

人工内リンパ液注入による前庭階K⁺とEPの経時変化

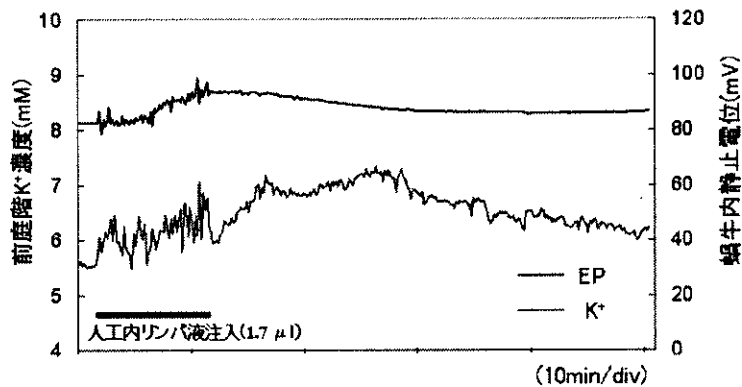


図1 人工内リンパ液注入による前庭階 K⁺濃度と EP の経時変化

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。

人工内リンパ液注入と前庭階K⁺濃度の変化

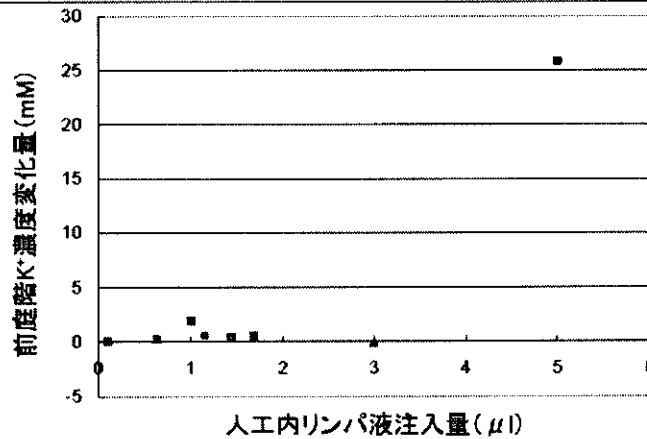


図2 人工内リンパ液注入量と前庭階 K⁺濃度の変化量
注入量が 5 μl になってはじめて、前庭階 K⁺濃度は有意に増加した。

【参考文献】

- 1) Rask-Andersen H, DeMott JE, Bagger-Sjoberg D, Salt AN. Morphological changes of the endolymphatic sac induced by microinjection of artificial endolymph into the cochlea. *Hear Res* 1999;138:81-90.
- 2) Kakigi A, Takeda T. Effect of artificial endolymph injection into the cochlear duct on the endocochlear potential. *Hear Res* 1998;116:113-8.

実験的内リンパ水腫モルモットに対するイソソルビドの影響

柿本章伸, 竹田泰三, 澤田正一

(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。したがって、内リンパ水腫を軽減することはメニエール病の根本的治療といえる。実際、臨床的には浸透圧利尿剤であるイソソルビドが広く使用されている。また、臨床および基礎研究において、浸透圧利尿剤の効果に関する報告が数多くなされている。その中でも、グリセロールは聴力改善効果があり、内リンパ水腫推定検査として使用されている。しかしながら、われわれのグループは、グリセロールにはリバウンド現象があるために治療薬として使用できないことを報告した(1)。イソソルビドに関しては、動物実験においてモルモットの内リンパ容積を軽減させることはすでに報告されている(2-7)が、その作用時間やリバウンド現象の有無についての詳細な検討はされていない。今回我われは、実験的内リンパ水腫モルモットにイソソルビドを経口投与し、経時的に内リンパ水腫の形態変化を観察し、その作用時間やリバウンド現象の有無を検討したので報告する。

【対象と方法】

40匹のモルモットを使用し、内リンパ管と内リンパ嚢を閉塞することにより内リンパ水腫動物を作成した。手術は、全身麻酔下に無菌的に行った。この内リンパ水腫動物を1ヶ月間飼育し、イソソルビド経口投与実験を行った。まず、コントロール群として10匹を使用し、精製水を経口投与(4ml/kg)した。残りの30匹を3群に分け、70%イソソルビド2.8g/kg(4ml/kg)を投与後、3, 6, 12時間後(各10匹)、経心灌流後に内耳を摘出し、組織学的検索を行った。標本は、セロイジン・パラフィン二重包埋を行い、薄切の後ヘマトキシリンエオジンにて染色し光学顕微鏡で観察した。内リンパ腔の容量変化は蝸牛軸を含む標本で行い、1蝸牛につき1標本とした。内リンパ腔の容量変化は、ライスネル膜の長さや中央階面積の変化を指標とした。図1にライスネル膜長と中央階面積の増加率の算出方法を示す。統計学的には、ライスネル膜長の増加率(IR-L)と中央階面積の増加率(IR-S)を散布図にプロットし回帰直線を求め、各群の回帰直線をANCOVAを用いて比較した。

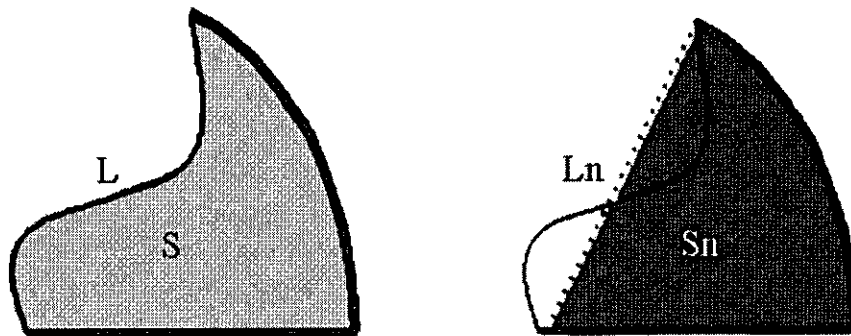


図1 ライスネル膜の長さや中央階面積の増加率の算出方法

ライスネル膜長の増加率(IR-L) : $\frac{\sum (L - L_n)}{\sum L_n}$

中央階蝸牛軸断面面積の増加率(IR-S) : $\frac{\sum (S - S_n)}{\sum S_n}$

L: 実際のライスネル膜の長さ L_n: ライスネル膜の接着部間の直線の長さ

S: 実際の中央階の面積 S_n: ライスネル膜をL_nとした中央階の面積

【結果】

図 2 に各群の組織像を示す。コントロール群においては中央階に著明な水腫を認め、ライスネル膜は高度に伸展している(図 2A)。インソルビド投与後 3 時間目には軽度の内リンパ減圧が認められる(図 2B)。インソルビド投与後 6 時間目では、内リンパ減圧はさらに進んでいる(図 2C)。インソルビド投与後 12 時間目では、いったん減少した中央階の容積が増加傾向を示している(図 2D)。図 3 にライスネル膜長の増加率と中央階面積の増加率の関連をグラフに示している。各群の回帰直線を以下に示す。

コントロール群:	IR-S =	4.1 + 1.2 × IR-L	R2 = 0.99
インソルビド投与後 3 時間群:	IR-S =	7.8 + 0.9 × IR-L	R2 = 0.88
インソルビド投与後 6 時間群:	IR-S =	-7.5 + 0.9 × IR-L	R2 = 0.86
インソルビド投与後 12 時間群:	IR-S =	-1.5 + 1.3 × IR-L	R2 = 0.87

回帰直線が下方に移動するほど内リンパ減圧がなされていることを意味している。図 2 で見られたように図 3 のグラフでもインソルビド投与後 6 時間目で最もグラフが下方に移動しており、内リンパ減圧が最大となっている。12 時間後の回帰直線はコントロール群の回帰直線とほとんど差がなくなっている。各群間で回帰直線を ANCOVA を用いて比較したところ、表 1 に示すごとく、インソルビド投与後 6 時間群の回帰直線が最も下方に移動し、インソルビド投与後 12 時間群でいったん下方移動した回帰直線が上方移動しコントロール群と有意差がなくなっていた。

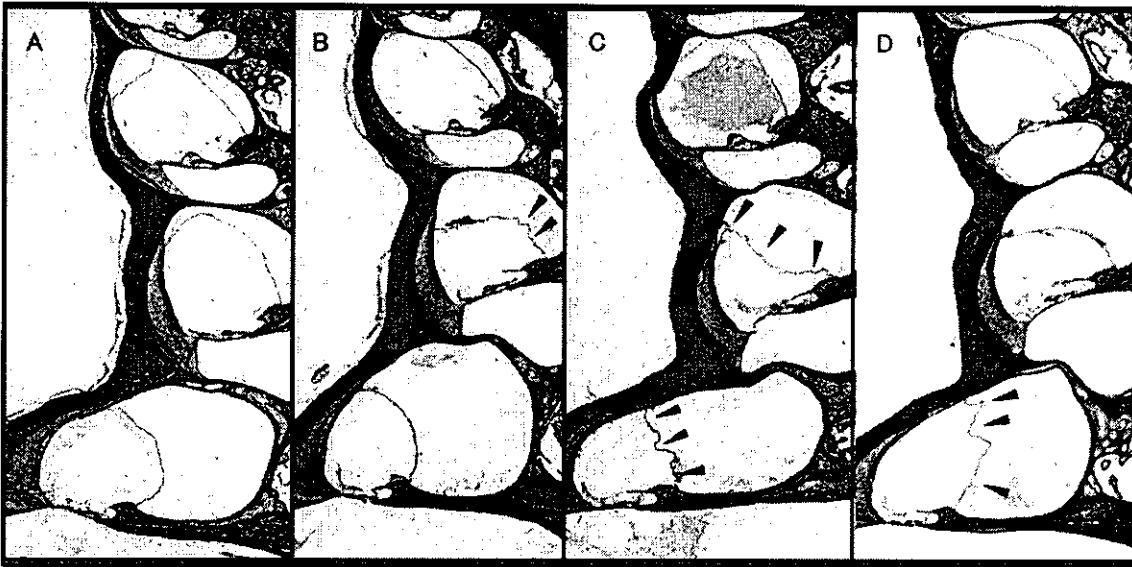


図2 各群における組織学的変化

A:コントロール群 B:インソルビド投与後3時間群 C:インソルビド投与後6時間群
 D:インソルビド投与後12時間群
 矢頭は内リンパ減圧されている部位を示す。

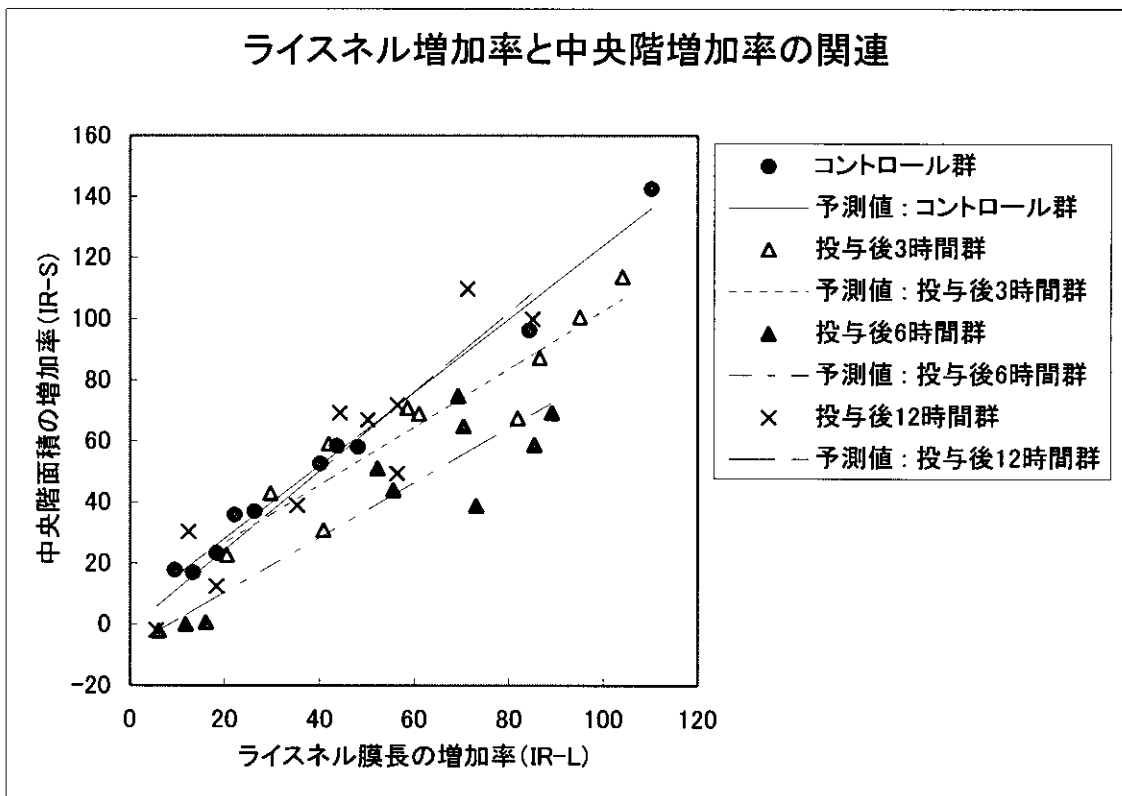


図3 ライスネル膜長の増加率と中央階面積の増加率の関連

	イソソルビド投与 後 3 時間群	イソソルビド投与 後 6 時間群	イソソルビド投与 後 12 時間群
コントロール群	P < 0.01	P < 0.01	N. S.
イソソルビド投与後 3 時間群		P < 0.01	N. S.
イソソルビド投与後 12 時間群			P < 0.01

表 1 各回帰直線間の統計学的解析

イソソルビド投与後 3 時間群とコントロール群との間に有意差を認め、3 時間群と 6 時間群の間でも有意差を認めた。このことは、3 時間群から回帰直線が有意に下方移動し、6 時間群でさらに下方に移動したことを表している。6 時間群と 12 時間群では有意差があり、12 時間群とコントロール群では有意差がなくなっており、いったん下方移動した回帰直線が上方移動したことを表している。

統計学的検討は ANCOVA を使用。P < 0.01: 有意水準 0.01 未満で有意差あり。N. S.: 有意差なし。

【考察】

イソソルビドは浸透圧利尿剤であり、メニエール病の治療薬として広く使用されている。今回の結果から、グリセロールのようなリバウンド現象は認めなかった。同じ浸透圧利尿剤でありながら、一方はリバウンド現象があり、もう一方にはリバウンド現象が存在しなかった理由としては以下のような機序が考えられる。内耳には、血管脳関門と同様に血管外リンパ関門という概念がある。Duvall ら (8) によると、血管外リンパ関門の大きさは 8 Å と報告されている。グリセロールの直径は 6.2 Å であり、イソソルビドは長径が 7.9 Å である。このことから、どちらも内耳外リンパ腔には入ることができる。外リンパ腔に入ることにより、内リンパ減圧が行われると考えられる。その後、グリセロールは内リンパ腔に移動するため、外リンパから内リンパへ水が再移動しリバウンド現象が発生する。イソソルビドではこのリバウンド現象が起きないのは、イソソルビドが内リンパ腔へ移動できないもしくは、移動しにくいためと考えられる。これに関する報告としては、Johnstone と Robertson (9) が内外リンパ腔間の関門は血管外リンパ関門よりも小さいと報告している。このことから、イソソルビドは内リンパ腔内に入ることができないかもしくは困難であるためリバウンド現象が発生しないと考える。

今回の、実験結果ではイソソルビドの内リンパ減圧は 6 時間目が最大であり、12 時間目でコントロール群の状態に回復していることがわかった。実際の臨床においては、イソソルビドは 1 日 3 回毎食後に服用しており、投与方法も妥当なものとする。以上より、イソソルビドはメニエール病の治療薬として有用と考える。

【参考文献】

- 1) Takeda T, Takeda S, Saito H, Hamada M, Sawada S. The rebound phenomenon of glycerol-induced changes in the endolymphatic space. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 341-4.
- 2) De Vincentiis I, Celestino D, Iannetti G. New pathogenic and therapeutic conceptions in Meniere's disease. *Minerva Otorhinolaryngol* 1972; 22: 223-8.
- 3) Duvall AJ, Santi PA, Hukee MJ. Cochlear fluid balance. A clinical/research overview. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; 89: 335-41.
- 4) Kitahara M, Takeda T, Yazawa Y, Matsubara H, Kitano H. Treatment of Meniere's disease with

isosorbide. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1982; 44:232-8.

- 5) Juhn SK, Prado S, Pearce J. Osmolality changes in perilymph after systemic administration of glycerin. *Arch Otolaryngol* 1976; 102: 683-5.
- 6) Kitahara M, Takeda T, Yazawa Y, Matsubara H, Kitano H. Experimental study on Meniere's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1982; 90: 470-81.
- 7) Takeda T, Takeuchi S, Saito H. Effect of glycerol on pressure differences between perilymph and endolymph. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1990; 110: 68-72.
- 8) Duvall AJ, Santi PA, Hukee MJ. Cochlear fluid balance. A clinical/research overview. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1980; 89: 335-41.
- 9) Johnstone BM, Robertson D. The physiology and biophysics of hydrops. In: Vosteen et al (eds) *Meniere's Disease*, New York: Thieme-Stratton Inc 1981,pp.44-46.

モルモットの VOR 測定法

山河和博, 柿木章伸, 澤田正一, 東 祐史, 竹田泰三
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚙下機能統御学教室)

【はじめに】

モルモットは、内耳障害モデルとして様々な実験に用いられる。その前庭機能定量化の方法として VOR gain 測定がある。VOR gain 計測には、安定した眼球運動記録が必要であるが、その方法として確立したものはない。今回、赤外線 CCD カメラを用いた簡便かつ安定したモルモット VOR 測定法を構築したので、その概要を報告する。

【対象と方法】

240–270g の有色モルモットを使用。正常 3 匹、うち 1 匹は前庭導水管閉塞術により片側内リンパ水腫を作成し、水腫作成 1, 2, 3 週後に VOR gain を測定した。

動物の固定には、ノーズホルダー、左右のイヤバーからなる固定具を用い、3 点固定することで、体動を排除することができた。検査装置は、電動ターンテーブル、赤外線 LED、CCD カメラ、角速度センサーからなり(図 1)、ターンテーブルにモルモットの両側半規管の中心が回転中心になるように固定した。ターンテーブルは、コンピュータ制御で任意の角速度での振子様回転が可能である。今回は振子様運動の最大角速度を 45 度に設定し、周波数は 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8Hz で測定を行った。

暗所で虹彩に赤外線を照射し、瞳孔と虹彩との間にコントラストをつけることにより瞳孔を識別した。眼球を赤外線 CCD カメラで撮影し、Hi-8 ビデオテープに録画、音声端子を利用して頭部角速度を眼球運動と同時に記録した。眼球運動は識別した瞳孔の形状を楕円近似して計測した。

眼球運動解析は専用ソフト(IRN-1, モリタ製作所, 日本)を用いて行った。頭部運動角速度に対する眼球運動角速度を 1/30 秒ごとにプロットし、散布図を直線回帰し、その傾きを gain とした(図 2)。

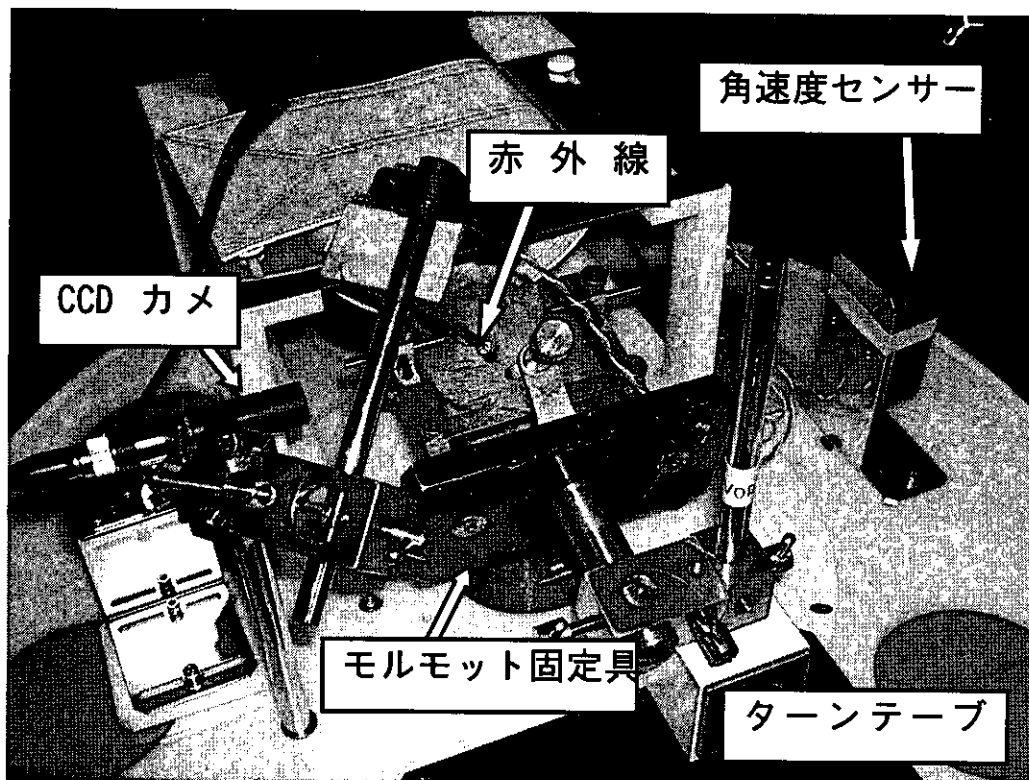


図1:測定装置の外観

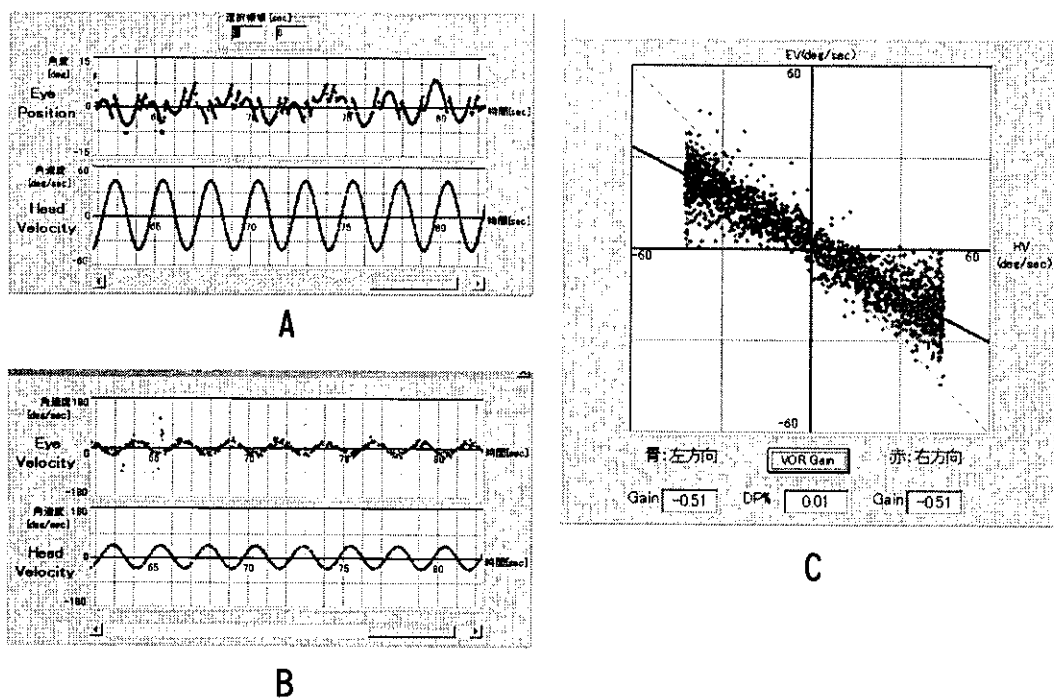


図2 A: 頭部運動角速度波形と、対応する眼球位置原波形。
 B: 頭部運動角速度波形と、対応する眼球運動速度波形。
 C: 横軸を頭部角速度、縦軸を眼球角速度とした散布図の直線回帰。回帰直線の傾きが左右それぞれの VOR gain となる。

【結果, 考察】

正常動物の VOR gain の結果を図 3 に示す. VOR gain は各周波数で比較的一定しており, 約 0.5 であった.

内リンパ水腫動物では, 1 週目以降に VOR gain の低下を認め(図 4), 内リンパ水腫作成動物は, 比較的早期に前庭機能低下を来すことを示唆する結果であった.

VOR gain

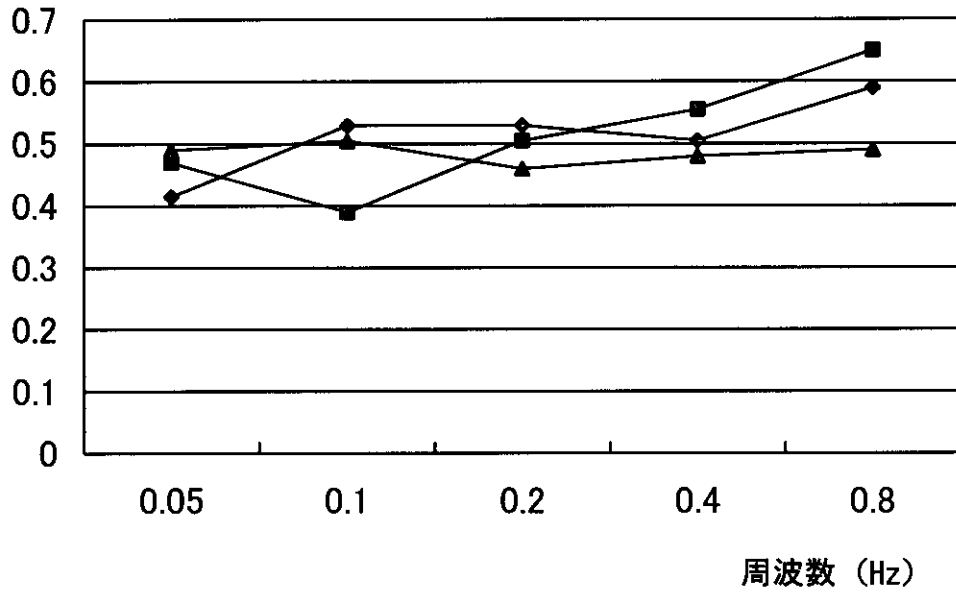


図3: 正常モルモット 3 匹の VOR gain.

VOR gain

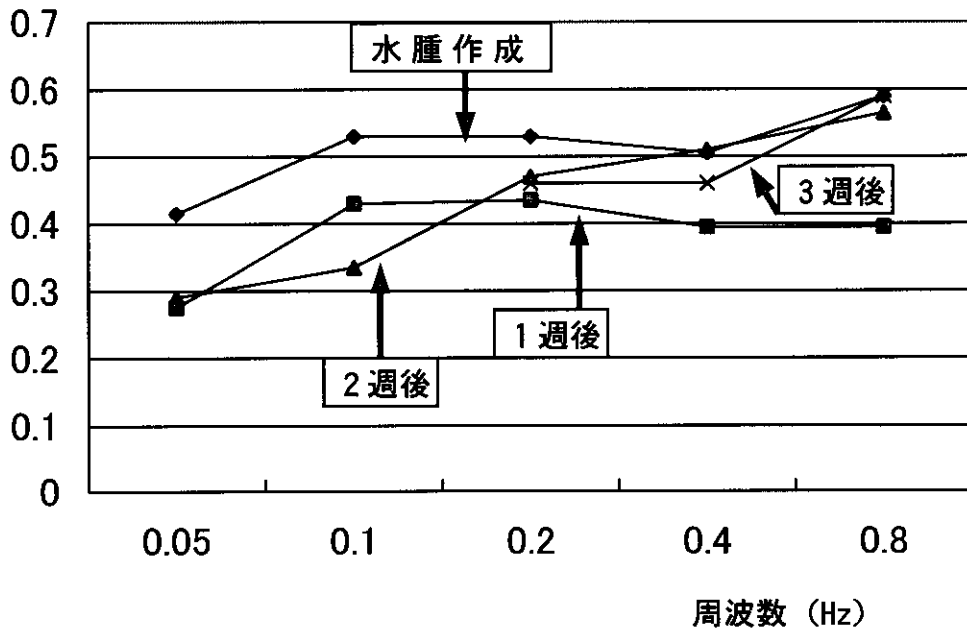


図4: 内リンパ水腫作成動物の水腫作成前, 作成 1 週後, 2 週後, 3 週後の VOR gain.

本システムは、赤外線 LED を用いることで、低侵襲で簡便に眼球運動測定が可能であった。本システムで眼球運動を安定して計測するためには以下の 2 つのポイントがあることがわかった。1 つ目は、瞳孔と虹彩のコントラストを際立たせ、瞳孔を正確に識別するには有色モルモットを用いる必要があること。2 つ目は、測定時瞬目のアーチファクトを避けるため顔面神経ブロックを行い、瞬目を止める必要があることである。VOR gain の解析は、専用の解析ソフトを用いて即座に可能であり、モルモットの前庭機能評価に有用と考え、今後様々な内耳障害動物の VOR 測定を行う予定である。

Edaravone の内リンパ水腫に及ぼす影響—第2報—

竹田泰三, 柿木章伸, 澤田正一, 東 祐史, 東山佳澄
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚥下統御学教室)
工田昌矢(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】

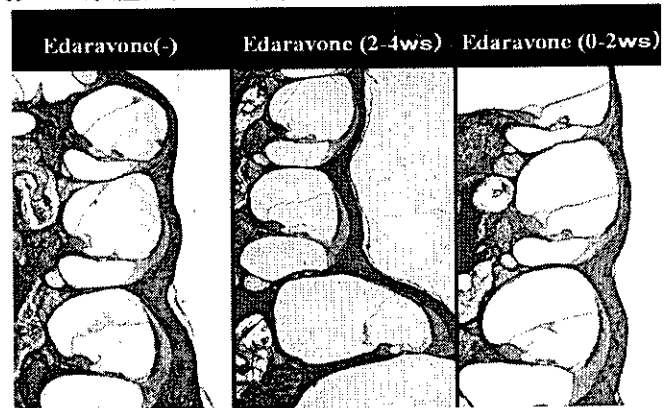
昨年, 内リンパ囊閉塞による内リンパ水腫形成の初期に Reactive oxygen species (ROS)が内耳に産生されることを報告した1). この ROS の産生は, 代表的な Free Radical Scavenger の1つである edaravone を投与すると著明に抑制されると同時に, 内リンパ水腫形成もかなり阻止されることを示した. この結果は臨床応用の観点から極めて興味深い, 以下のような疑問もわいてくる. edaravone の投与を中止したら, 再び, 水腫の形成が始まるのか? または, 一旦形成された水腫は edaravone 投与によって減量されるのか? 今回の報告では, この点に光を当ててみた.

【方法】

内リンパ囊閉塞モルモット30匹を用い, 閉塞後4週間飼育した. これらのモルモットを, 各10匹ずつ, 3群に分けた. まず, edaravone を全く投与しなかった無投与群, 内リンパ囊閉塞より2週間 edaravone を投与した初期投与群, 内リンパ囊閉塞2週間より4週後まで edaravone を投与した後期投与群の3群である. Edaravone の投与は腹腔内とし, 投与量は 5 mg/kg/日とした. 閉塞後4週間後, 全動物は組織学的検索に供された. 組織学的検討は, HE 染色の蝸牛軸切片よりライスネル膜長と内リンパ腔面積を計測し, ライスネル膜の伸展度(%), 中央階の膨化度(%)を求めた.

【結果】

図1に代表的な組織像を示す. Edaravone 無投与動物, 後期投与動物では, 内リンパ腔は膨隆しており, 内リンパ水腫が顕著である. しかし, 初期投与動物では内リンパ水腫は極めて軽度である. 無投与群, 初期投与群, 後期投与群の3群のライスネル膜の伸展度(%), 中央階の膨化度(%)を検討すると, ライスネル膜の伸展度(%)はそれぞれ, 138.4 ± 33.5 , 113.4 ± 7.4 , 140.9 ± 22.2 , 中央階の膨化度(%)は, 152.6 ± 39.7 , 117.5 ± 9.3 , 162.1 ± 40.0 であった. ライスネル膜の伸展度, 中央階の膨化度とも無投与群と後期投与群との間では有意の差は認められないが (ANCOVA), 初期投与群と無投与群, 後期投与群との間には有意の差が認められた (Cochran-Cox 検定, $P < 0.05$).



【考案・結論】

edaravone 後期投与群で内リンパ水腫が減荷されなかったのは予想していた結果であった. 既に生じた組織損傷を OH-radical scavenger である edaravone が修復できるとは考えられないからである. しかし, edaravone 初期投与群で内リンパ水腫形成が著明に抑制された結果は予想に反した. 内リンパ囊が閉塞されていることは組織学的に確認されているので, 従来の考え方では, 内リンパ液の吸収が阻害されて内リンパ腔に内リンパ液の貯留が生じると考えられる. 今回得られた結果から二つの可能性が考えられる. 第一の考え方は, 内リンパ囊は内リンパ液の吸収の場ではない. 内リンパ囊閉塞実験で内リンパ水腫が形成されるのは内リンパ囊

の閉塞操作に伴う炎症機転で液の分泌を促すためであるとする考えである。第2の考えは内耳液の **auto-regulation** 機構の破綻が **edaravone** の初期投与によって避けられたとする考えである。近年、ライスネル膜を含めて内リンパ腔上皮が内リンパ液の電解質や水のホメオスターシスに関与して、内耳液の **auto-regulation** を行っていることを示唆する証拠が報告されている。内リンパ囊の閉塞は内リンパ液の貯留を促し、内リンパ腔を囲む上皮はそれぞれの弾性に応じて進展する。その結果、内リンパ腔上皮の組織は損傷して、内耳液の **auto-regulation** 機構が破綻する。この組織障害は、内リンパ囊が閉鎖された直後、急激に内リンパ腔が膨隆する時期に強いと予想される。しかし、この組織損傷は **edaravone** を初期投与することによって免れ、内耳のイオン・水の恒常機構が保たれ、内リンパ囊閉塞2週目以降も内リンパ液の貯留が解消されたと考えられる。

このいずれの立場が実態を反映しているか現時点で決定することは難しい。しかし、内リンパ水腫は内リンパ囊閉塞後2ヶ月前後まで徐々に伸展することより、水腫形成の原因を内リンパ囊閉塞に伴う炎症機転に起因させる考えを支持するのは難しいと考えられる。

【参考文献】

- 1) 竹田泰三, 工田昌也, 柿木章伸, 澤田正一, 竹内俊二. 内リンパ水腫が及ぼす内耳フリーラジカルへの影響. 前庭機能異常に関する調査研究. 平成14年度 総括・分担研究報告書 2003,pp.95-97.
- 2) Yeh TH, Tsai MC, Lee SY, Hsu MM, Tran Ba Huy P. Stretch-activated nonselective cation, Cl⁻ and K⁺ channels in apical membrane of epithelial cells of Reissner's membrane. *Hear Res* 1997;109: 1-10.

Erythritol による内リンパ水腫減荷効果

竹田泰三, 柿木章伸, 澤田正一, 東 祐史, 東山佳澄
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚥下統御学教室)
竹内俊二(県立幡多けんみん病院 耳鼻咽喉科)

【はじめに】

イソソルビドに代表される浸透圧利尿剤は、メニエール病の代表的治療薬として広く用いられている。しかし、薬剤の味は極めて不良で、服用する患者に多くの精神的負担をかけているのが現状である。内リンパ水腫の薬物的減荷薬の条件は、浸透圧利尿剤が持つ Rebound 現象^{1, 2)}を避けるため、分子径がグリセロールより大きく、イソソルビドより小さい薬剤が望まれる。さらに、非代謝性物質で、生物学的にも非活性物質で有ることが必須条件である。4炭糖、erythritol はこの条件をすべて満たし、また甘味料として用いられていることより味の点でも良好である。本実験では、この erythritol が内リンパ水腫を減荷する効果を有するかどうかを検討したので報告する。

【方法】

実験動物は内リンパ嚢閉塞 4 週間目の Hartley 系モルモット20匹である。そのうち10匹には erythritol を投与し、7匹は erythritol 投与3時間後に残りの3匹は4時間後に組織学的検索に供された。Erythritol は 2.8g/kg を経口投与した。組織学的検索は、HE 染色の蝸牛軸切片よりライスネル膜長と内リンパ腔面積を計測し、ライスネル膜の伸展度(%), 中央階の膨化度(%)を求めた。

【結果】

図1に代表的な組織標本を示す。内リンパ腔は、内リンパ嚢閉塞側、非閉塞側とも明確な虚脱を示す。この虚脱は、erythritol 投与3時間後でも4時間後でも認められる。図2に、無負荷動物 10耳と erythritol 負荷耳7耳のライスネル膜の伸展度(%)と中央階の膨化度(%)の散布図とそれらの回帰直線を示す。図に示すように、ライスネル膜の伸展度と中央階の膨化度は一次相関があり、統計的に線形に回帰する。回帰直線は、正常耳は $Y=0.82X+11.1$, erythritol を負荷された内リンパ嚢閉塞耳では $Y=0.82X-2.84$ であった。統計的には、回帰係数には有意差はないが、定数項は有意差が認められた。すなわち、erythritol 負荷によって、ライスネル膜伸展度と中央階膨化度の回帰直線は下方に shift し、ライスネル膜が伸展しているのも拘わらず、内リンパ腔の虚脱によって内リンパ腔の膨化が抑制されたことを意味する。

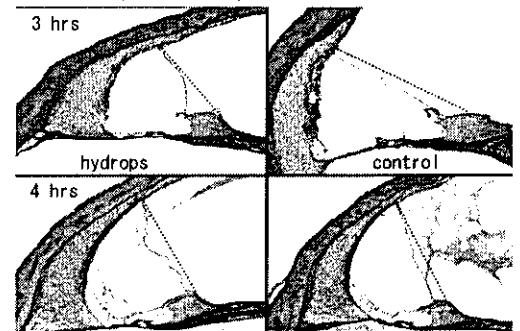
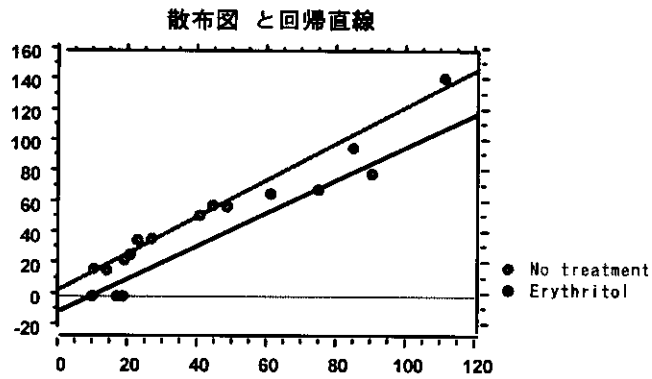


図1 Erythritol 負荷3時間, 4時間後の組織像

【考案・結論】

Erythritol は蔗糖に似た純粋な甘みに加えて、軽度の酸味が有り、清涼感を伴うため、優れた人工甘味料として広く用いられている。さらに、カロリーはほぼゼロ(0.4Cal/g)で、非代謝性で、尿に排泄される。毒性に関しても、動物毒性試験では無毒性で、浸透圧利尿剤として臨床応用するには極めて優れた特性を有する。今回の実験結果では、isosorbide や glycerol と同様の内耳脱水効果があることが判明した。この効果の rebound 現象の有無が、メニエール病の治療薬として用いられるための大きな key point になるが、少なくとも erythritol 投与4時間後には内耳虚脱が見られ、rebound 現象は発現されていなかった。今後、更に長時間後の内耳容積の経過を追跡する必要がある。



【参考文献】

- 1) Matsubara H, Kitahara M, Takeda T, Yazawa Y. Rebound phenomenon in glycerol test. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh) 1985;419:115-122.
- 2) Takeda T, Takeda S, Saito H, Hamada M, Sawada S. The rebound phenomenon of glycerol-induced changes in the endolymphatic space. Acta Otolaryngol (Stockh) 1999;119: 341-344.

V2拮抗薬(OPC-31260)の正円窓負荷による内耳への影響

竹田泰三, 柿木章伸, 澤田正一, 東 祐史, 東山佳澄
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚥下統御学教室)
竹内俊二(県立幡多けんみん病院 耳鼻咽喉科)

【はじめに】

内リンパの水代謝は vasopressin の制御下にあることは既に報告した 1). 実際, ラット内耳の AQP2 mRNA は V2-antagonist(OPC-31260)によって down-regulation し, OPC-31260 の鼓室階注入は内リンパ水腫を減荷する事を示した 2). OPC-31260 で内リンパ水腫が減荷されることは, 内リンパ水腫の治療を考える場合非常に興味深い現象であるが, この現象を治療に応用するには, より侵襲の軽微な内耳への投与方法が求められる. 今回は, OPC-31260 を正円窓に留置して同様の内耳減荷効果があるかどうかを検討した. さらに, OPC-31260 の正円窓負荷が, V2-receptor や aquaporin2 が局在する血管条に toxic に作用するかどうかを検討するため EP への影響についても検討した.

【対象と方法】

体重 300g 前後の Hartley 系モルモット9匹を用いた. そのうち, 6匹は OPC-31260 正円窓負荷による内リンパ腔容積への影響を, 残りの3匹はEPへの影響を検討するのに用いられた. なお, OPC-31260 の正円窓負荷は, OPC-31260 を粘性多糖類, キサンタンガムに混入(重量比5:1), 微量の精製水でジェル状クリームとし, 正常モルモットの左側正円窓上に2日間留置することによってなされた.

1)内リンパ腔容積の評価:OPC-31260 の正円窓負荷後, 深麻酔下で灌流・固定・断頭し, 側頭骨の組織学的検討に供された. 内リンパ腔容積の評価は, HE 染色された蝸牛軸切片より内リンパ腔の占める面積を Olympus 製 Video Micrometer(VM-30)で計測, ライスネル膜が伸展のない理想的な状態(図1, 破線)における内リンパ腔面積よりの比率, 内リンパ腔面積変化率(%)を求めて行った.

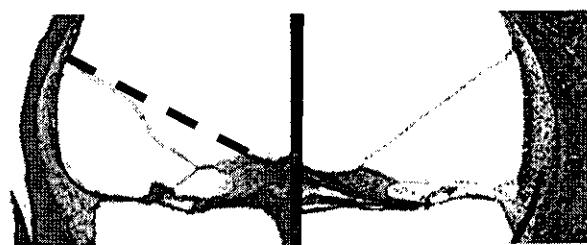


図1 OPC 負荷側と無負荷側の蝸牛軸切片

2)EP の計測:OPC-31260 の正円窓負荷2日後に, 顎下部より下鼓室骨胞を開放し, 蝸牛を明視下に置く. しかる後に, 第2回転蝸牛骨胞の血管条が透見する部位に小孔を作成, 2 mol/L KCl に満たされた微小ガラス電極を挿入, 出力を WPI 製 DC アンプ (Electrometer Model FD223) で増幅し, Powerlab/4S を経由して, パーソナルコンピュータ (Mac PowerPC 8100) に入力し, データ保存と記録出力を行った.

【結果】

1)内リンパ腔容積の評価:

図1に OPC 負荷側と無負荷側の蝸牛軸切片の組織像を示す. OPC 負荷側では内リンパ腔の虚脱が見られる. 内リンパ腔の面積変化率は OPC 負荷側では -9.2 ± 10.7 , 無負荷側では 4.7 ± 1.1 で, 有意に OPC 負荷側で内リンパ腔容積の減少が認められた ($P < 0.05$, Cochran-Cox 検定).

2)EP の計測:

EP は, 図2に示すように, OPC 負荷側と無負荷側で明確な差はなく, それぞれ 84.5 ± 1.5 mV, 80.7 ± 3.2 mV で, EP の低下は認められなかった.

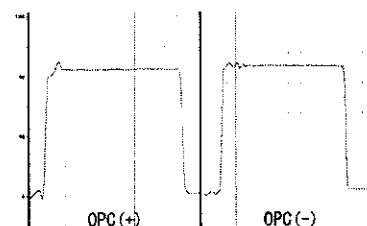


図2 EP 記録 EP は 80 mV 以上有り, 正常と判断された.

【考案・結論】

OPC-31260 は正円窓経由でも内耳に浸透し、内リンパ腔に脱水効果を示すことが今回の実験で明らかになった。光顕レベルでは、V2 レセプター、AQP2が局在する血管条には著明な組織損傷は見られなかった。また、血管条に起源を持つEPはOPC-31260の負荷によって影響を受けなかったことより、OPC-31260に内耳毒性はあっても、軽度のもと考えられた。メニエール病の病態生理は未だ十分解明されてはいないが、治療は内リンパ水腫の減荷にある。今回の結果は、OPC-31260によるメニエール病治療の可能性に道を開いた。

【参考文献】

- 1) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada S, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hearing Res* 2000;140: 1-6.
- 2) 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.

内リンパ嚢における V2 receptor 及び Aquaporin-2 の局在

澤田正一, 東 祐史, 山河和博, 柿木章伸, 竹田泰三
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚙下統御学教室)

【はじめに】

腎集合管では Vasopressin によって水の再吸収を促進しており, その作用は V2 receptor (V2R) に vasopressin が結合することにより, 選択的水チャネルである Aquaporin-2 (AQP2) を頂側膜に発現させることによって制御される. 蝸牛や内リンパ嚢においては, V2R 及び AQP2 が mRNA レベルで発現しており, これらは Vasopressin により regulate されている¹⁾. しかしながら, 蛋白レベルでの局在は未だ不明であり, その役割は明らかではない. 今回我々は, Vasopressin の内耳での水代謝における機能を明らかにすべく, 蝸牛及び内リンパ嚢における V2R 及び AQP2 の局在を検討した.

【方法】

Wistar 系ラット 2 匹(4 耳)を用いた. ペントバルビタール深麻酔後, リン酸バッファー (PBS) で経心灌流, 続いて 4%パラホルムアルデヒド+PBS にて灌流施行. ただちに内耳を摘出, 4%パラホルムアルデヒド+PBS で 4°C overnight で固定を行った. 脱灰は施行せずに TissueTek に包埋し, クライオスタットで薄切(7 µm). 10%正常ヤギ血清でインキュベート後, 一次抗体で 4°C overnight し, 続いて二次抗体 (Alexa 546 anti-rabbit IgG) で6時間インキュベートした. 50%グリセロールでマウントし, 共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss, LSM410) にて鏡検した.

【結果】

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 (図1). また内リンパ嚢においては, V2R は内リンパ嚢上皮細胞の基底側に, AQP2 は頂側に分布していた (図2). また, 同時に行ったネガティブコントロール (免疫吸収試験) では染色を認めなかった.

【考察】

我々はこれまで内耳での AVP の発現, また AVP 投与における内リンパ水腫形成など, 内リンパ水腫と AVP の関連について報告してきた. 蝸牛及び内リンパ嚢においては, V2R 及び AQP2 の mRNA が発現し, バゾプレッシンにより up-regulation¹⁾ すること, また, V2R の antagonist である OPC-31260 は急性投与により, V2R 及び AQP2 mRNA は down-regulation すること²⁾ など既に報告した. 生理実験では, Vasopressin 慢性投与では内リンパ水腫を惹起し³⁾, 内リンパ水腫動物に OPC-31260 を慢性投与することにより, 水腫は減少し collapse を起こすことが分かった²⁾. これらの結果から, Vasopressin は内耳水代謝に重要な役割を担っており, メニエール病などの内リンパ水腫の病態への関与も示唆される.

外リンパと内リンパでは, 内リンパの方が浸透圧が高く, 今回の結果から, 血管条基底細胞に存在する V2R 及び AQP2 は, その数を増減することにより, 外リンパから内リンパへの水の流れを制御している可能性がある. また同時に, 内リンパ嚢では AQP2 が内リンパ嚢上皮に発現しており, 内リンパの水の吸収を行っていると思われる. つまり, AQP2 が増えることにより, 外リンパから血管条を経由して, 内リンパへ水が流れ, さらに内リンパ嚢から内耳の外へ運び出される経路が Vasopressin により調節されている可能性が考えられる. もしこの仮説が正しいとすれば, 正常者においては内リンパ嚢機能が正常であり, 生理的な Vasopressin の変動では水腫が起こらず, メニエール病患者においては, 内リンパ嚢の機能が低下しており, ストレスによる Vasopressin の異常な増加により, 内リンパ水腫を形成または悪化しているのかもしれない. ただし, 内リンパ水腫の結果, 内リンパ嚢の受容体を増やし, 水腫を軽減するために, Vasopressin が上昇しているという可能性も否定できない. 今後, 臨

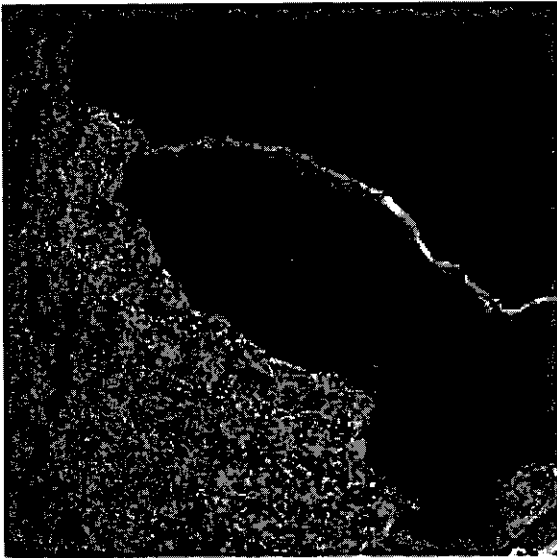
床例において、AQP2 がどう関与しているか検討する必要があると思われる。

【参考文献】

- 1) Sawada S, et al. Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *NeuroReport* 2002;13:1127-9.
- 2) Takeda T, et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res* 2000;140: 1-6.
- 3) Takeda T, et al. The effects of V₂-antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res* 2003;182: 9-18.

図1

A) V2R(血管条)



B) AQP2(血管条)

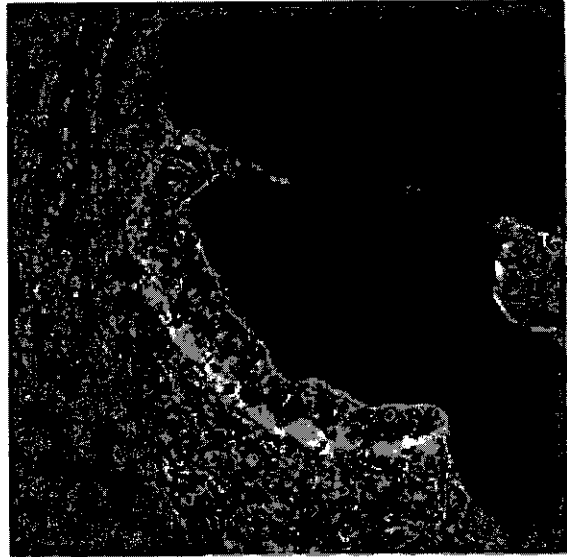
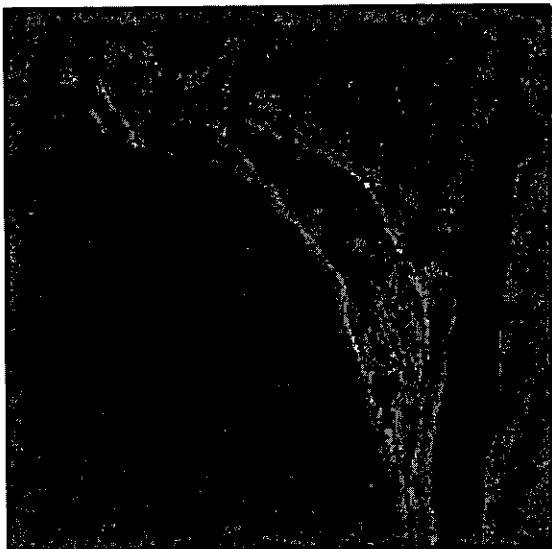


図2

A) V2R(内リンパ囊)



B) AQP2(内リンパ囊)



メニエール病及び関連疾患における血漿バゾプレッシン値とその臨床像について

澤田正一, 東 祐史, 山河和博, 柿木章伸, 竹田泰三
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚥下統御学教室)

【はじめに】

我々はこれまで、メニエール病(以下、メ病)及び内リンパ水腫疾患において、血漿バゾプレッシン(AVP)が高値を示す症例が多いことから、内耳での水代謝に AVP が非常に大きな役割を演じ、また内リンパ水腫との関連について様々な傍証を報告してきた。最近では、慢性の AVP 投与がモルモットにおいて内リンパ水腫を惹起すること、また AVP 作動性の水チャネルである Aquaporin-2 (AQP2)がラット内耳で血管条と内リンパ囊に存在し、それらが AVP によって制御されていることを報告した。このように、内耳における Fluid homeostasis には AVP は非常に重要であることは間違いないと思われる。一方、メ病のめまいには、ストレスが関与していることは、様々な報告があり、また臨床経験上、誰しもが感じるところであろう。ストレスによって様々なホルモン動態が変化するが、中でも CRH や AVP はその代表的なものであり、その中でメ病や内リンパ水腫疾患で AVP が高値であることは、疾患の形成や水腫増悪に関与している可能性があると思われる。今回我々は、メ病及び内リンパ水腫疾患患者の臨床像と血漿 AVP 値についての関連について検討した。

【対象】

対象はメ病確実例(蝸牛型メニエール病は除く)51例、遅発性内リンパ水腫7例、梅毒性内リンパ水腫2例の60例である。これらの症例は、全例において4週間以内に、血漿 AVP 測定、蝸電図、グリセロールテストの3つの検査を施行している。

【方法】

血漿 AVP 測定 採血を行い、直ちに冷却遠心分離し、凍結保存。測定は逆相 C18 シリカカラムによる RIA を行った(測定は SRL 社に依頼)。正常値の上限は 3.5pg/ml である。

グリセロールテスト アミラックを 2.6ml/kg 服用させ、3時間後に再度聴力検査を行った。判定は通常通り。

蝸電図 鼓室外誘導にて SYNAX @@@ (NEC)にて測定した。電極は針電極を用い、刺激は Click, 加算回数は 500 回にて行った。当施設での正常は 0.4 未満であり、0.4 以上を陽性とした。

【結果】

血漿 AVP 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。

血漿 AVP 値とグリセロールテストの相関を図1に示す。テスト陽性患者のほうが血漿 AVP 値が高い症例が多かったが、平均値では、テスト(-)が 6.31 ± 4.47 , テスト(+)が 6.79 ± 6.17 と有意な差を認めなかった。蝸電図の結果と血漿 AVP の結果を示す(図2)。両者に有意な相関は見られなかった。疾患持続と蝸電図検査の相関を見ると、疾患持続の短い症例でも蝸電図陽性例はあるものの、疾患持続が長くなると、殆どの症例で Dominant -SP を示している(図3)。

【考察】

以前我々は、血漿 AVP が高値を示す症例に、Dominant -SP を示す症例が多いことを報告した(Audiology Japan Vol.38, 1995)が、今回再検討した結果では、有意な相関は認められなかった。この理由としては、血漿 AVP は非常に変動の激しいホルモンであり、蝸電図検査を行った時期の血漿 AVP 値と蝸電図検査の結果が