

50	Fushiki H., Maruyama M., Watanabe Y	Efficacy of tilt-suppression in postrotatory nystagmus in cats.	Brain Res	1108	127-132	2006
51	M.Tsubota, H.Shojaku, E.Hori, M.Fujisaka, H.Nishijo, T.Ono, H.Yamamoto, Y.Watanabe	Sound-evoked myogenic potentials on the sternocleidomastoid muscle in monkeys.	Acta Otolaryngol	126	1171-1175	2006

書籍（平成 18 年度）

番号	著者氏名	論文 タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1	中川隆之、伊藤 壽一	BDNF	松本邦夫、 田畑泰彦	内耳，細胞増 殖因子と再生 医療	メジカル レビュー 社	大阪	2006	346-350
2	Takeshi Okuda, Kazuma Sugahara, Hiroaki Shimogori, Hiroshi Yamashita	Inner ear changes with intracochlear gentamicin administration in guinea pig.	Michael M. Paparella, MD, Randal A. Otto, MD and Michael A. Keefe, MD	2005 The Year Book of OTOLARYN GOLOGY-HE AD AND NECK SURGERY	Mosby		2006	24-25
3	山下裕司	小児めまい症診断 のポイント	神崎 仁	耳鼻咽喉科・ 頭頸部外科診 療のコツと落 とし穴. 1. 耳 疾患	中山書店	東京	2006	91
4	山下裕司	鼓室内薬物投与方法 の留意点	神崎 仁	耳鼻咽喉科・ 頭頸部外科診 療のコツと落 とし穴. 1. 耳 疾患	中山書店	東京	2006	129
5	渡辺行雄	強い自発眼振を伴 った症例に対する 温度刺激検査（カ ロリックテスト） の評価	神崎 仁	耳鼻咽喉科・ 頭頸部外科診 療のコツと落 とし穴	中山書店	東京	2006	18-19

IV. 研 究 報 告

1. ラット血管条のアクアポリンの分布と水代謝における役割

西岡利恵, 田口大蔵, 柿木章伸, 竹田泰三
(高知大学医学部耳鼻咽喉科)

[はじめに]

水チャネルである AQP (アクアポリン) は腎臓で水の再吸収に関与している. 内耳では AQP1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 および 9 と V2R (抗利尿ホルモンタイプ 2 レセプター) の発現が mRNA で確認されている. 今回わたしたちはラット蝸牛血管条に V2R, AQP2, 3, 4, 7, 8 および 9 が存在するか否かにつき RT-PCR および免疫学的手法を用いて検討したため, 報告した.

[対象と方法]

Wistar 系ラットを用いた.

1) RT-PCR

ペントバルビタール深麻酔下に蝸牛組織を採取し, total RNA を抽出し (RNeasy Mini Kit, Qiagen), 逆転写にて cDNA を作成した (Superscript II, Invitrogen). V2R, AQP2, AQP3 および AQP4 に対する特異的 primer を用いて, PCR を施行した (Hot star Taq, Qiagen). PCR 産物は 3% アガロースゲルにて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドにてバンドを確認した.

2) 免疫組織

ペントバルビタール深麻酔下に 4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定し, 蝸牛組織を採取後さらに固定, 脱灰 (10% EDTA), スクロース浸透後包埋 (OCT コンパウンド) し, 凍結切片 (10 μ m 厚) を作成した. 免疫染色の一次抗体は全て市販のケミコン社製 (V2R, AQP2, AQP3, AQP4, AQP7, AQP8 および AQP9) を用いた. 切片は共焦点レーザー顕微鏡 (V2R, AQP2, AQP3 および AQP4) と AXIO-VISION4.5 (AQP7, AQP8 および AQP9) を用いて観察した.

[結果]

1) RT-PCR では V2R, AQP2, AQP3 および AQP4 のそれぞれに特異的バンドが観察された.

2) 免疫組織的研究で血管条の基底細胞に V2R, AQP2 および AQP3 が存在し, AQP4 はヘンゼン, クラウディウス細胞及び内螺旋細胞に存在していた. AQP7 および AQP9 は辺縁細胞管腔側に存在していたが, AQP8 は確認できなかった.

[考察]

メニエール病の病理組織学的特徴は内リンパ水腫であり, メニエール患者では血漿抗利尿ホルモン値が高く, またモルモットに抗利尿ホルモンを投与すると内リンパ水腫が形成されることから, 内耳液の恒常性維持には抗利尿ホルモンの関与が予想される. 抗利尿ホルモン (VP) は, 腎臓の集合管に存在するレセプター (V2R) に結合することにより, 水チャネル (アクアポリン: AQP) を発現させ, 水の再吸収を行う.

内耳蝸牛への AQP の発現については, 過去の報告と同様に RT-PCR で確認できた. また, その局在については, 様々な報告があるが, V2R, AQP2 および AQP3 の血管条への発現の報告はない. 血管条においては, 以前我々が報告した血管条中間細胞への AQP1 の存在, 辺縁細胞基底側の NaK2Cl 共輸送体及び他論文での辺縁細胞頂側への AQP7 の存在が知られている. 今回水を動かす要因のひとつである

バゾプレシンのレセプターである V2R と AQP2 および AQP3 が基底細胞にみられたことや AQP7 および AQP9 が辺縁細胞頂側膜にみられたことから、血管条を介した内リンパへの水の流れの存在が考えられる。メニエール病の病理組織的特徴である内リンパ水腫の形成に抗利尿ホルモンと水チャネルが深く関与していると予想される。

[結論]

内耳にも V2R と AQP の存在が予想され、実際 RT-PCR により mRNA の存在は確認されている。その局在について検討した結果 V2R, AQP2 および AQP3 は血管条基底細胞に、AQP7 および AQP9 は血管条辺縁細胞にみられたが、AQP4 と AQP8 は血管条には確認できなかった。

[参考文献]

- 1) Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, Ruppertsberg J P, Schultz J E : Expression pattern of aquaporin water channels in the inner ear of the rat. The molecular basis for a water regulation system in the endolymphatic sac. *Hear Res.* 132 : 76-84, 1999.
- 2) Huang D, Chen P, Chen S, Nagura M, Lim D J, Lin X : Expression patterns of aquaporins in the inner ear; evidence for concerted actions of aquaporins to facilitate water transport in the cochlea. *Hear Res.* 165 : 85-95, 2002.
- 3) Kitano H, Takeda T, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Kimura H, Tooyama I : Vasopressin and oxytocin receptor mRNAs are expressed in the rat inner ear. *Neuroreport* 8 : 2289-2292, 1997.
- 4) Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima Y, Isono T, Takeda T, Kimura H, Tooyama I : Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuroreport.* 10 : 1205-1207 1999..
- 5) Mhatre A N, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani A K : Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear Res.* 170 : 59-69, 2002.
- 6) Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Kakigi A, Azuma H : Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *Neuroreport* 13 : 1127-1129, 2002.
- 7) Takeda T, Kakigi A, Saito H : Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 519, : 219-222, 1995.
- 8) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada S, Kakigi A : Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear. Res.* 140 : 1-6, 2000.
- 9) Zhong S X, Liu Z H. : Expression of aquaporins in the cochlea and endolymphatic sac of guinea pig. *ORL* 65 : 284-289 : 2003

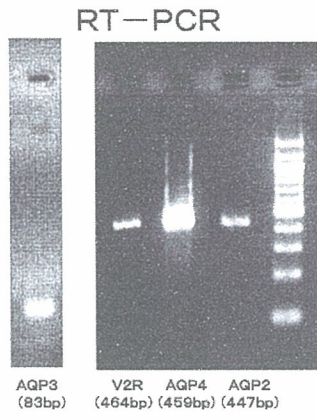


图 1

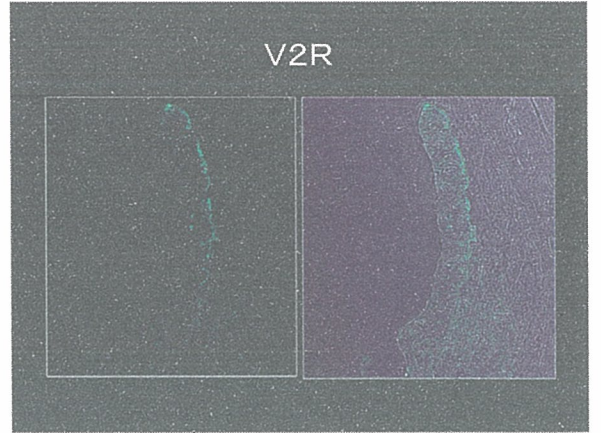


图 2

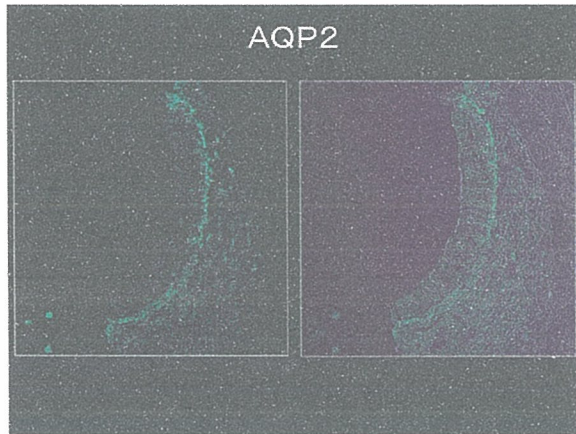


图 3

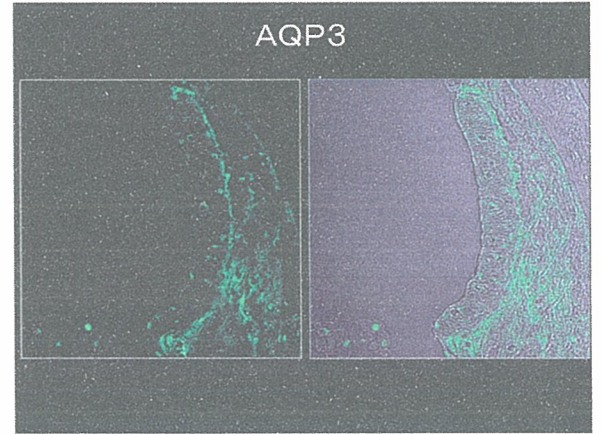


图 4

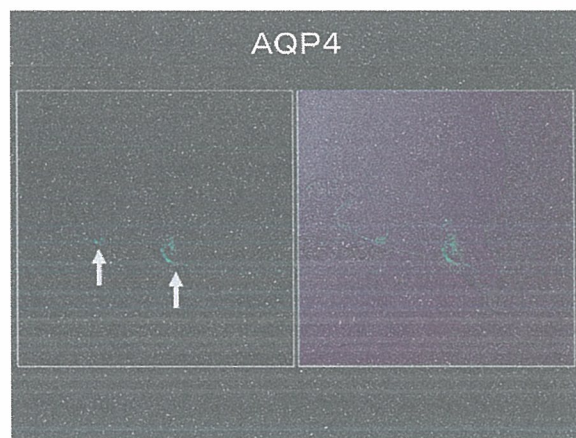


图 5

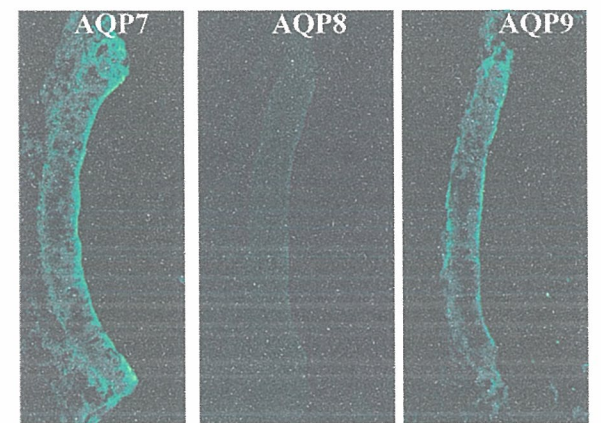


图 6

2. ラット内リンパ囊のアクアポリンの分布

田口大蔵, 柿木章伸, 西岡利恵, 竹田泰三
(高知大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

[はじめに]

内リンパ囊において抗利尿ホルモン2型レセプター (V2R) と AQP2 の存在が免疫組織学的に証明されている。そして, V2R の拮抗薬で AQP2 の発現が減少することが報告されている¹⁾。また, 水制限により内リンパ管上皮下スペースが拡大したという報告²⁾があり, この結果から, 内リンパ囊では活発な水代謝が行われていると考えられる。内リンパ囊における Aquaporin (AQP) の分布に関する報告は, 個々の文献では散見されるが, まとまった報告は認められない。今回われわれは, ラット内リンパ囊における AQP の分布について検討した。

[対象と方法]

Wistar 系ラットを用いた。ペントバルビタール深麻酔後にリン酸バッファー (PBS) で経心灌流し, 続いて 4%パラフォルムアルデヒド (PFA) +PBS で灌流した。直ちに内耳を摘出し, 4%PFA+PBS で 4°C overnight で固定した。0.12M EDTA で脱灰後に Tissue Tek に包埋し, クライオスタットで薄切 (10 μ m) した。10%正常ヤギ血清でインキュベート後, 一次抗体 (Chemicon, AQP1-9) 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, 蛍光顕微鏡 (Zeiss, AxioVision) にて鏡検した。

[結果]

AQP2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 は内リンパ囊上皮に発現を認めた (図 2-4, 6-9)。AQP1 は前庭水管の骨膜に発現を認めた (図 1)。AQP5 は内リンパ囊には発現を認めなかった (図 5)。

[考察]

われわれはこれまで, 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。蝸牛および内リンパ囊においては, V2R および AQP2 の mRNA が発現し, AVP により up-regulate すること¹⁾, また, V2R の antagonist である OPC-31260 は急性投与により, V2R および AQP2 の mRNA が down-regulate すること³⁾などをすでに報告した。生理実験では, AVP 慢性投与では内リンパ水腫を惹起し⁴⁾, 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³⁾がわかった。

今回われわれは, 内リンパ囊上皮に AQP2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 の蛋白発現を免疫組織化学的に証明した。AQP1 は前庭水管の骨膜に発現を認めた。過去の報告⁵⁾と同様に, AQP5 は内リンパ囊では発現を認めなかった。今回の結果から, 内リンパ囊には蝸牛血管条と同様に多種の AQP が存在しており, 水分代謝に深く関与していることが示唆された。従って, 今後は内リンパ囊における AQP の局在を検討し, 内耳における水の流れを解明していくことが必要であると考えられる。

[結論]

ラット内リンパ囊において, AQP2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 は内腔上皮に, AQP1 は前庭水管の骨膜に発現を認めた。今回の結果から, 内リンパ囊には蝸牛血管条と同様に多種の AQP が存在しており, 水分代謝

に深く関与していることが示唆された。

[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) Barbara M et al. Does severe water deprivation affect the inner ear? An experimental study of the gerbilline endolymphatic sac. *J Laryngol Otol*. 1989; 103: 22-9.
- 3) Takeda T, et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res*. 2000; 140: 1-6.
- 4) Takeda T, et al. The effects of V2 antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear Res*. 2003; 182: 9-18.
- 5) Beitz E, et al. Aquaporin-mediated fluid regulation in the inner ear. *Cell Mol Neurobiol*. 2003; 23: 315-29.

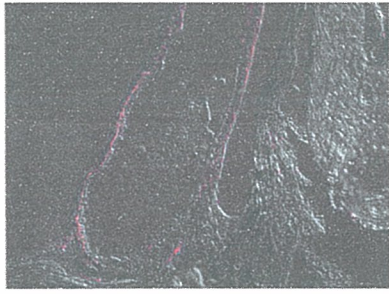


图 1



图 2

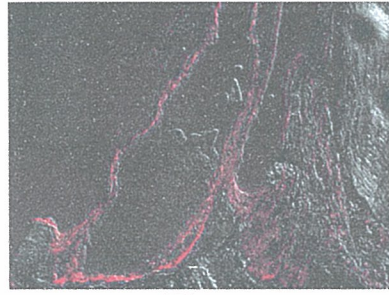


图 3



图 4

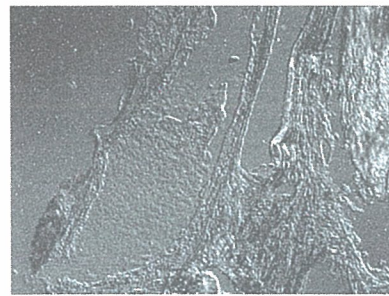


图 5

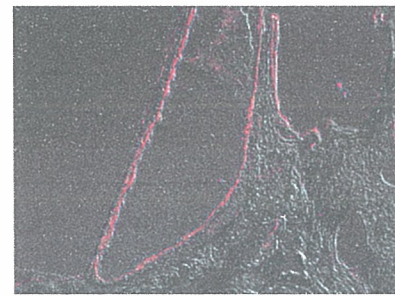


图 6



图 7



图 8

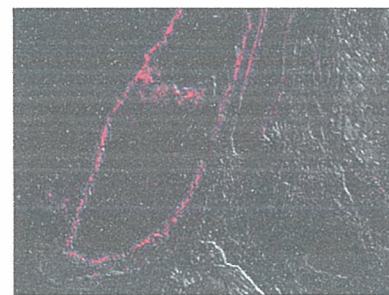


图 9

3. バゾプレッシン投与による血管条の形態変化について

竹田泰三, 田口大藏, 西岡利恵, 柿本章伸
(高知大学耳鼻咽喉科)

[はじめに]

我々の実験結果より¹⁾, 血管条には6種類のアクアポリン (AQP) が発現することが現時点で判明している. その詳細な局在については今後の検討を待たねばならないが, AQP2, AQP3 は基底細胞に, AQP1 は中間細胞の細胞膜に²⁾, AQP7, AQP9 は辺縁細胞の頂部に存在する. 基底細胞には, バゾプレッシン (AVP) のⅡ型レセプター (V2-R) も発現する. 基底細胞と中間細胞は gap junction で繋がっているため, 水の通路としては1つの系と考えられる. 一方, 辺縁細胞の頂部には水チャネルが存在するが, 基底側には水チャネルの構成蛋白である AQP は存在しない. 血管条を經由して外リンパ腔より内リンパ腔に水が動くためには辺縁細胞の基底側に何らかの水の通路の存在を想定しなければならない. 辺縁細胞基底側には, 以前より, Na-K-2Cl 共輸送体が豊富に発現していることが知られている³⁾. 近年, この共輸送体が水ポンプとして機能していることが判明した⁴⁾. 実際, bumetanide でこの共輸送体を阻害すると, 血管条の細胞間隙に水が貯留することが知られている⁵⁾. ただ, Na-K-2Cl 共輸送体の水の通過性は AQP1 の水チャネルと比較すると, 十分の一程度と評価されている⁶⁾. もしそうなら, AVP を負荷して大量の水が血管条に流入したら, Na-K-2Cl 共輸送体のポンプとしての水のくみ取り能力を超えて血管条の細胞間隙に水が貯留することが考えられる. 本研究では, AVP 負荷による血管条内の水貯留による膨化を形態的に測定して, 血管条の水の動きについて検討した.

[対象と方法]

実験動物は, 10 匹の Hartley 系モルモットで対照動物は 4 匹, AVP の急性投与は 2 匹, 慢性投与は 4 匹であった. 急性負荷では, AVP を 60 mU/kg を皮下注, 慢性負荷では背中皮下に埋め込んだ浸透圧ミニポンプより AVP を 1.0 μ U/kg/min の注入速度で 1 週間連続投与した. 急性投与では投与 1 時間後に, 慢性投与では 1 週間後に glutaraldehyde で鼓室還流, オスミウムで固定, エポキシ包埋した. 組織は薄切, Toluidine blue 単染色の切片を光顕で観察し, デジタイゼーで血管条の面積及び長さを計測, 血管条の平均厚みを推定した (図 1).

[結果]

図 2 に対照, 急性負荷, 慢性負荷の代表的組織像を示す. 急性負荷では細胞間隙が拡大し, 血管条の著明な膨化が認められる. しかし, 慢性負荷では細胞間隙の拡大は消失する. 計測した血管条の平均厚みは図 3 が示すように, 急性負荷で有意に肥厚している. 慢性負荷では, いくぶん血管条に肥厚傾向が見られたが, 統計的には有意差はなかった.

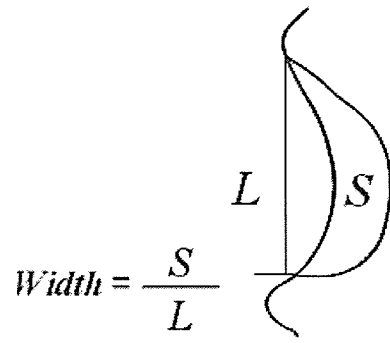
[考察]

基底細胞における AQP2, AQP3, V2-R の膜レベルでの局在については免疫電顕による検討を待たねばならないが, AVP は外リンパ腔に存在することより⁷⁾ V2-R は基底細胞の外リンパ側に存在すると考えるのが妥当である. AQP2, AQP3, V2-R が局在する位置関係が腎集合管と同じと仮定すれば, AQP2 は V2-R の対側, すなわち基底細胞内側に, AQP3 は外リンパ腔側に局在すると考えられる. この仮定に立脚すると, 血管条の水の流れは, 基底細胞の外リンパ側に局在する AQP3 水チャネルを經由して,

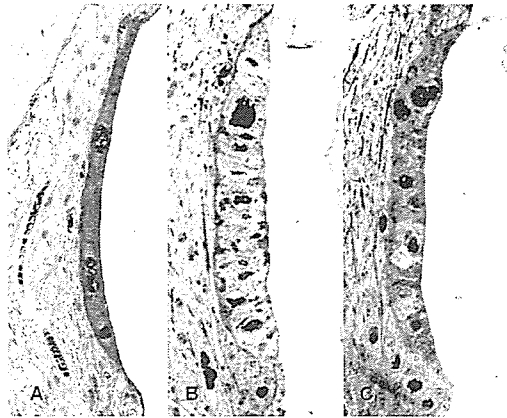
基底細胞に流入する。基底細胞に流入した水は gap junction を経由して中間細胞に入り AQP1 水チャネルを通り細胞間隙に到達する。一部の水は AQP2 水チャネルを経由して細胞間隙に到達するものもあると考えられるが、AVP の上昇がなければ、AQP2 は主に細胞内 vesicle に存在し、細胞膜での発現はわずかで、AQP2 水チャネルが関与する水の流れは少ないと考えられる。血管条の細胞間隙に流入した水は、Na-K-2Cl 共輸送体によって辺縁細胞に汲み上げられて、辺縁細胞頂部に存在する AQP7, AQP9 より構成される水チャネルを経由して内リンパ腔に流出すると推測される。しかし、AVP が一過性に上昇すると、AQP2 水チャネルの細胞膜での発現が増加し、細胞間隙への水の流入は増大する。Na-K-2Cl 共輸送体による水ポンプの水透過能は不明であるが、一般に、共輸送体の水の透過能力は AQP1 より構成される水チャネルの 1/10 程度であろうと評価されている。そうであれば、急激に増えた AQP2 水チャネルを経由した細胞間隙への水の流入に対して Na-K-2Cl 共輸送体は十分対応できないことが想定される。本実験で、AVP の急性負荷実験に見る血管条の肥厚は、上述した理由による細胞間隙内での水貯留を反映したものであると考えれば理解しやすい。一方、慢性負荷では血管条の腫脹は認められなかった。これは、細胞間隙への水の流入に対応して Na-K-2Cl 共輸送体の発現が増えたためと考えられる。一般に、水チャネルでの水の動きは浸透圧勾配に依存する。上述した水チャネルでの水の流入方向は、血管条内の浸透圧勾配が基本的には外リンパ腔側より内リンパ腔に向かって上昇していることを仮定している。すなわち、外リンパ腔<基底細胞=中間細胞<細胞間隙の浸透圧勾配が血管条内にあることがまず前提となる。ただ、Na-K-2Cl 共輸送体を経由した水の動きは浸透圧勾配に依存しないので、細胞間隙と辺縁細胞間には特別な浸透圧勾配を想定する必要はない。ただ、辺縁細胞と内リンパ腔との間には浸透圧勾配の上昇があることは前提となる。このような前提が、実際に成立しているかどうかは、血管条内の浸透圧勾配を直接的手法で調べることが出来ないは現時点では不可能である。今後、外リンパ腔と内リンパ腔の浸透圧を意図的に変えることによって血管条の肥厚がどのように変化するかを調べて、血管条の水透過機構を解明することが内リンパ水腫形成の機序を理解するためにも必要である。

[参考文献]

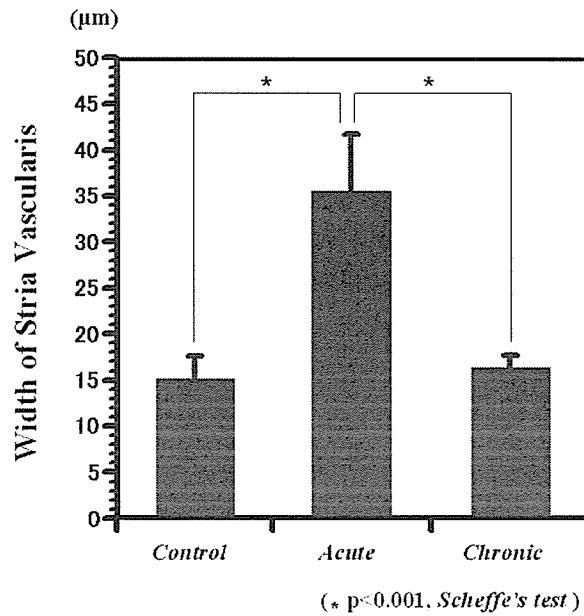
- 1) 西岡利恵, 他. ラット血管条のアクアポリンの分布と水代謝における役割. 平成 18 年度 厚労省難治性疾患克服研究事業. 前庭機能異常に関する調査研究 (印刷中).
- 2) Sawada S, et al., Aquaporin-1 (AQP1) is expressed in the stria vascularis of rat cochlea. *Hearing Res* 2003 181: 15-19.
- 3) Crouch JJ, et al. Immunohistochemical localization of the Na-K-Cl co-transporter (NKCC1) in the gerbil inner ear. *J Histochem Cytochem.* 1997 ;45: 773-8.
- 4) Hamann S, et al., Water permeability of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporters in mammalian epithelial cells. *J Physiol* 2005; 568: 123-135.
- 5) Azuma H, et al., Bumetanide-induced enlargement of the intercellular space in the stria vascularis requires an active Na⁺-K⁺-ATPase. *Acta Otolaryngol* 2002; 122: 816-821.
- 6) Macaulay N, et al., Water transport in the brain: Role of cotransporters. *Neuroscience* 2004; 129: 1031-1044.
- 7) Sziklai I, Ferrary E, Sterkers O, Amiel C. Vasopressin entry into the inner ear fluids of the rat. *Hear Res* 1987; 29: 245-50.



☒ 1



☒ 2



☒ 3

4. メニエール病の動物モデル

工田昌也, 赤木奈々, 平川勝洋
(広島大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科)

[はじめに]

メニエール病の動物モデルとしては現在, 内リンパ嚢(管)閉塞モデル動物が最も一般的に用いられており, このモデルを用いてメニエール病の病態や治療に関して様々な検討が行われてきた^{1,2)}. しかし, このモデルは効率的に内リンパ水腫を作製することができ, 低音域の難聴を生じるものの, メニエール病に最も特徴的なめまい発作の反復は出現せず, メニエール病の病態を忠実に再現しているとは言いがたい^{2,3)}. さらに, 近年のメニエール病の発作の出現にストレスが大きく関与しているという知見についても内リンパ嚢閉塞モデルは不十分である. メニエール病の動物モデルとしては内リンパ嚢閉塞モデルの他に, 能動的な内リンパ水腫モデル⁴⁾, 免疫反応を利用した内リンパ水腫モデル⁵⁾, 二相性モデル⁶⁾, など様々なモデルが存在するが, いずれのモデルもめまい発作の反復というメニエール病の病態の再現については不十分であるのが現状である. そこで, 今回, 我々は, メニエール病のより適切な動物モデルとして, 内リンパ嚢自体に手術的操作を加えず内リンパ水腫を作製し, しかも可逆的な平衡機能障害の出現を示すような動物モデルを作製することを目的に, 内耳炎モデル, アルドステロン投与モデルなどを用い, 内リンパ水腫作製に必要な条件, 平衡機能障害の発現に必要な条件についての検討を加えた.

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常, 8週齢のCBA/Jマウスを使用した. 動物は3群に分け, group 1は左耳に大腸菌由来リポポリサッカライド(LPS) 1mgを経鼓膜的に1日1回, 5日間連日投与, group 2はアルドステロン 100 μ g/100g(体重)を1日1回, 5日間連日投与, group 3はLPSとアルドステロンの両者を同様に5日間連日投与した. 動物は薬剤の最終投与終了1日後に深麻酔下に断頭, 側頭骨を摘出, 4%パラホルムアルデヒドにて固定後, EDTAで脱灰, エタノール系列にて脱水後, 水溶性レジン(JB-4[®])にて包埋した. その後, 通常の方法で切片を作製し, 光学顕微鏡にて形態学的観察を行なった.

次に, 平衡障害の作製のため, group 3の動物において薬剤の最終投与終了後, 左耳に経鼓膜的にエピネフリン(1:10,000)の鼓室内投与を行い, その行動様式を観察すると共に, 赤外線 CCD カメラを用いて眼振の観察を行なった.

[結果]

group 1 : LPS 鼓室内投与

鼓室内にLPS投与を行なった動物では蝸牛に軽度の内リンパ水腫の発現を認め, 内リンパ水腫の程度は上方回転でより強い傾向にあった. 内リンパ嚢の観察では内リンパ腔の大きさは正常ないし軽度縮小しており, いわゆる stainable substance (SS)がしばしば認められた. 上皮細胞は円柱形で細胞間の lateral intercellular space (LIS)の拡張も認められた.

group 2 : アルドステロン腹腔内投与

腹腔内にアルドステロン投与を行なった動物では蝸牛に軽度の内リンパ水腫の発現を認めた. 内リン

パ水腫は上方回転に加えて下方回転でも認められ、下方回転ではライスネル膜の folding もしばしば認められた。内リンパ嚢の観察では内リンパ腔の大きさは拡大しており、上皮細胞の丈は低くなり、LISは縮小していた。

group3 : LPS+アルドステロン投与

LPS とアルドステロンの両方の投与を行なった動物では蝸牛に軽度から中等度の内リンパ水腫の発現を認めた。内リンパ水腫の程度はLPS、アルドステロン単独投与群に比較して有意に強く、回転別では上方回転でより強い傾向にあった。内リンパ嚢の観察では内リンパ腔の大きさは正常～拡大まで様々であったが、上皮細胞は円柱形でLISの拡張も認められた(図1, 2)。

平衡障害の作製のため、group3の動物のLPS投与耳にエピネフリンを投与した動物では投与直後より活動性の減少、エピネフリン投与側への偏倚傾向、薬剤投与耳と反対側に向かう眼振が認められ、この異常は30分程度持続した。

[考察]

内リンパ水腫は内リンパの吸収障害や、内リンパの産生過剰、あるいはその両者によって引き起こされるが、モルモット内リンパ嚢、内リンパ管の閉塞により高率に内リンパ水腫が発生することが報告されて以来、内リンパ嚢閉塞モデルは現在、代表的なメニエール病の動物モデルとして広く利用されている。一方、内リンパの分泌過剰による内リンパ水腫としては中央階へのコレラ毒素の注入やアルドステロン、バゾプレッシンの全身投与により内リンパ水腫が発生することもよく知られている^{2,3,6}。これらの動物モデルの特徴として、内リンパ水腫、聴力障害は程度の差はあれ、すべてのモデルで出現するものの、メニエール病の第一の特徴であるめまい発作は殆ど出現しないということがあげられる。さらに、現在最も広く用いられている内リンパ嚢閉塞モデルは手術的に内リンパ嚢を閉塞することが必要であり、生理学的に実際のメニエール病とはかけ離れているとも考えられる。これらの点を解決するために、今回、我々は内リンパ水腫の作製に、内リンパの分泌過剰と吸収障害の両者を用いたモデルを作製した。内リンパの分泌過剰はアルドステロンを利用して惹起した。アルドステロンは血管条、暗細胞でのNa/K ATPaseを活性化し、内リンパの産生を亢進させることが知られており^{7,8}、実際、モルモットでアルドステロン投与により軽度の内リンパ水腫が生じることが報告されている⁶。また、心理的ストレスによりアルドステロンのレベルが亢進することも知られており⁹、メニエール病の病態の再現により適していると考えられた。次に、内リンパ液の吸収障害は鼓室内にLPSを投与することにより作製した。LPSは内耳に高率に炎症を引き起こし内リンパ嚢の機能障害を生じさせ軽度の内リンパ水腫を発生させることが知られている¹⁰。この両者を併用することにより実際のメニエール病に近い内リンパ水腫動物ができると考えた。今回の結果ではLPS投与、アルドステロン投与、LPS+アルドステロン投与のいずれの群においても内リンパ水腫が発現することが明らかとなった。さらに内リンパ水腫の程度は併用群で最も強かった。すなわち、内リンパ水腫は内リンパの吸収障害、分泌過剰のいずれでも生じるが、両者が合わさることで内リンパ水腫の程度はより強くなるという従来の報告を裏付けるものであった⁶。しかしながらいずれの群においても平衡機能異常は認められなかった。今回の結果とこれまでの研究^{2,3}を考え合わせると、内リンパ水腫が存在するのみではめまい発作は生じないと考えられる。実際、側頭骨病理所見で必ずしもすべてのメニエール病患者で内リンパ水腫が認められるわけではなく、内リンパ水腫が生じているにもかかわらずメニエール病の症状がないものも報告されている¹¹。いいかえれば本研究のモデルも含めて、これまでの動物モデルはメニエール病の間歇期のモデルとなっている可能性が考えられた。実際、メニエール病患者はつねにめまいを生じているわけではなくストレスなど

を契機として発作性にめまいを生じる。そこで今回の動物モデルに発作を生じさせるために鼓室内にエピネフリンを投与した。その結果、可逆性の平衡機能障害を生じさせることに成功した。鼓室内にエピネフリンを投与すると蝸牛血流は一過性に50~60%低下することが知られている¹²⁾ことから、今回の結果は一過性の内耳血流の障害がストレスとなって平衡障害を引き起こされたものと考えられた。同様のストレス負荷による一過性の平衡障害は内リンパ嚢閉塞モデルにグリセロールを投与することでも生じることが報告されており¹³⁾、動物モデルにメニエール病様の発作を起こさせるためには内リンパ水腫に加えて、内耳血流低下や内リンパ圧の急激な減少など更なるストレスの負荷が必要であることが考えられた。

以上のことからメニエール病の病態を考えると炎症、免疫反応、内リンパ嚢形成不全などの様々な病態で内リンパ嚢での内リンパ液吸収不全や、ストレスによる内リンパの過剰産生などで内リンパ水腫が形成され、この状態のみではめまい発作は生じないものの、内リンパ圧の急激な変化、内耳血流の障害、膜迷路の破裂、透過性の亢進などの新たなストレスが加わることによりめまい発作を引き起こすというメカニズムが推察された。

[参考文献]

- 1) Kimura RS, Schuknecht H. Membranous hydrops in the inner ear of the guinea pig after the obliteration of the endolymphatic sac. *Pract Otorhinolaryngol* 1965; 27: 343-54.
- 2) Kimura RS. Animal models of endolymphatic hydrops. *Am J Otolaryngol* 1982; 3: 447-51.
- 3) Gates GA: Meniere's Disease review 2005. *J AM Acad Audiol* 17:16-26,2006
- 4) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada T, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear Res* 2000; 140: 1-6.
- 5) Tomiyama S. Development of endolymphatic hydrops following immune response in the endolymphatic sac of the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 1145-8.
- 6) Dunnenier EA, Segenhout JM, Wit HP, Albers FWJ. Two-phase endolymphatic hydrops: a new dynamic guinea pig model. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1997; 117:13-19.
- 7) MacDonough AA, Farley RA. Regulation of Na, K-ATPase activity. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993; 2: 725-34.
- 8) Cate ten WJF, Curtis LM, Rarey KE. Effects of low-sodium, high-potassium dietary intake on cochlear lateral wall Na⁺, K⁺-ATPase. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1994; 251: 6-11.
- 9) Williamson DG, Gifford F. Psychosomatic aspects of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1971; 72: 118-20.
- 10) 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: 246-53.
- 11) Paparella MM. Pathogenesis and pathophysiology of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1991; Suppl 485: 26-35.
- 12) Miller JM, Ren T-Y, Nuttall AL. Studies of inner ear blood flow in animals and human beings. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 101-13.
- 13) Takumida M, Hirakawa K, Harada Y. Effect of glycerol on the guinea pig inner ear after removal of the endolymphatic sac. *ORL* 1995; 57: 5-9.

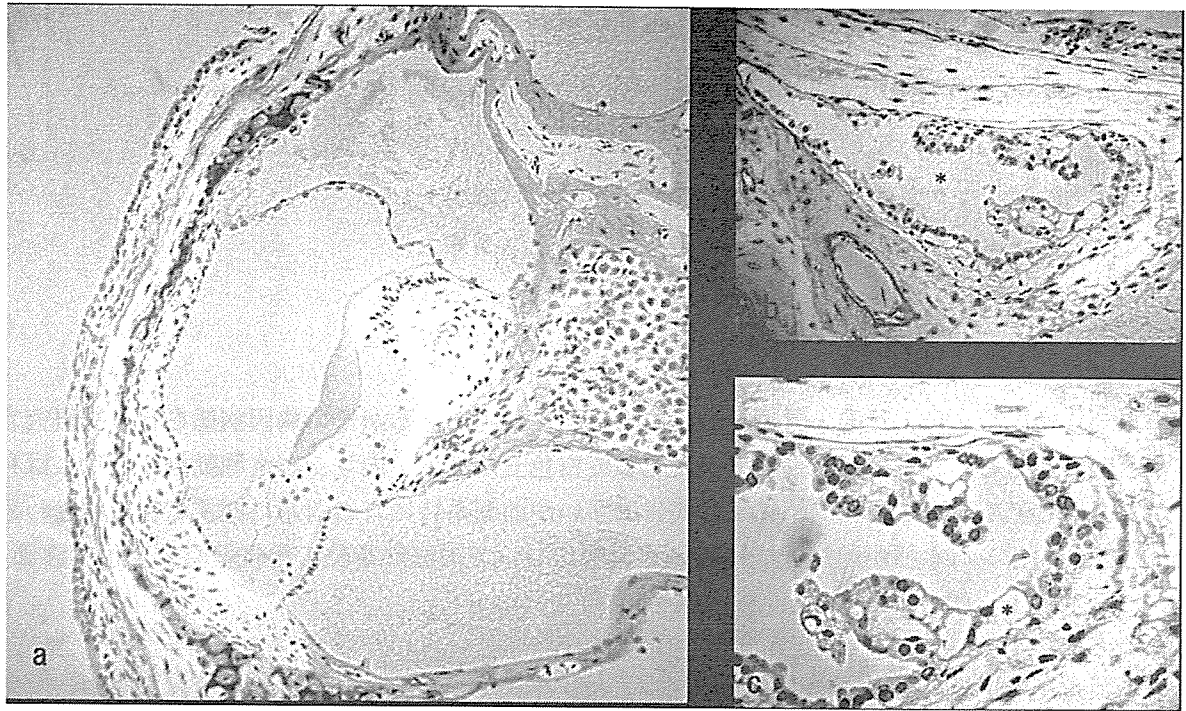


図1：アルドステロン+LPS 投与モデル

a：蝸牛に内リンパ水腫が認められる．b：内リンパ腔（*）は拡大している．c：内リンパ嚢上皮細胞間の LIS（*）は拡大している．

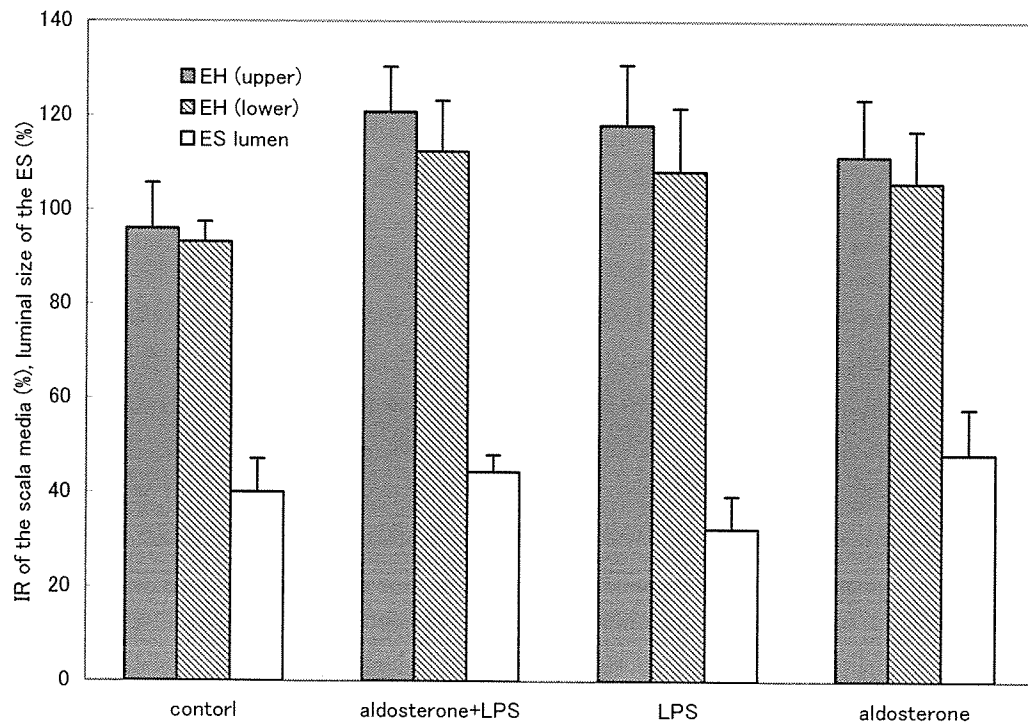


図2：内リンパ水腫の程度と内リンパ腔の大きさ

5. 内リンパ水腫動物モデルにおける 前庭誘発筋電位 (VEMP) の解析:第2報

古屋信彦, 王 英 (群馬大)
柿木章伸, 竹田泰三 (高知大)

[はじめに]

メニエール病はめまい・耳鳴・難聴で知られる難治性疾患であるがその病因病態をヒトで研究するには自ずと限度がある。この病態の動物モデルとして白色モルモット内リンパ水腫動物がしばしば利用されるが、このモデル動物において聴覚系の報告は多いが前庭系特に耳石器系に関する報告はきわめて少ない。今回、内リンパ水腫が前庭機能に及ぼす影響について前庭筋電位の術後経時的変化で評価した。

[対象と方法]

プライエル反応正常のモルモットをケタミン、セレクトールによる麻酔下に後頭部を開頭し左内リンパ嚢を顕微鏡下に破壊、閉鎖し内リンパ水腫動物「A」群 8 匹を作成した。手術操作による実験結果への影響確かめる目的で開頭し、内リンパ嚢破壊術を行わない擬似手術動物「B」群 5 匹と記録電極のみ埋め込んだ対象群「C」群 16 匹の 3 群を作成した。すべての動物に前庭筋電位記録のために慢性電極植え込み術を行った。詳細は昨年すでに述べたので省略する。前庭筋電位は防音室内自由音場下において 1kHz トーンバースト刺激で頭部ソケットを介して記録した。刺激頻度 2Hz, 120dB SPL で頭板状筋の誘発反応を 100~200 回平均加算記録して行った。内リンパ水腫術後 3, 4, 5 週における ABR による聴覚閾値測定と前庭筋電位測定を行った。また自由音場下音刺激による誘発筋電位の記録際、刺激側耳を明確にするために右外耳道閉鎖術を施行し 30~40dB の伝音難聴を作成した。

[結果]

内リンパ水腫群では術後 5 週目で ABR の閾値は 1kHz トーンバースト刺激で平均 43.1dB SPL (30~55dB) であった。また蝸牛における内リンパ水腫率は 130.7%~213.5% であった。VEMP の発現率は対象群、擬似手術群でそれぞれ 87.5%, 80% であった一方内リンパ水腫群で術後 3 週, 4 週, 5 週でそれぞれ 50%, 25%, 25% であったが 6 週以後反応はすべて消失した。VEMP 反応波形は典型的には positive-negative-positive の 3 相波形を示したがその発現潜時は対象群、術後 3 週, 4 週, 5 週でそれぞれ 6.23, 4.15, 3.85, 4.30 ミリ秒であり術後 3~5 週群は対象群と有意差 ($p < 0.01$) を示した。同様に Positive Peak においても対象群に対して術後群は有意差を持って潜時の短縮を認めた。

[考察]

内リンパ嚢破壊術による内リンパ水腫発生率は 100% と安定していた。蝸牛の難聴の程度は術後 5 週でも ABR 閾値で判定すると 43.1dB SPL と中程度であったが VEMP は 6/8 匹消失していた。このことは蝸牛機能より早く耳石機能は消失するものと考えられた。耳石器機能は術後 3 週ですでに低下しており 6 週以後ではほぼ全例機能は喪失するものと考えられた。この実験系では障害は不可逆的と推測された。内リンパ水腫群で潜時の短縮が見られたがこれは水腫により球形嚢が前庭窓方向に浮腫により偏移シテその結果一時的に過敏隣潜時短縮を生じるものと考えられる。

【結論】

内リンパ嚢破壊術による内リンパ水腫率は 130～213%であった。前庭誘発筋電位は正常動物で出現率 87%であったが内リンパ嚢破壊術後出現率は低下し、6 週後ですべての動物で消失した。内リンパ水腫群の VEMP は正常群に比して初期に潜時が短縮し、その後反応が消失する経過を示した。

6. アレルギー性内リンパ水腫に対するロイコトリエン受容体拮抗薬の効果

柿木章伸, 田口大藏, 西岡利恵, 竹田泰三
(高知大学医学部耳鼻咽喉科学教室)

[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が, その病因のひとつにアレルギーの関与があげられる. これまでに, 動物実験により I 型アレルギーの内リンパ水腫モデルが報告されている¹⁾. 今回われわれは, I 型アレルギーによる内リンパ水腫に対しロイコトリエン受容体拮抗薬の効果を検討したので報告する.

[対象と方法]

動物は白色モルモットを使用した. 感作は, 2 もしくは 3 回とし, DNP-ascaris(5 μ g)を水酸化アルミニウムゲル 5mg に溶解し, 下肢肉球に 0.3ml 投与した. 誘発抗原は DNP-BSA (含 DNP-ascaris 0.25 μ g)とし, 感作終了後 1 週目に DNP-BSA 0.05ml を投与とした. 投与経路は経顔面神経投与と経正円窓投与の 2 経路とした. これらの感作動物をロイコトリエン受容体拮抗薬であるプラシルカスト (オノン®) 投与軍とコントロール群に分け, 内リンパ水腫の検討を行った.

オノン投与群は, DNP-BSA による誘発の 1 時間前にプラシルカスト (オノン®) 30mg/kg 経口投与 (加糖キミチル加糖 Na に懸濁)した. コントロール群は, オノン®非投与とした.

内リンパ水腫の検討は, DNP-BSA 誘発 12, 24, 36, 48 時間後に各群の動物を, パラホルムアルデヒドにて経心灌流固定を行い, 内耳を光顕的に観察した.

[結果]

図 1 に経顔面神経投与 12 時間目の組織変化を示す. オノン投与群では内リンパ水腫の形成を認めないが, コントロール群では軽度の内リンパ水腫を認める. 図 2 に経顔面神経投与 48 時間目の組織変化を示す. オノン投与群, コントロール群ともに軽度の内リンパ水腫を認める.

表 1 に経顔面神経投与群における内リンパ容積増加率の経時変化を示す. コントロール群では 12 時間目から内リンパ水腫を認め, 48 時間経過しても内リンパ腔の増加は変化が無かった.

図 3 に経正円窓投与 1 2 時間目の組織像を示す. オノン投与群では内耳出血が認められるが, 内リンパ水腫の形成は認められない. コントロール群では, 著名な内リンパ水腫を認める.

[考察]

DNP-ascaris によりアレルギー性内リンパ水腫が形成されたこれまでの報告では肥満細胞の脱顆粒と好酸球の浸潤が報告されており I 型アレルギーの関与といわれている¹⁾. ロイコトリエン受容体拮抗薬により内リンパ水腫の形成が抑制されたことから I 型アレルギーにより内リンパ水腫が形成されることを支持する結果であった. オノンの効果は 48 時間目には消失しており, 効果持続のためには連続投与が必要と考える.

今後の展望としては, 浸潤細胞の同定や内リンパ水腫形成の機序について研究を進めていく必要がある.

[結論]

ロイコトリエン受容体拮抗薬により、DNP-*ascaris* 感作によるアレルギー性内リンパ水腫の形成が抑制された。メニエール病の治療薬としてロイコトリエン受容体拮抗薬が有効となる病態が存在することが示唆された。

[参考文献]

- 1) Uno K, Miyamura K, Kanzaki Y, Fukuda H, Masuyama K, Ishikawa T. Type I allergy in the inner ear of the guinea pig. *Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl.* 1992 Oct;157:78-81.

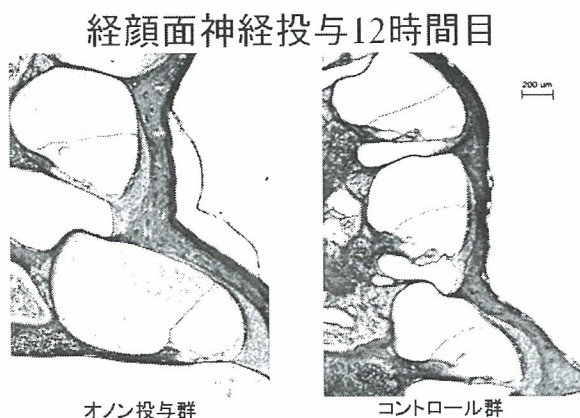


図 1

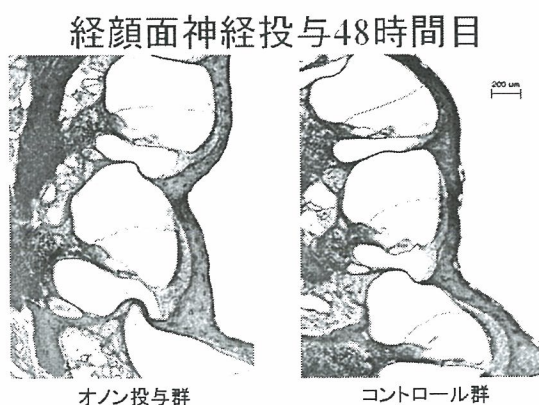


図 2

経顔面神経投与群における内リンパ容積増加率の経時変化

	12時間目	24時間目	36時間目	48時間目
オノン投与群 (n)	2.5% (3)	5.9% (2)	6.7% (3)	15.9% (2)
コントロール群 (n)	13.4% (6)	7.3% (7)	16.1% (2)	17.4% (1)

表 1

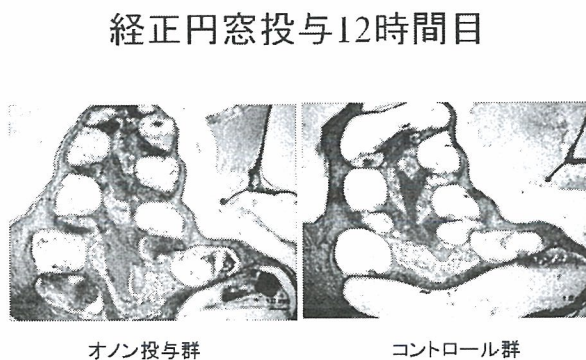


図 3