚細胞は 12 時間後で 73% が生存するが, 4 時間後に GM を添加したものでは感覚細胞の生存率は GM 添加1時間後に $54 \pm 11.6\%$, 2 時間後に $39 \pm 15.4\%$, 4 時間後で $17 \pm 16.9\%$ と時

間経過とともに有意に減少し ($p < 0.01$), 8 時間後には $2 \pm 10.5\%$ と殆どすべての細胞が死んでいた. これに対して, GGA による前処置により HSP を誘導した場合には, 感覚細胞の生存率は GM 投与1時間後に $78 \pm 17.0\%$, 2 時間後に $71 \pm 14.1\%$, 4 時間後で $56 \pm 11.1\%$, 8 時間後では $43 \pm 13.6\%$ といずれも感覚細胞の生存率は有意に高くなっていた.

2) GM 鼓室内注入療法の検討

i) 基礎的検討

① GM による前庭器障害

GM 鼓室内投与により, 投与 1 週間後には平衡斑ストリオーラ部, 半規管膨大部稜頂部を中心として感覚毛の脱落, 癒合が認められた. 感覚毛の障害は I 型細胞で強く, II 型細胞で軽度であった. GM による感覚毛の障害は時間経過と共に進行し, 投与 6 ヶ月後にはほぼすべての領域で感覚毛の障害が認められた.

② 薬剤の内耳への移行

蛍光標識 LPS 注入 3 時間後には, 蝸牛(コルチ器, 蝸牛軸, ラセン神経節, 蝸牛側壁), 前庭器, 顔面神経に LPS が移行しているのが観察された. さらに蛍光強度を時系列で観察した結果, LPS は蝸牛側壁, コルチ器では基底回転から頂回転に向かって順次移行していくことが明らかとなった. これに対して, 前庭器, 顔面神経, 蝸牛軸, ラセン神経節などでは比較的早い時期に LPS が移行することが明らかとなった. 以上により, 中耳腔内の LPS は内耳に移行し, その移行経路は正円窓経路だけでなく, 卵円窓経路, 血行性, interscala exchange, 中耳腔より上皮結合織を通して直接的に, など複数の経路が存在することが明らかとなった.

ii) 過去の報告の検討

今回の 27 論文の検討で GM の投与経路は鼓膜穿刺 17 例, 経鼓膜チューブ 6 例, マイクロカテーテル 4 例であり, 投与間隔は1日 1~3 回から 1~4 週おきに 1 回まで様々であり, 総投与回数は 1~21 回, 1 回投与量は 1.25~720mg, 総投与量は 3.55~720mg であった.

めまい改善率は 72.7~100% (平均 $86.5 \pm 8.8\%$), 聴力低下の割合は 0~95% (平均 $26.3 \pm 24.1\%$) であった. めまい改善率に関しては GM の 1 回投与量, 総投与量, 投与回数, などいずれの評価項目において治療成績に影響を与えるものは

なかった。

聴力障害に関しては GM の総投与量が増すにつれて聴力障害の頻度が増す傾向が認められた。最大投与量との関係では最大投与量 50mg 未満のものでは聴力低下は $12.7 \pm 10.1\%$ (実数 20.3%), 50-100mg で $35.8 \pm 34.8\%$ (33.3%), 101mg 以上で $36.4 \pm 23.9\%$ (30.2%) と 50mg 未満のもので有意に ($p < 0.05$) 聴力低下が少なかった。1 回投与量に関しては 1 回投与量が 10mg 以下で $7.3 \pm 7.1\%$ (6.0%), 10mg を超えるもので $33.9 \pm 24.4\%$ (30.4%) と 10mg 以下のもので有意に ($p < 0.05$) 聴力低下の割合が少なかった。投与回数に関しては持続投与 $14.5 \pm 10.6\%$ (17.1%), 1 日複数回投与 $27.8 \pm 20.3\%$ (25.2%), 1 日 1 回投与 $38.4 \pm 35.5\%$ (30.5%), 週 1 回投与 $20.5 \pm 10.7\%$ (13.2%), 投与経路に関しては鼓膜穿刺 $25.2 \pm 22.8\%$ (24.5%), 経鼓膜チューブ $30.9 \pm 23.0\%$ (25.7%), マイクロカテーテル $28.6 \pm 35.3\%$ (23.0%) と、いずれの方法、経路でも有意差は認めなかった。また、GM 投与をあらかじめ決められた回数、方法で行う fixed dose 法と経過を見ながら行う titration 法との比較では fixed dose 法で $31.0 \pm 27.8\%$ (31.6%), titration 法 $17.2 \pm 11.5\%$ (20.1%) と titration 法で有意に ($p < 0.05$) 聴力低下の割合が減少した。

3) 抗酸化剤によるメニエール病の治療

抗酸化剤によるメニエール病の治療効果は 1 年以上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, 聴力低下は改善: 18/25, 不変: 7/25, 悪化: 0/25 であった。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効果が現れた。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。

D. 考察

今回、メニエール病の治療に新しい薬剤を導入するためまず、わが国で広く用いられているインソ

ルビドの作用をフリーラジカルの面から検討した結果、インソルビドはフリーラジカルの産生を抑制し、GM による内耳障害を軽減することが明らかとなった。また、GGA の投与により内耳で HSP を安全に誘導できること、HSP の誘導により内耳障害の予防が可能となることが判明した。今回の結果と我々のこれまでの検討をもとに実際のメニエール病の治療を考えると、レバミピド、プロブレジンク、ビタミン C、エダラボンなどのフリーラジカル抑制剤に加えて、GGA などの HSP 誘導剤、インソルビドなどが現在臨床的に使用可能な薬剤と考えられ実際の臨床応用の結果を検討すべきと思われる。

メニエール病の治療としての GM 鼓室内投与を行うにあたっては最初に GM 投与による内耳障害についての基礎的事項を理解しておく必要がある。これまでの研究により GM の耳毒性については、程度の差はあれ蝸牛、前庭の両方に障害が起こること、投与量が増せば、障害の程度は大きくなること、投与終了後も障害が進行する delayed ototoxicity が存在すること、動物の個体差、種差が非常に大きいこと、などがあげられる。感覚細胞の障害様式に関しては前庭では I 型細胞のほうが II 型細胞よりも障害を受けやすく、蝸牛では外有毛細胞のほうが内有毛細胞よりも障害を受けやすいことが知られている。また、鼓室内投与に関しては中耳腔より高率に薬剤が内耳に移行すること、蝸牛、前庭の両方に障害が生じ、delayed ototoxicity が存在することなどが明らかにされている。

今回の基礎的検討もこれらを確認するものであった。この点から考えると、GM によるメニエール病の治療では難聴の出現を完全になくすことは不可能であるがその頻度を軽減させるために、治療効果を減らさないという条件下で使用する GM の量をできるだけ減らすことが必要になる。これらの点から実際の報告での聴力障害の発現頻度を見ると、1 回投与量、総投与量が少ないほど難聴の発生が少ないという当然の結果であった。また、fixed dose 法と経過を見ながら行う titration 法との比較では titration 法で有意に聴力低下の割合が少なかった。以上の点から現在の時点で推奨される方法としては鼓膜穿刺により 1 回投与量は 10mg 未満とし、経過をみながら 3~4 週おきに投与を繰り返し、めまい発作の消失、聴力障害の出

現, 前庭機能低下のサインの出現などを投与終了の目安として, 総投与量は 50mg 未満とするのが妥当であると考えられた。

また, 今回, メニエール病患者の治療に抗酸化剤を応用した結果, 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。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メニエール病に対する抗酸化剤による治療の有効性が確認された。

E. 結論

新しいメニエール病の治療薬としてはフリーラジカルを制御する薬剤が有効であることが考えられた。また, 臨床的には GM の鼓室内投与は titration 法によるものが推奨されること, 抗酸化剤が治療薬として有効であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 工田昌矢, 清水 顕, 大谷真喜子, 竹田泰三. メニエール病の新しい薬物療法. *Equilibrium Res* 2003;62:132-138.
- 2) Takumida M, Anniko M, Ohtani M. Radical scavengers for Meniere's disease after failure of conventional therapy: a pilot study. *Acta Otolaryngol* 2003;123: 697-703.
- 3) Shimizu A, Takumida M, Anniko M, Suzuki M. Calpain and caspase inhibitors protect vestibular sensory cells from gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol* 2003 ;123: 459-465.
- 4) Takumida M, Anniko M, Shimizu A, Watanabe H. Neuroprotection of vestibular sensory cells from gentamicin ototoxicity obtained using nitric oxide synthase inhibitors, reactive oxygen species scavengers, brain-derived neurotrophic factors and calpain inhibitors. *Acta Otolaryngol* 2003; 123: 8-13.

- 5) Takumida M, Anniko M. Localization of endotoxin in inner ear following inoculation of endotoxin in the middle ear. *Acta Otolaryngol* 2004, in press.

2. 学会発表

- 1) Takumida M, Anniko M. Free radicals and inner ear disorders –basic research and clinical trials. 40th Workshop on Inner Ear Biology, Granada, 2003.9.
- 2) 工田昌矢. 内耳感覚細胞障害のメカニズムと治療. 第 2 回愛媛めまい・難聴フォーラム, 松山, 2003.9.
- 3) 工田昌矢. メニエール病の薬物療法-基礎から臨床への提言-. 第 9 回東海メニエール病研究会, 名古屋, 2003.9.
- 4) 工田昌矢. 急性・慢性中耳炎の合併症とその治療 1. 内耳波及 ①基礎. 第 13 回日本耳科学会シンポジウム, 東京, 2003.10.
- 5) 工田昌矢. メニエール病の薬物療法-基礎から臨床への提言-. 福岡地区耳鼻咽喉科専門医会学術講演会, 福岡, 2003.10.
- 6) 工田昌矢, 夜陣紘治. HSP 誘導による前庭感覚細胞障害の予防. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.10.

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

ゲンタマイシン鼓室内注入によるメニエール病の治療

工田 昌也, 夜陣 紘治

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学)

【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, 鎮暈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. このような薬物療法に抵抗する例に対して手術療法やアミノグリコシド系薬剤の鼓室内投与が行われている. メニエール病に対するアミノグリコシド系薬剤の投与は 1957 年に Schuknecht¹⁾がストレプトマイシンを患耳の鼓室内に投与し, 次いで Lange²⁾, Beck^{ら 3)}などによりゲンタマイシン(GM)の鼓室内投与が行われて以来広く行われるようになっていく. しかしながら, 具体的な GM の投与方法に関しては投与方法, 最大投与量にも大きな差があり, その手技について未だ確立されたものはなく, 効果としてのめまい改善率にはそれほど差が認められないが, 聴力低下率には大きな差がある. 今回は, メニエール病に対する安全な GM 鼓室内投与の方法を確立するため, GM による内耳障害の基本的特徴, 中耳腔より内耳への薬剤の移行様式を確認すると共に, これまでのゲンタマイシン鼓室内投与によるメニエール病の治療について報告された論文(4・10)のレビューを行った.

【対象と方法】

1)基礎的検討

GM 鼓室内投与による内耳障害の検討にはプライエル反射正常の有色モルモットを使用し, GM 5mg を経鼓膜的に鼓室内に 1 回投与し, 前庭器に対する障害の程度を経時的に投与後 1, 2 週, 1, 3, 6 ヶ月の時点で走査電顕にて観察した.

薬剤の中耳腔より内耳への移行に関しては, モルモット鼓室内に蛍光標識 LPS (LPS from E. Coli, Alexa Fluor 488 or 568 conjugates) 150 μ g を注入し 3, 12, 48 時間後に断頭し, LPS の移行部位を蛍光顕微鏡で観察した.

2)過去の報告の検討

1997~2003 年の GM 鼓室内投与による治療成績をのべた論文 27 編のレビューを行った(図1). 評価項目は GM の投与方法, すなわち, 1 回投与量, 投与回数, 最大投与量, 投与経路(鼓膜穿刺, 経鼓膜チューブ, マイクロカテーテル, など), めまい改善率, 聴力低下の割合であり, 聴力低下については各々の論文の聴力低下のパーセンテージと実際の症例数(総計 960 人)の両者を用いて検討した.

【結果】

1)基礎的検討

GM による前庭器障害

GM 鼓室内投与により, 投与 1 週間後には平衡斑ストリオーラ部, 半規管膨大部稜頂部を中心として感覚毛の脱落, 癒合が認められた. 感覚毛の障害は I 型細胞で強く認められ, II 型細胞の障害は比較的軽度であった. GM による感覚毛の障害は時間経過と共に進行し, 投与 6 ヶ月後にはほぼすべての領域で感覚毛の障害が認められた.

薬剤の内耳への移行

蛍光標識 LPS 注入 3 時間後には, 蝸牛(コルチ器, 蝸牛軸, ラセン神経節, 蝸牛側壁), 前庭器, 顔面神経

に LPS が移行しているのが観察された。さらに蛍光強度を時系列で観察した結果、LPS は蝸牛側壁、コルチ器では基底回転から頂回転に向かって順次移行していくことが明らかとなった。一方、前庭器、顔面神経、蝸牛軸、ラセン神経節などでは比較的早い時期に LPS が移行することが明らかとなった。以上により、中耳腔内の LPS は内耳に移行し、その移行経路はこれまで言われているような正円窓經由だけでなく、卵円窓經由、血行性、interscala exchange、中耳腔より上皮結合組織を通して直接的に、など複数の経路が存在することが明らかとなった (図 1)。

2) 過去の報告の検討

今回、27 論文の検討を行った結果、GM の投与経路については鼓膜穿刺 17 例、経鼓膜チューブ 6 例、マイクロカテーテル 4 例であり、投与間隔は 1 日 1~3 回から 1~4 週おきに 1 回まで様々であり、総投与回数は 1~21 回、1 回投与量は 1.25~720mg、総投与量は 3.55~720mg であった (4-10)。

めまい改善率は 72.7~100% (平均 $86.5 \pm 8.8\%$)、聴力低下の割合は 0~95% (平均 $26.3 \pm 24.1\%$) であった。めまい改善率に関しては GM の 1 回投与量、総投与量、投与回数、などいずれの評価項目において治療成績に影響を与えるものはなかった。

聴力障害に関しては GM の総投与量が大きくなるにつれて聴力障害の割合が大きくなる傾向が認められた。最大投与量と聴力低下の割合との関係では最大投与量 50mg 未満のものでは聴力低下は $12.7 \pm 10.1\%$ (実数 20.3%)、50-100mg では $35.8 \pm 34.8\%$ (実数 33.3%)、101mg 以上では $36.4 \pm 23.9\%$ (実数 30.2%) と 50mg 未満のものでは有意に ($p < 0.05$) 聴力低下が少なかった。また、1 回投与量に関しては 1 回投与量が 10mg 以下のものでは $7.3 \pm 7.1\%$ (実数 6.0%)、10mg を超えるものでは $33.9 \pm 24.4\%$ (実数 30.4%) と 10mg 以下のものでは有意に ($p < 0.05$) 聴力低下の割合が少なかった。投与回数に関しては持続投与 $14.5 \pm 10.6\%$ (実数 17.1%)、1 日複数回投与 $27.8 \pm 20.3\%$ (実数 25.2%)、1 日 1 回投与 $38.4 \pm 35.5\%$ (実数 30.5%)、週 1 回投与 $20.5 \pm 10.7\%$ (実数 13.2%)、投与経路に関しては鼓膜穿刺 $25.2 \pm 22.8\%$ (実数 24.5%)、経鼓膜チューブ $30.9 \pm 23.0\%$ (実数 25.7%)、マイクロカテーテル $28.6 \pm 35.3\%$ (実数 23.0%) いずれの方法、経路でも有意差は認められなかった。また、GM 投与をあらかじめ決められた回数、方法で行う fixed dose 法と経過を見ながら行う titration 法との比較では fixed dose 法で $31.0 \pm 27.8\%$ (実数 31.6%)、titration 法 $17.2 \pm 11.5\%$ (実数 20.1%) と titration 法で有意に ($p < 0.05$) 聴力低下の割合が少なかった。

【考察】

メニエール病の治療としての GM 鼓室内投与を行うにあたっては最初に GM 投与による内耳障害についての基礎的事項を理解しておく必要がある。これまでの詳細な研究によりアミノ配糖体の耳毒性については、程度の差はあれ蝸牛、前庭の両方に障害が起ること、投与量が増せば障害の程度は大きくなること、投与終了後も障害が進行するいわゆる delayed ototoxicity が存在すること、動物の個体差、種差が非常に大きいこと、などがあげられている。また、感覚細胞の障害様式に関しては前庭では I 型細胞のほうが II 型細胞よりも障害を受けやすく、蝸牛では外有毛細胞のほうが内有毛細胞よりも障害を受けやすいことなどが知られている (4, 11, 12)。また、鼓室内投与に関しては中耳腔より高率に薬剤が内耳に移行すること、鼓室内投与でも、蝸牛、前庭の両方に障害が生じ、delayed ototoxicity が存在することなどが明らかにされている (4, 6, 11, 12, 13)。今回の基礎的検討の結果もこれらを確認するものであり、この点から考えると、メニエール病の治療を行うための基礎的条件として、難聴の出現をを完全になくすことは不可能であるが、その頻度を軽減させるためには治療効果を減らさないという条件下で使用するアミノグリコシドの量をできるだけ減らすことが必要になる。これらの点から実際の報告での聴力障害の発現頻度を見てみると、1 回投与量、総投与量が少ないほど難聴の発生率が少ないという当然の結果であった。また、fixed dose 法と経過を見ながら行う titration 法との比較では 6) titration 法で有意に聴力低下の割合が少なかった。以上の点から現在の時点で推奨される方法としては鼓膜穿刺により 1 回投与量は 10mg 未満とし、経過をみながら 3~4 週おきに投与を繰り返し、めまい発作の消失、聴力障害の出現、自発眼振の出現、head shaking test, head thrust test の異常などの前庭機能低下のサインの出現などを投与終了の目安として 10)、総投与量は 50mg 未満とするのが妥当であると考えられた。

【参考文献】

- 1) Schuknecht H. Ablation therapy in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1957; Suppl 132:1-42.
- 2) Lange G. Die Indication zur intratympanalen gentamicin-behandlung der menieresche krankheit. *HNO* 1981;29:49-51.
- 3) Beck C, Schmidt CL. 10 years experience with intratympanally applied streptomycin (gentamicin) in the therapy of morbus meniere. *Arch Otorhinolaryngol* 1978;221:149-152.
- 4) Blakley BW. Clinical forum: A review of intratympanic therapy. *Am J Otol* 1997;18:520-526.
- 5) Blakley BW. Update on intratympanic gentamicin for Meniere's disease. *Laryngoscope* 2000; 110:236-240.
- 6) Bottrill I, et al. Intratympanic gentamicin for unilateral Meniere's disease: results of therapy. *Clin Otolaryngol* 2003;28:133-141.
- 7) Assimakopoulos D, Patrikakos G. Treatment of Meniere's disease by intratympanic gentamicin application. *J Laryngol Otol* 2003;117:10-16.
- 8) Obholzer RJ, et al. Intratympanic gentamicin for Meniere's disease; a survey of current UK practice. *J Laryngol Otol* 2003;117:459-461.
- 9) Martin E, Perez N. Hearing loss after intratympanic gentamicin therapy for unilateral Meniere's disease. *Otol Neurotol* 2003;24:800-806.
- 10) Wu IC, Minor LB. Long-term hearing outcome in patients receiving intratympanic gentamicin for Meniere's disease. *Layngoscope* 2003;113:815-820.
- 11) Lundquist PG, Wersäll J. The ototoxic effect of gentamicin- an electron microscopic study. In: *Gentamicin, First International Symposium*. Basel, Switzerland: Schwabe, 1967, pp.26-46.
- 12) Sera K, et al. Morphological changes in the vestibular epithelia and ganglion induced by ototoxic drug. *Scanning Microsc* 1987;3:1191-1197.
- 13) Plontke SKR, et al. Analysis of gentamicin Kinetics in fluids of the inner ear with round window administration. *Otol Neurotol* 2002;23:967-974.

ゲンタマイシンの投与方法

| 筆頭著者 | 投与方法 | 投与量 | 最大投与量 | めまい改善 | 聴力低下 | 人数 |
|----------------------|---------------|-----------|-------|-------|------------|-----|
| Ching (2003) | 1日1回 | 10mg | 70mg | 90% | 3% | 34 |
| Martin (2003) | 週1回 | 13-40 | 40 | 83.1 | 32.4(改善21) | 71 |
| Battrai (2003) | 1日1回 | 18-45 | 45 | 82 | 24(改善8) | 83 |
| Harner (2001) | 1日1回 | 20-30 | 30 | 82 | 11(改善9) | 55 |
| Hoffer (2001) | 週1回(2-3週) | 1.25 | 3.75 | 92.6 | 3.7 | 27 |
| Senraruogu (2001) | 1日3回x7日 | 20 | 420 | 73 | 35 | 16 |
| Schonendorf (2001) | 1日1回x6.7日 | 40 | 268 | 72.7 | 81.8 | 11 |
| Quaranta (2001) | 1日2回x1回のみ | 10 | 20 | 93 | 7 | 15 |
| Thomsen (2000) | 持続投与 | 0.24-90 | | 81 | 22 | 27 |
| Longridge (2000) | 1日1回x2日 | 135 | 27 | | 4.3 | 23 |
| Leone (2000) | 週1回(2-3週) | 16 | 48 | 100 | 20 | 29 |
| Hone (2000) | 1日3回x4日 | 26.7 | 320 | | 18 | 108 |
| Charabi (2000) | 持続投与 | 4-14 | | 93 | 7 | 14 |
| Kaplan (2000) | 1日3回x4日 | 18.7-21.4 | 257 | 93.4 | 25.6 | 90 |
| Silverstein (1998) | 1日1回 | 5.34-8 | | 75 | 0 | 12 |
| Silverstein (1998) | 5日に1回x2回 | 5.34-8.01 | 16 | 71.4 | 20 | 10 |
| Silverstein (1998) | 1回のみ | 5.34-8.01 | | 77.8 | 10 | 10 |
| Quaranta (1998) | 週1回(2週) | 40 | 80 | 100 | 27 | 11 |
| Miror (1998) | 週1回(1-6週) | 96 | | 91 | 32 | 34 |
| Mc Feely (1998) | 1日3回x4-5日 | 26.7 | 320 | 100 | 20 | 25 |
| Kaasinen (1998) | 1日1回x1-4日 | 9-15 | 160 | 92 | 39 | 93 |
| Mc Feely (1998) | 1日3回x4日 | 320 | | 88 | 20 | 25 |
| Pfeider (1998) | 1日3回x4日 | 320 | | 87 | 12 | 25 |
| Corsten (1997) | 1日3回x4日 | 216 | | 81 | 75 | 21 |
| Rauch (1997) | 1日2回x2回(2週ごと) | 720 | | 95 | 38 | 21 |
| Driscoll (1997) 1回のみ | | 80 | 84 | 95 | 23 | |
| + Isosorbide | | | | | | |
| Yamazaki (1988,1989) | 1日1回 週1回 | 2mg | 60mg | 73 | 22(改善21) | 75 |

メニエール病治療薬としてのイソソルビド, GGA の検討

工田昌也, 夜陣紘治

(広島大学大学院医歯薬学総合研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科学)

【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, 各種治療にも拘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). これらの点を解決し, メニエール病の新しい薬剤を開発する目的で, 我々はこれまで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, フリーラジカルの制御という観点からイソソルビドの作用を見直すと共に, 新しい薬剤の候補としての熱ショックタンパク質 (heat shock protein, HSP) 誘導剤の作用を検討した. HSPは細胞が熱ショック, 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ており内耳障害の治療薬として十分期待できるものである⁸).

【対象と方法】

1) イソソルビドの感覚細胞障害軽減作用

最初にイソソルビドのフリーラジカル産生に対する作用を前庭器での NO, 活性酸素種 (ROS) の産生を指標にした. プライエル反射正常の成熟, 有色モルモット (体重 250-300g) を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, 一部は機械的方法により単離有毛細胞を作製した. 摘出卵形囊, 半規管ならびに単離有毛細胞は, 10 μ M DAF-2DA, 20 μ M DHTMRos により 20 分間の loading を行い, 1mM GM の負荷による NO, ROS の産生を検討した. 加えて 100 μ M L-NAME, 50mM D-methionine, 10ng/ml BDNF, 1mM leupeptin, 1mM D-mannitol, 1mM イソソルビドによる NO, ROS の産生の抑制能を検討した⁹).

次に, イソソルビドの感覚細胞障害予防効果を GM による感覚細胞死を指標に LIVE/DEAD system を使用し検討した. 実際には摘出卵形囊, 半規管, 単離有毛細胞を HBSS 中にて培養し, 1mM イソソルビド, 100 μ M L-NAME, 50mM D-methionine, 10ng/ml BDNF, 1mM leupeptin による 2mg/ml GM 負荷 2 時間後の感覚細胞の生存率に及ぼす影響を検討した¹⁰).

2) GGA による感覚細胞障害軽減効果

プライエル反射正常の成熟, 有色モルモット (体重 250-300g) を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, 3 μ MGGA を含む HBSS 中にて 4 時間培養し HSP70 を誘導した. 前庭器での HSP70 の発現については抗 HSP-70 抗体を用いて免疫組織学的に検討した. 感覚細胞障害予防効果の検討には 2 mg/ml GM による感覚細胞死を指標にし, LIVE/DEAD system を使用し GM 添加 0, 1, 2, 4, 8 時間後の感覚細胞の生存率の検討を行った.

【結果】

1) イソソルビドによる内耳障害軽減作用

GM 刺激による NO, ROS の産生に及ぼす各種薬剤の影響について, L-NAME を投与した場合には, NO の産生はほぼ完全に阻害されたのに対して ROS の産生には変化は認められなかった. これに対して, D-methionine や BDNF, 投与では, 両薬剤とも ROS の産生を GM のみの刺激の半分程度に抑制したが, NO の産生は有意に($p < 0.01$)増加した. また, leupeptin の投与では NO, ROS いずれの産生にも変化は認められなかった. mannitol は ROS の産生を抑制したが NO の産生は変化せず, イソソルビドは NO と ROS の両者の産生を抑制した.

イソソルビドの 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2時間後の時点で比較すると GM 投与で $51 \pm 8.0\%$ に低下した感覚細胞生存率が L-NAME を添加することで $73 \pm 12.0\%$, BDNF で $78 \pm 11.9\%$, leupeptin で $78 \pm 13.6\%$, イソソルビドで $81 \pm 13.0\%$ 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.

2) GGA による感覚細胞障害軽減作用

今回, GGA 投与による HSP70 の発現を免疫組織学的に検討した結果, GGA の前処置により感覚細胞に一致して HSP70 の発現が増強し, 移行上皮, 暗細胞でも HSP70 の発現の増強が認められた.

HBSS 中で感覚細胞は8時間で 82%, 12 時間後で 73% が生存するが, 4 時間後に GM を添加したものでは感覚細胞の生存率は GM 添加1時間後に $54 \pm 11.6\%$, 2 時間後に $39 \pm 15.4\%$, 4 時間後で $17 \pm 16.9\%$ と時間経過とともに有意に減少し ($p < 0.01$), 8 時間後には $2 \pm 10.5\%$ と殆どすべての細胞が死んでいた. これに対して, GGA による前処置を行い HSP を誘導した場合には, 感覚細胞の生存率は GM 投与1時間後に $78 \pm 17.0\%$, 2 時間後に $71 \pm 14.1\%$, 4 時間後で $56 \pm 11.1\%$, 8 時間後では $43 \pm 13.6\%$ といずれも感覚細胞の生存率は有意に高くなっていた. (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 (5-7). このような観点から我々はフリーラジカルを制御することで内耳障害の予防や治療が可能になることを報告してきた. 今回, メニエール病に対する新しい薬剤を導入するためまず, わが国で広く用いられているイソソルビドの作用をフリーラジカルの観点から検討した結果, イソソルビドにフリーラジカルの産生を抑制する作用があること, その結果, ゲンタマイシンによる内耳障害の軽減作用があ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 (8), 今回の検討で, GGA の投与により内耳で HSP を安全に誘導できることが明らかとなり, HSP の誘導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. 今回の結果と我々のこれまでの検討をあわせて実際にメニエール病の治療を考えると, 現在のところ, レバミピド, プロブレジンク, ビタミン C, エダラボンなどのフリーラジカル抑制剤に加えて, GGA などの HSP 誘導剤, イソソルビドなど現在臨床的に使用可能な薬剤と考えられ実際の臨床応用の結果を検討すべきであると思われた (10).

【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. 1996, pp.142-143.
- 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. 1996, pp.144-145.
- 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. 1996, pp.146-147.
- 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* 1997;56:594-600.

- 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* 1997;59:317-321.
- 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* 1998;60:246-253.
- 7) Takumida M, Popa R, Anniko M. Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL* 1999;61:63-70.
- 8) 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* 2002;7:152-156.
- 9) Takumida M, Anniko M. Simultaneous detection of both nitric oxide and reactive oxygen species in guinea pig vestibular sensory cells. *ORL* 2002;64:143-147.
- 10) Takumida M, Anniko M. Brain derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol(Stockh)* 2002; 122:10-15.

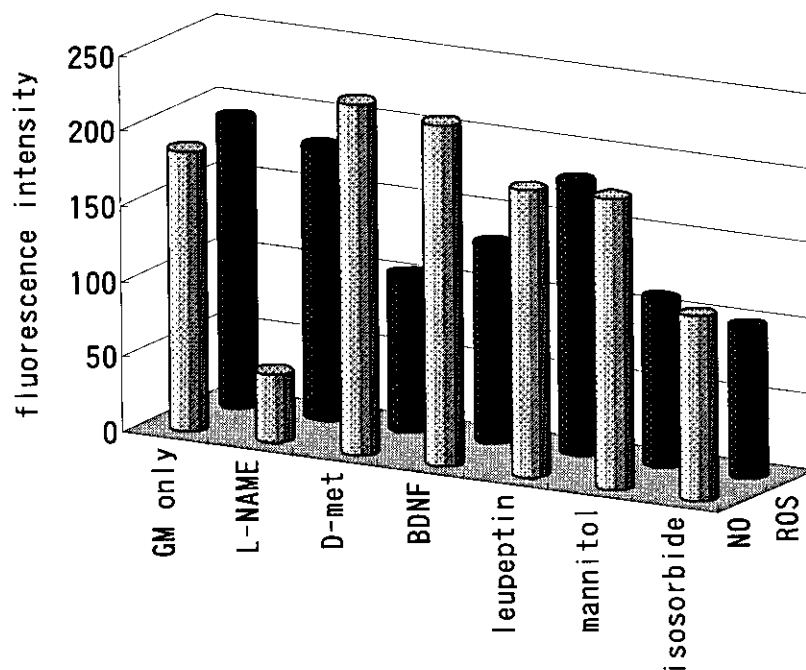


図 1: 各種薬剤による NO, ROS 産生の抑制

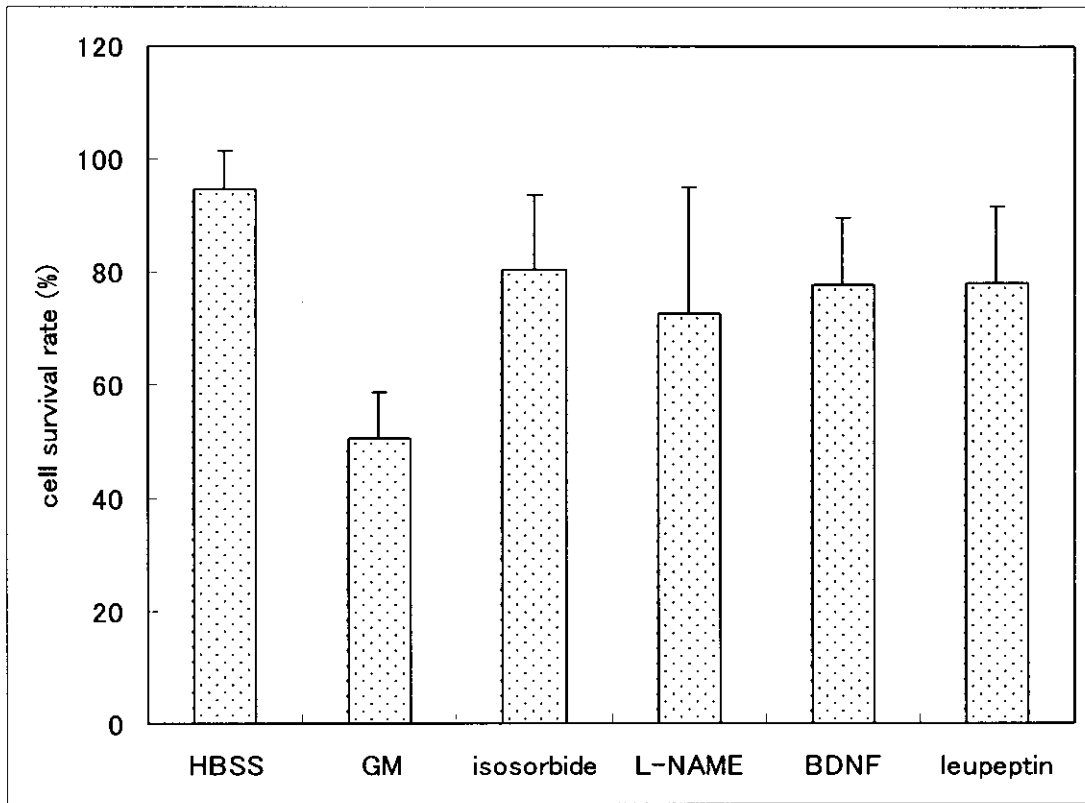
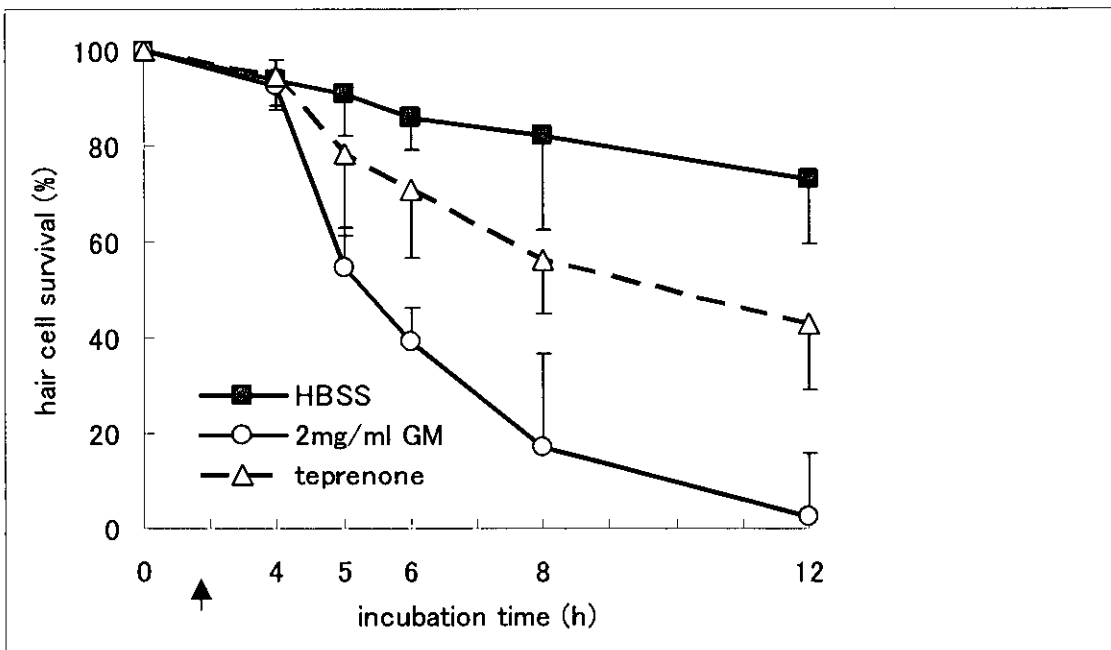


図 2: 各種薬剤による内耳障害軽減作用 (GM 投与 2 時間後)



↑: GM 投与

図 3: GGA による感覚細胞障害軽減

メニエール病における内耳水代謝に関する研究

分担研究者 竹田 泰三 高知医科大学教授

研究要旨 内耳液の水・電解質代謝を中心にメニエール病の病態生理, 治療について検討した. 蝸牛血管条の基底細胞と内リンパ囊上皮に, バソプレッシンで制御されるアクワポリン2とバソプレッシンの2型受容体(V2-R)が局在することを組織科学的に示した. 臨床結果と併せて, 内リンパ水腫形成にはバソプレッシン-アクワポリン2系が深く関与していることを報告した. 内リンパの産生過剰によって外リンパ腔が高カリウム化することを示し, メニエール病の病態生理に水腫に起因する外リンパ腔の高カリウム化が深く関与していることを報告した. 内リンパ囊閉塞モルモットの VOR gain を計測, 経時的に低下する傾向があることを示し, 内リンパ水腫は前庭機能に障害を与えることを見出した. 水腫の減荷は, V2-antagonist(OPC-31260), 浸透圧利尿剤や抗酸化剤が有効であることを示した. また, ヒスタミンが蝸牛神経の伝達物質である可能性を示し, ヒスタミン類似物質がメニエール病の治療薬と用いられる基礎的裏付けをした.

A. 研究目的

メニエール病をはじめとする内リンパ水腫疾患の成因, 病態と治療を検討する目的で, 9つの実験を施行した. 実験1では, バソプレッシン-アクワポリン2(VP-AQP2)による水代謝系の局在を検討した. 実験2では, 内リンパ水腫形成によって生じる鼓室階のKイオン濃度の変化を検討した. 実験3では, 内リンパ囊閉塞モルモットのVORを記録し, 水腫動物の前庭機能を評価した. 実験4, 5, 6では, 内リンパ水腫疾患の治療の基礎的裏付けを得る目的で行った. 実験4では, 内耳におけるヒスタミンレセプターの局在を, 実験5では, V2-antagonist(OPC-31260)の正円窓負荷が及ぼす内耳への影響を, 実験6では, edaravone(radical scavenger)が内リンパ水腫に及ぼす影響を検討した. 実験7, 8では, 浸透圧利尿剤 isosorbide と erythritol の内耳への影響を見た. Isosorbide では内耳脱水効果の反跳現象の有無を, erythritol では内耳脱水効果の有無について検討した. 実験9では, 血漿ADHと臨床像との関係を検討した.

B. 研究方法

実験1: Wistar rat の側頭骨の凍結切片を作成, 蛍光抗体法(Alexa 546)にてAQP2とV2-receptorの免疫染色を行いレーザー顕微鏡で鏡検した. 抗体はAnti-rat AQP2 antibody(Alomone Lab)とAnti-rat V2 receptor(Chemicon)を用いた.

実験2: 有色モルモットを用い, 蝸牛第2回転中

央階側壁に小孔を作成, EP測定と人工内リンパ液の注入を行い, 急性内リンパ水腫を作成する. 同時に, 第3回転前庭階の側壁に小孔を作成し, カリウムイオン電極を用いてカリウムイオン濃度の変化を計測した. 人工内リンパ液注入量は, 0.1から5 μ lとし, 注入時間はいずれも10分間とした.

実験3: 内リンパ囊閉塞モルモットのVOR gainを経時的に追跡した.

実験4: Wistar rat を用いて, H1, H2, H3レセプターの発現と局在をRT-PCR法と免疫組織学的に調べた.

実験5: V2-antagonist(OPC-31260)を正円窓負荷したモルモットの蝸牛中央階の容積変化を組織学的に評価した.

実験6: 内リンパ囊閉塞による内リンパ水腫形成に及ぼすedaravoneの影響を検討した.

実験7: isosorbide による内耳脱水効果の反跳現象の有無を内リンパ水腫モルモットを用いて組織学的に検討した.

実験8: erythritol にも浸透圧利尿剤として内耳脱水作用があるかどうかを検討した.

実験9: メニエール病症例において, グリセロールテスト, および蝸電図検査の結果と血漿ADH値の相互関係について検討した.

C. 研究結果

実験1: 蝸牛においては, 血管条基底細胞にV2R及びAQP2両者の発現を認めた. また内リンパ囊においては, V2Rは内リンパ囊上皮細胞の基

底側に、AQP2 は頂側に分布していた。

実験2:人工内リンパ液注入によりEPは増大し、前庭階K⁺濃度も増加した。人工内リンパ液注入が終了するとEPも前庭階K⁺濃度も注入前値へ回復傾向を示した。

実験3:内リンパ水腫動物では、1週目以降にVOR gainの低下を認め、前庭機能低下は内リンパ囊閉塞後、比較的早期に発現することが判った。

実験4:内リンパ腔容積はOPC負荷側で有意に減少が認められた(P<0.05, Cochran-Cox検定)。しかし、EPには何ら影響を与えなかった。

実験5:RT-PCR法では、H1,H2,H3 receptorともにmodiolusのみに発現していた。免疫染色では、H1,H2,H3 receptorともにラセン神経節のみに陽性に染まり、血管条やラセン靱帯、コルチ器などには陽性所見は認められなかった。neurofilament 200kD抗体との二重染色の結果より、H1, H2, H3 receptorの局在はI型細胞と判断した。

実験6:edaravoneを内リンパ囊閉塞直後より投与すると、内リンパ水腫の形成は抑制される。この効果は、edaravone投与を中止しても持続するが、一旦形成された水腫はedaravone投与で減荷することは出来なかった。

実験7:イソソルビドによる内リンパ腔の減荷効果は、投与後3時間目には軽度であるが発現している。6時間目では、内リンパ腔の減荷はさらに進むが(ANCOVA, P<0.0001)、イソソルビド投与後12時間目では内リンパ腔の減荷効果はほぼ消失していた。

実験8:erythritol負荷3時間後、内リンパ囊閉塞によって生じた内リンパ腔の膨化はerythritolの内耳脱水作用によって抑制された。

実験9:血漿AVPが高値を示した症例は39例(65%)であり、グリセロールテストの陽性例は28例(47%)、蝸電図でDominant -SPを示したのは42例(70%)であった。すべての検査で陰性であったものは1例のみであり、すべてに陽性であったものは13例あった。しかし、血漿ADH値とグリセロールテスト、蝸電図検査成績とは相関はなかった。

D. 考案

VP-AQP2系の水制御機構が血管条と内リンパ囊に局在し、内耳の水代謝はバゾプレッシンの制

御を受けることが判明した。実際、バゾプレッシンの拮抗薬であるOPC-31260は内リンパ水腫を減荷する。この薬剤の臨床応用には、今回の実験より正円窓経由の投与が可能であることが示された。

メニエール病の治療薬にはヒスタミン類似物質の構造を持つものが多いが、その作用部位は不明であった。今回の実験データより、内耳に直接作用している可能性が有ることが判明した。現在、広く行われている治療は、isosorbideによるmedical decompressionである。通常、日に三回に分けて服用されているが、この服用法は今回の実験結果からも適切であるように思われる。Isosorbideの難点はその味にあるが、erythritolはその問題点を解決してくれる薬剤であると思われる。

昨年の実験結果より、内リンパ水腫の形成にフリーラジカルが関与していることが判明したが、水腫形成初期に抗酸化剤を投与すれば、内リンパ水腫形成を恒久的に抑制する可能性がある事が今回の実験結果より期待される。内リンパ水腫疾患の眩暈・難聴の成因に外リンパ腔の高カリウムかがいわれてきたが、実験2の結果は、内リンパ水腫形成の急性期には前庭階の高カリウム化が起こることを示した。

内リンパ水腫動物が比較的初期より前庭障害が生じることを確認したが、これらの基礎実験よりメニエール病の病態生理の解明に今後取り組んでいきたい。

臨床面では、血漿VP値、グリセロールテスト、蝸電図検査を組み合わせればメニエール病は90%が確定診断でき、血漿VP値の計測は診断学的に極めて重要な意味があると考えられた。

E. 結論

メニエール病の病態生理にVP-AQP2形が深く関与し、内リンパ水腫軽減がメニエール病の治療の目標であることを実験的に示した。内リンパ水腫の減荷には、浸透圧利尿剤以外に抗酸化剤も有効であることを実験的に裏付けた。

F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Azuma H, Sawada S, Takeuchi S, Higashiyama K, Kakigi A, Takeda T.

Expression of mRNA encoding the H1, H2, and H3 histamine receptors in the rat cochlea. *Neuroreport* 2003;14: 423-425.

- 2) Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Okada T, Ando H, Suzuki M, Kakigi A. Aquaporin-1 (AQP1) is expressed in the stria vascularis of rat cochlea. *Hearing Res* 2003;181: 15-19.
- 3) Takeda T, Sawada S, Takeda S, Kitano H, Suzuki M, Kakigi A, Takeuchi S. The effects of V2-antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hearing Res* 2003;182: 9-18.

2. 学会発表

- 1) Takeda T, Takeda S, Kakigi A, Sawada S, Azuma H, Higashiyama K, Takeuchi S. Time-course of dehydratic effects of isosorbide on experimentally-induced endolymphatic hydrops in guinea pigs. 3rd International Symposium Inner Ear Pharmacology.
- 2) Takeda T, Takeda S, Takumida M, Kakigi A, Sawada S, Azuma H, Higashiyama K.. The effect of edravone on endolymphatic hydrops in guinea pigs. 40th Inner Ear Biology Workshop.
- 3) Takeda T. Symposium. Update clinical problem: Hormonal aspects of Meniere's disease on basis of clinical and molecular studies. The 7th Japan-Taiwan Conference in Otolaryngology-Head and Neck Surgery.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

急性内リンパ水腫の外リンパ腔 K⁺濃度 (第 2 報)

柿本章伸, 東山佳澄, 竹田泰三, 澤田正一, 山河和博
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚥下機能学教室)

【はじめに】

メニエール病の病理組織学的特長は内リンパ水腫であることはよく知られている。しかし、メニエール病の発作が発生する機序は未だ解明されていない。発作の機序に関しては、内耳圧の上昇、膜迷路破裂、外リンパ腔の高カリウムイオン(K⁺)化が考えられている。本研究は、反復性の発作を説明するには外リンパ腔の高 K⁺化が最も適していると考え、実験的内リンパ水腫動物を作成し、内リンパ水腫形成期の外リンパ腔 K⁺濃度を測定した。

【方法】

有色モルモット 8 匹を使用し、急性内リンパ水腫動物を作成し、同時に前庭階 K⁺濃度を計測した。手術は全身麻酔下に腹側から中耳骨胞を開放し蝸牛を露出させた。急性内リンパ水腫作成は、蝸牛第二回転から蝸牛内静止電位(EP)をモニターしながら、内リンパ腔内に人工内リンパ液を電動ポンプを用いて注入することによって行った。人工内リンパ液注入量は、0.1 から 5 μ l とし、注入時間はいずれも 10 分間とした。前庭階 K⁺濃度は、第 3 回転からダブルバレル K⁺電極を使用し測定した。

【結果】

図 1 に人工内リンパ液注入による前庭階 K⁺濃度と EP の経時変化の典型例を示す。人工内リンパ液注入により EP は増大し、前庭階 K⁺濃度も増加した。人工内リンパ液注入が終了すると EP も前庭階 K⁺濃度も注入前値へ回復傾向を示した。図 2 に人工内リンパ液注入量と前庭階 K⁺濃度の変化量を散布図に示す。人工内リンパ液の注入量が 3 μ l までは、前庭階 K⁺濃度の変化量は数 mM であった。5 μ l 注入では、前庭階 K⁺濃度は約 25mM 増加した。

【考察】

今回の結果から、急速に内リンパ腔容積の増大をきたした場合、前庭階の K⁺濃度は上昇することがわかった。これまでの我々の予備実験で、外リンパ腔に高 K⁺濃度の人工外リンパ液を還流した場合、K⁺濃度が 20mM 以上で蝸牛神経の活動電位が消失することを経験している。今回の研究では、5 μ l の人工内リンパ液を蝸牛管に注入した場合がこれに相当すると考えられる。内リンパ腔容積が 2 μ l であることを考えると、5 μ l の注入は多すぎるように思える。しかし、Rask-Andersen ら(1)が報告しているように、内リンパ嚢が内リンパ腔容積のリザーバー的役割を行っていること、以前我々が報告した(2)、2 μ l の人工内リンパ液を蝸牛管に注入した実験でも、軽度の内リンパ水腫しか見られなかったことから、5 μ l の注入はメニエール病の病態から大きく逸脱しているとはいえない。したがって、今回の研究は、メニエール病の発作が外リンパ腔の高カリウム化によるという仮説を支持する結果と考える。