

## IV. 研 究 報 告

# 1. ガドリニウム造影剤の鼓室内投与が血管条におよぼす影響

柿本章伸, 西村将彦, 竹田泰三 (高知大)

## [はじめに]

メニエール病の側頭骨病理の特徴は内リンパ水腫であり, その確定診断は内リンパ水腫の証明である. したがって, これまで生前にメニエール病の確定診断は行われることはなかった. しかしながら, 近年, 高分解能 MRI の臨床応用と造影技術の進歩により内リンパ水腫の描出が可能となってきた (1). この MRI による内リンパ水腫描出には, 静注用ガドリニウム (オムニキャスト) を生理食塩水にて 8 倍希釈したものを鼓室内注入している. ガドリニウムは, 内耳 (2), 特に血管条に多く分布する (3) TRPV4 の阻害剤である (4, 5) ため, 内耳障害の危険性が存在する. 今回われわれは, ガドリニウムの血管条に対する影響について蝸牛内静止電位 (EP) と透過型電子顕微鏡 (TEM) にて検討したので報告する.

## [対象と方法]

白色モルモット 13 匹を使用し, 全身麻酔下に人工呼吸を行い, 腹側より中耳骨胞を開放し蝸牛を露出させ, 蝸牛第 2 回転中央階より EP を測定した. EP が安定して測定できることを確認の後, 中耳骨胞内にオムニキャストの原液 (Gd 群, 5 匹), 生理食塩水にて 8 倍希釈したもの (1/8Gd 群, 5 匹), もしくは生理食塩水 (コントロール群, 3 匹) を満たし EP の変化を 1 時間観察した. その後, 固定液にて外リンパ灌流し, 組織固定を行い, 血管条を摘出し TEM にて観察した. EP の値の変化に関する統計学的な検討は, 対応のある t 検定を用いた.

## [結果]

図 1 に Gd 群の EP の変化を示す. EP はオムニキャスト投与後, 速やかに低下の後プラトーに達し, その後は変化しない. 図 2 に 1/8Gd 群の EP の変化を示す. EP に有意な変化は認められなかった. 表 1 に各群における EP の変化を示す. Gd 群では, EP は平均 6.14 mV 低下した. この変化は, 対応のある t 検定を用いて検討したところ, 有意水準 0.001 で有意差を認めた. 1/8Gd 群では, EP に有意な変化は認められなかった. コントロール群においても, EP に有意な変化は認められなかった.

## [考察]

内耳血管条は内耳液の産生場所と考えられており, 近年, 水チャンネルの存在が証明され水代謝に重要な役割を担っていると考えられる. TRPV4 は, 浸透圧の変化に反応することから水代謝への関与が予想される. 今回の実験では臨床で使用されている濃度のオムニキャストでの EP の変化は認めなかったが, 原液を使用した場合 EP の低下を見た. この結果から臨床でガドリニウムを鼓室内投与する場合には, 誤って高濃度のものを使用しないよう十分な注意が必要であることがわかった.

今回は血管条の機能と形態について検討を行ったが, TRPV4 は蝸牛と前庭の有毛細胞にも分布している (3, 6). 最近の報告では, TRPV4 は有毛細胞において浸透圧および機械的な感覚受容体として機能していることが示唆されている (7). これらのことから, ガドリニウムにより聴覚および平衡機能障害が出現する可能性があるので使用濃度には十分な注意を要す.

また、外リンパ瘻症例の中には、メニエール病と類似した症状を呈するものがある。このような場合、ガドリニウムが内耳内に入りやすくなっていることが予想されるので鑑別診断としてさらに重要となる。

[参考文献]

- 1) Nakashima T, Naganawa S, Sugiura M, Teranishi M, Sone M, Hayashi H, et al. Visualization of endolymphatic hydrops in patients with Meniere's disease. *Laryngoscope* 2007;117:415-420.
- 2) Duan M, Bjelke B, Fridberger A, Counter SA, Klason T, Skjönsberg A, et al. Imaging of the guinea pig cochlea following round window gadolinium application. *Neuroreport* 2004;15:1927-1930.
- 3) Takumida M, Kubo N, Ohtani M, Suzuka Y, Anniko M. Transient receptor potential channels in the inner ear: presence of transient receptor potential channel subfamily 1 and 4 in the guinea pig inner ear. *Acta Otolaryngol.* 2005;125:929-934.
- 4) Andrade YN, Fernandes J, Vázquez E, Fernández-Fernández JM, Arniges M, Sánchez TM, et al. TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol.* 2005;168:869-874.
- 5) Becker D, Blase C, Bereiter-Hahn J, Jendrach M., Villalón M, Valverde MA. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci* 2005 ;118:2435-2440.
- 6) Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 2000;103:525-535.
- 7) Shen J, Harada N, Kubo N, Liu B, Mizuno A, Suzuki M, et al. Functional expression of transient receptor potential vanilloid 4 in the mouse cochlea. *Neuroreport* 2006;17:135-139.

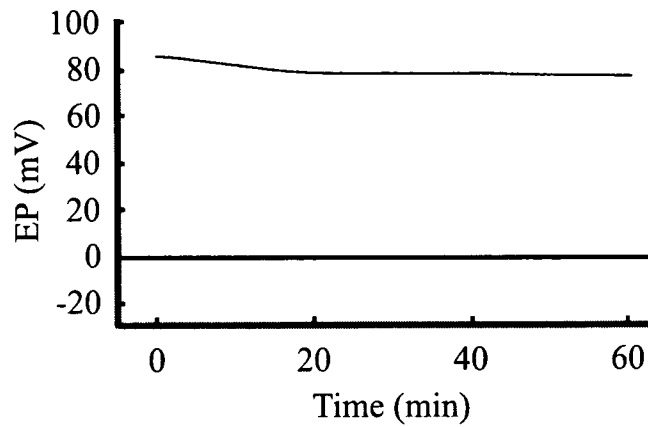


図1 Gd 群における EP の変化

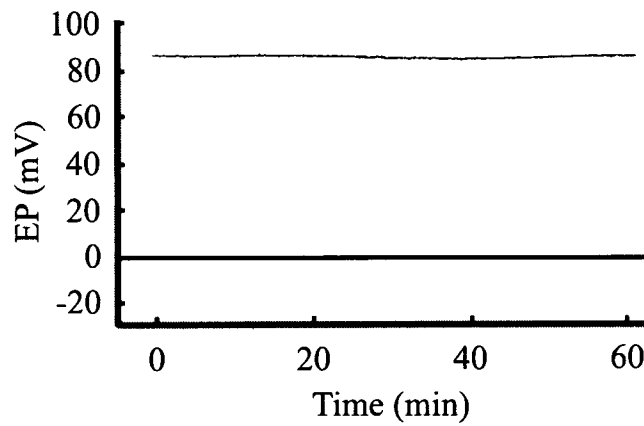


図2 1/8Gd 群における EP の変化

表1 各群における EP の変化

	Gd	1/8Gd	コントロール
投与前の EP	88.0 ± 2.9	87.6 ± 6.6	87.0 ± 3.8
投与後 1 時間の EP	81.9* ± 2.5	88.8 ± 6.9	86.9 ± 3.1

(mV)

mean ± S.D. 対応のある t 検定 \* : p<0.001

## 2. マウス内耳での TRPV の局在とその変化

工田昌也, 石橋卓弥, 赤木奈々, 平川勝洋 (広島大)

### [はじめに]

侵害受容体(transient receptor potential subfamily V; TRPV)は熱, 酸, 浸透圧などの様々な非特異的侵害刺激を感知してカルシウムイオンを細胞内に流入させ, 脱分極による細胞興奮を導く受容体であり<sup>1,2)</sup>, TRPV の最初のメンバーである TRPV1 はカプサイシンの受容体として 1997 年に初めてラットの後根神経節よりクローニングされ<sup>3)</sup>, 現在までに温度上昇の程度, pH, 浸透圧など少しずつ受容する刺激の種類および受容体の反応性も異なる 6 つのサブファミリーが報告されている. 内耳においても最近 TRPV の存在が示唆されるようになってきており, 様々な役割を持つことが推察されている<sup>4,7)</sup>. 今回, 我々はマウス内耳での TRPV1,2,3,4 の局在を免疫組織学的に明らかにするとともにゲンタマイシン (GM) による内耳障害モデルを作製し, TRPV の発現の変化について検討を加えた.

### [研究方法]

実験にはプライエル反射正常の CBA/J マウス, 8 週齢 (体重約 20g) を使用した. GM 投与モデルはマウス左耳に GM 5mg を鼓室内投与して作製し, 2 週間後に使用した. 正常動物ならびに GM 投与動物はネブタールによる深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後, 断頭, 側頭骨を摘出した. 試料は EDTA にて脱灰後, 4 $\mu$ m の厚さで凍結切片を作製, 抗 TRPV1 抗体, 抗 TRPV2 抗体, 抗 TRPV3 抗体, 抗 TRPV4 抗体, 抗 BDNF 抗体, 抗ニトロチロシン抗体, 抗ヒドロキシノネナル抗体を用いて, 免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した.

### [結果]

TRPV1 の発現はコルチ器では内外有毛細胞, 支持細胞, 蝸牛神経節細胞に認められ, 血管条での発現は殆ど認められなかった. 前庭器では感覚細胞, 神経線維, 前庭神経節細胞に発現が認められた.

TRPV2 の発現はコルチ器では内外有毛細胞, 支持細胞, 蝸牛神経節細胞に認められ, 血管条でも中等度の発現が認められた. 前庭器では感覚細胞, 神経線維, 前庭神経節細胞, 暗細胞に発現が認められた.

TRPV3 の発現はコルチ器では内外有毛細胞, 支持細胞, 蝸牛神経節細胞, 前庭器では感覚細胞, 神経線維, 前庭神経節細胞に発現が認められた.

TRPV4 の発現はコルチ器では内外有毛細胞, 支持細胞で発現が認められ, 加えて血管条, 蝸牛神経節細胞でも強い発現が認められた. 前庭器では感覚細胞に加えて, 前庭神経節細胞のほか, 暗細胞で強い発現が認められた. (図 1,2)

GM 投与動物ではコルチ器では内外有毛細胞, 支持細胞, 血管条, 蝸牛神経節細胞, 前庭器では感覚細胞, 暗細胞, 前庭神経節細胞で BDNF, ニトロチロシン, ヒドロキシノネナルの発現が認められ, 正常動物に比べて蛍光強度が増加していた. GM 投与動物での TRPV の発現は, 局在部位については正常動物と同様であったが, その蛍光強度は TRPV1, TRPV2 では増加し, TRPV3, TRPV4 では減少していた(図 3).

## [考察]

これまでの研究から内耳で TRPV1 はコルチ器感覚細胞, 支持細胞, 蝸牛神経節, 前庭神経節に存在することが報告されている<sup>5,6)</sup>。今回の検討では TRPV1 は前庭感覚細胞, 神経, コルチ器有毛細胞, 蝸牛神経節, 前庭神経節などに認められた。内耳での TRPV1 の機能に関して, これまでの検討でカプサイシンが蝸牛の CAP 閾値を上昇させ, CM を小さくし, これらの反応は可逆的で競合的阻害剤であるカプサゼピンで阻害される<sup>8,9)</sup>ことなどが明らかになっている。これらの生理学的検討と今回の結果を併せると TRPV1 は蝸牛及び前庭での感覚細胞の興奮を抑え, 興奮で立つ気候の調節に働いていることが考えられた。

一方, TRPV1 は血管条, 前庭暗細胞, 移行上皮, 内リンパ嚢などの水分輸送上皮では殆ど認められなかった。実際, カプサイシン投与によっても蝸牛血流は変化するものの EP には変化は認められず血管条機能は正常に保たれることが知られており<sup>8,9)</sup>, TRPV1 は内リンパのイオンや水分の恒常性の維持には殆ど関係していないと考えられた。

TRPV2 は前庭感覚細胞, 神経, コルチ器有毛細胞, 蝸牛神経節, 前庭神経節に加えて血管条, 前庭暗細胞などに発現していた。TRPV2 は TRPV4 と類似して浸透圧による細胞膜の伸展を感じることが知られており<sup>1)</sup>, その分布様式も考え合わせると感覚細胞の興奮伝達機構の調節や運動性に関係すると共に内耳での水分代謝にも関与すると考えられた。

TRPV3 はこれまで口腔や鼻の化学受容体としての役割が示唆されている<sup>10)</sup>。今回, TRPV3 も内耳に存在することが明らかとなり, その分布は TRPV1 とほぼ同じであった。それらのことから考えると TRPV3 もまた感覚細胞や神経節での感覚受容機構に関与していると考えられた。

TRPV4 の内耳での機能について, 近年, 血管条辺縁細胞や他の水分輸送上皮に TRPV4 が認められることから内リンパの浸透圧の調節に関与していることが示唆されている<sup>4,7)</sup>。今回の検討でも TRPV4 は蝸牛, 前庭の感覚細胞に加えて血管条, 前庭暗細胞, 移行上皮, 内リンパ嚢などの水分輸送上皮に強く局在していることが明らかとなった。これらのことから TRPV4 が内耳での浸透圧の調節に強く関連し, 内リンパのイオンや水分の恒常性の維持に働いていると考えられた。加えて, 内耳の感覚細胞での TRPV4 の役割について, 前庭や蝸牛の単離有毛細胞は低浸透圧刺激により速やかな収縮を起こすこと, この変化は可逆性で浸透圧を元に戻すことにより回復することが知られている<sup>11,12)</sup>。これらのことと今回の結果より, TRPV4 は感覚細胞での浸透圧の受容にも関係していると考えられた。

今回の GM 投与モデル動物での検討では GM 投与により, TRPV1, TRPV2 の発現は増加し, TRPV3, TRPV4 の発現は低下することが明らかとなった。TRPV1 の発現の増加はカナマイシン投与動物<sup>13)</sup>や音響負荷<sup>14)</sup>で生じることが知られており, 内耳障害時の耳鳴やめまいの発現に関係していることが考えられている。今回の結果はそれを裏付けると共に, TRPV2 もまた内耳の病態に関係していると思われた。一方, GM 投与による TRPV3, TRPV4 の発現の低下に関して, TRPV4 の発現の低下は KM 投与動物でも認められており<sup>13)</sup>, その意義として神経保護作用が示唆されている。実際, TRPV4 のノックアウトマウスでは 8 週齢では正常の聴力を示すものが 24 週齢では著明に聴力が低下すること, 騒音負荷により正常マウスよりも大きな聴力低下を示し, TRPV4 が内耳障害の軽減, 保護に働いていることが考えられている<sup>15)</sup>。また, 中枢神経系では低体温による神経保護作用が TRPV3 や TRPV4 に関係することが示唆されており<sup>16)</sup>, これらのことから考えると今回認められた TRPV3, TRPV4 の GM 投与動物での発現の低下が内耳の保護作用に関係していることが示唆された。

[参考文献]

- 1) O'Neil RG, Brown RC. The vanilloid receptor family of calcium-permeable channels: Molecular integrators of microenvironmental stimuli. *News Physiol Sci* 2003; 18: 226-31.
- 2) Voets T, Nilius B. TRPs make sense. *J membr Biol* 2003; 192: 1-8.
- 3) Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-24.
- 4) Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Šali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell* 2000; 103: 525-35.
- 5) Zheng J, Dai C, Steyger PS, Kim Y, Vass Z, Ren T, Nuttall AL. Vanilloid receptors in hearing: Altered cochlear sensitivity by vanilloids and expression of TRPV1 in the organ of Corti. *J Neurophysiol* 2003; 90: 444-55.
- 6) Balaban CD, Zhou J, Li H-s. Type I vanilloid receptor expression by mammalian inner ear ganglion cells. *Hear Res* 2003; 175: 165-70.
- 7) Dai C, Steyger PS, Lee H, Caterina MJ, Nuttall AL. Expression of OTRPC4 in the rat inner ear. *Abstr Associ Res Otolaryngol* 2002; 25: 607.
- 8) Vass Z, Bari F, Jancso G. Possible involvement of capsaicin-sensitive sensory nerves in the regulation of cochlear blood flow in the guinea pig. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1994; 114: 156-61.
- 9) Vass Z, Brechtelsbauer PB, Nuttall AL, Miller JM. Nitric oxide mediates capsaicin-induced increase in cochlear blood flow. *Hear Res* 1996; 100: 114-9.
- 10) Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. Oregon, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nature Neurosci* 2006; 9: 628-35.
- 11) Dulon D, Aran JM, Schacht J. Osmotically induced motility of outer hair cells: implications for Meniere's disease. *Arch Otorhinolaryngol* 1987; 244: 104-7.
- 12) Lapeyre PN, Cazals Y. Guinea pig vestibular type I hair cells can show reversible shortening. *J Vestib Res* 1990; 91: 241-50.
- 13) Kitahara T, Li H-S, Balaban CD. Changes in transient receptor potential cation channel superfamily V (TRPV) mRNA expression in the mouse inner ear ganglia after kanamycin challenge. *Hear Res* 2005; 201: 132-144.
- 14) Bauer CA, Brozoski TJ, Myers KS. Acoustic injury and TRPV1 expression in the cochlear spiral ganglion. *Int Tinnitus J* 2007; 13: 21-28.
- 15) Tabuchi K, Suzuki M, Mizuno A, Hara A. Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett* 2005; 382: 304-8.
- 16) Lipski J, Park TIH, Li D, Lee SCW, Trevarton AJ, Chung KKH, Freestone PS, Bai J-Z. Involvement of TRP-like channels in the acute ischemic response of hippocampal CA1 neurons in brain slices. *Brain Res* 2006; 1077: 187-99.

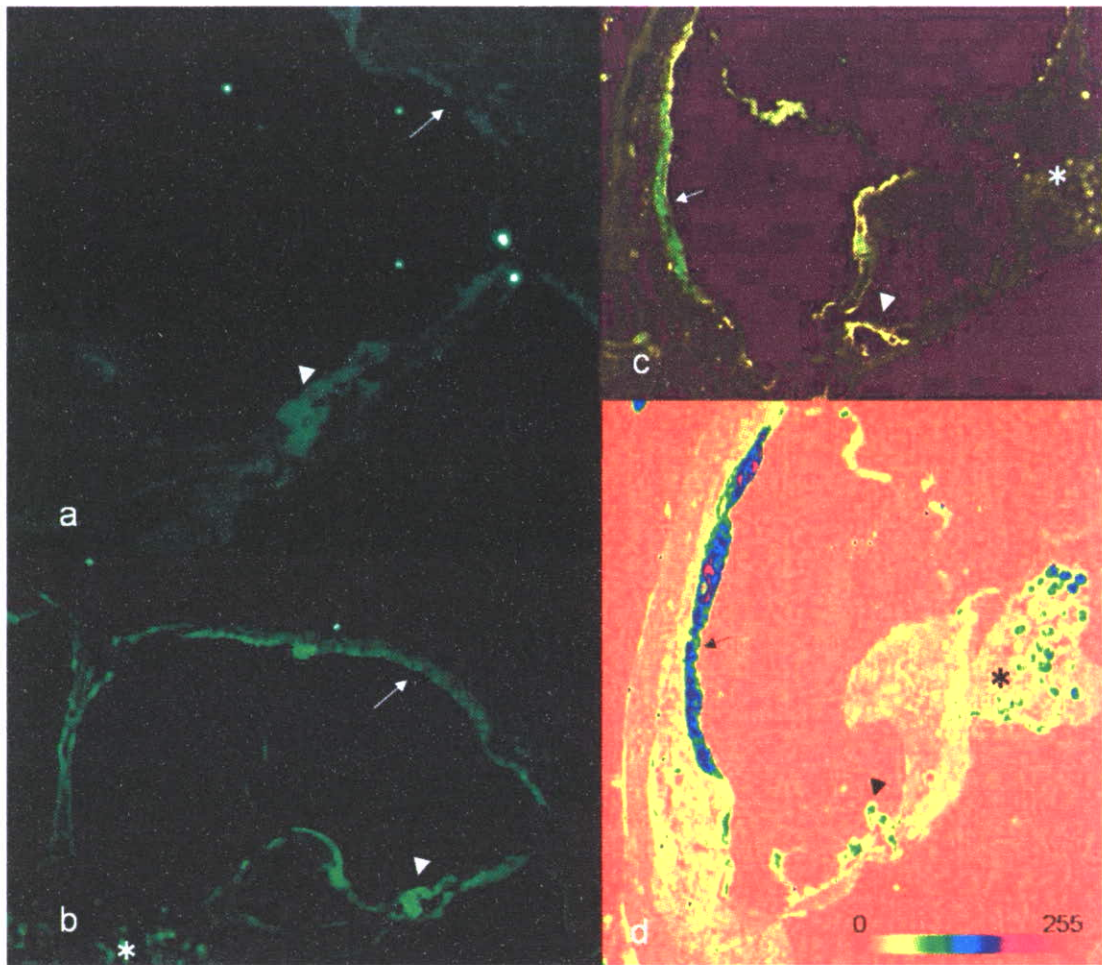


図 1

a: TRPV1 の発現はコルチ器 (<math>\triangleleft</math>) に認められ, 血管条 (<math>\uparrow</math>) での発現は殆ど認められなかった. TRPV2 の発現はコルチ器 (<math>\triangleleft</math>), 蝸牛神経節 (\*), 血管条で認められた. c: TRPV3 の発現はコルチ器 (<math>\triangleleft</math>), 蝸牛神経節 (\*) で認められ, TRPV4 はコルチ器 (<math>\triangleleft</math>), 蝸牛神経節 (\*), 血管条 (<math>\uparrow</math>) で認められた. D: TRPV4 の発現は血管条 (<math>\uparrow</math>) で最も強かった. <math>\triangleleft</math>: コルチ器, \*: 蝸牛神経節



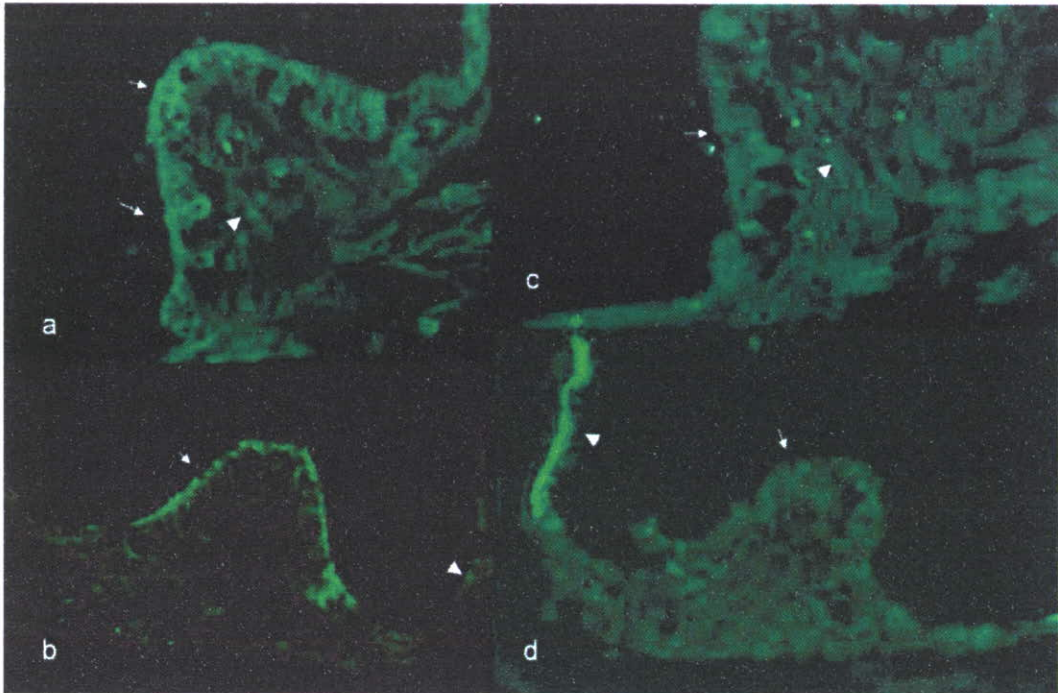


図 2

a: TRPV 1 の発現は感覚細胞 (↑), 神経 (<) で認められた. b : TRPV2 の発現は感覚細胞 (↑), 暗細胞 (<) で認められた. c : TRPV3 の発現は感覚細胞 (↑), 神経 (<) で認められた. d : TRPV4 の発現は感覚細胞 (↑), 暗細胞 (<) で認められた.

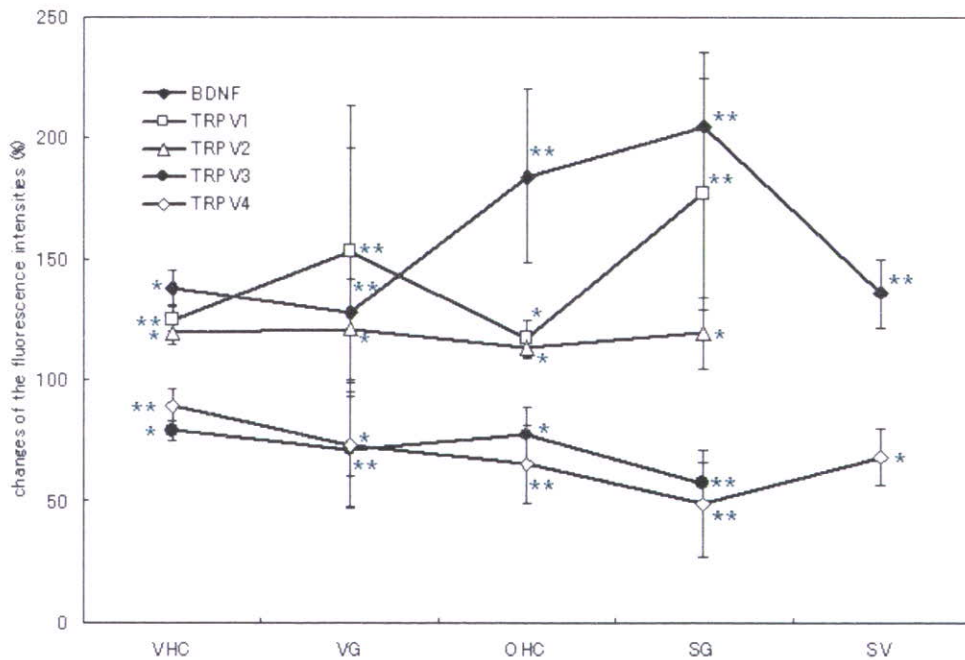


図 3 : GM 投与による BDNF, TRPV の蛍光強度の変化

VHC: 前庭感覚細胞, VG: 前庭神経節, OHC: 外有毛細胞, SG: 蝸牛神経節, SV: 血管条  
BDNF, TRPV1, TRPV2 の蛍光強度は GM 投与により有意に増加している (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ ) が, TRPV3, TRPV4 は有意に減少している.

### 3. ラット内耳血管条における水チャネルの発現と局在

西岡利恵, 西村将彦, 柿木章伸, 竹田泰三 (高知大)

岡田暉彦 (同・第二解剖)

#### [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AQP 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7および9とV2R (抗利尿ホルモントイプ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, AQP 2, 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 (蛍光顕微鏡と免疫電顕) 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, AQP 2, 3, 4, 7, 8, 9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 $\mu$ 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, AQP 2, 3, 4, 7, 8, 9) を用いた。切片はAXIO-VISION 4.5を用いて観察した。

##### 3) 免疫電顕

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外リンパ灌流固定し, 蝸牛組織を採取後さらに固定, 包埋 (LR white resin) し, 超薄切片を作成した。免疫染色の一次抗体は全て市販のケミコン社製 (V2R, AQP 2, 3, 7, 9) を用いた。二次抗体は金コロイドを用いた。グリッドをHitachi 7100 Electron Microscopyを用いて観察した。

#### [結果]

- 1) RT-PCRではV2R, AQP 2, 3, 4, 7, 8, 9のそれぞれに特異的バンドが確認された。
- 2) 蛍光顕微鏡では血管条の基底細胞にV2R, AQP 2及びAQP 3が存在し, AQP 7およびAQP 9は辺縁細胞管腔側に存在していたが, AQP 4とAQP 8は血管条には確認できなかった。
- 3) 免疫電顕の結果ではAQP2は基底細胞基底側に, AQP3とV2Rは基底細胞頂側に, またAQP 7およびAQP 9は辺縁細胞管腔側に確認できた。

## [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、3および9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及び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。さらに免疫電顕の結果でV2RとAQP3が基底細胞頂側に、AQP2が基底細胞基底側に、AQP7と9が辺縁細胞頂側に確認できたことから、抗利尿ホルモン下でのさらに具体的なルートが考えられる。しかしながら、抗利尿ホルモン下の水の流れはAQP、Gap JunctionやNaK2Clなどさまざまなルートを活性化させて、発生している可能性があるため、さらに詳細な検討が必要と思われる。

## [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。以上よりメニエール病の病理組織学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。

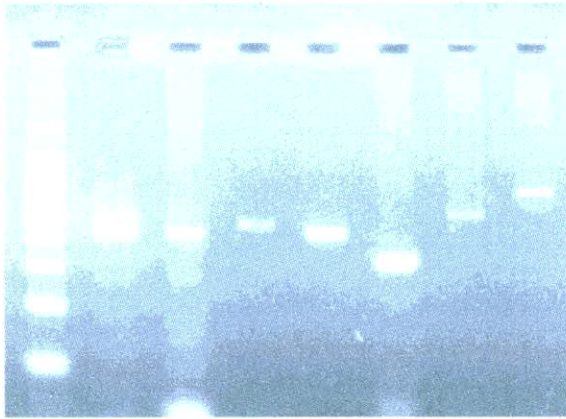
## [参考文献]

- 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) Gu F, Han H, Zhang L : Effects of vasopressin on gene expression in rat inner ear. *Hear Res.* 222: 70-78, 2006.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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..
- 6) 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.
- 7) 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.
  - 8) Takeda T, Kakigi A, Saito H: Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol. Suppl.* 519, : 219-222, 1995.
  - 9) Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada S, Kakigi A : Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hear. Res.* 140 : 1-6, 2000.
  - 10) Zhong S X, Liu Z H. : Expression of aquaporins in the cochlea and endolymphatic sac of guinea pig. *ORL* 65 : 284-289 : 2003



PCR



V2-R AQP2 AQP3 AQP4 AQP7 AQP8 AQP9

图 1

V2-receptor

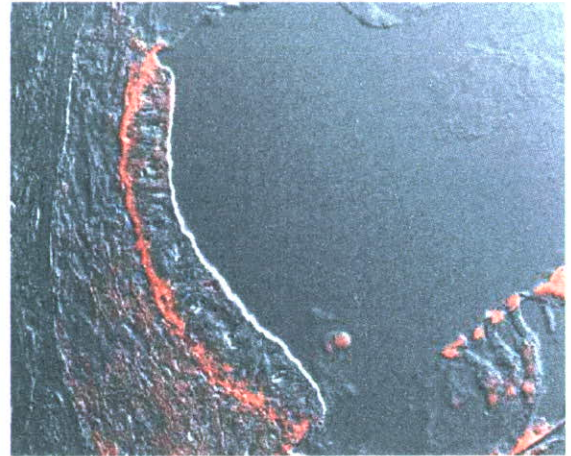


图 2

AQP2

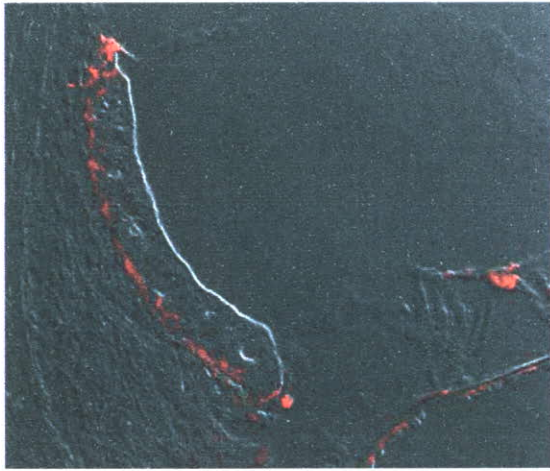


图 3

AQP3

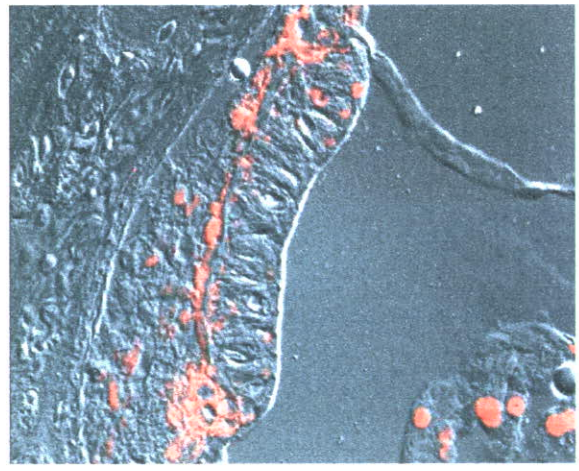


图 4

AQP4

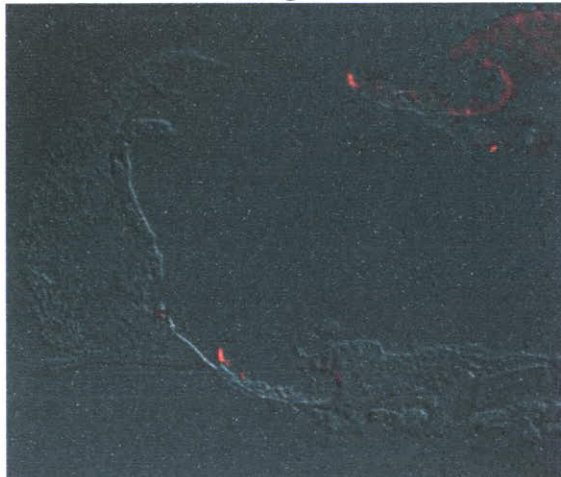


图 5

AQP7

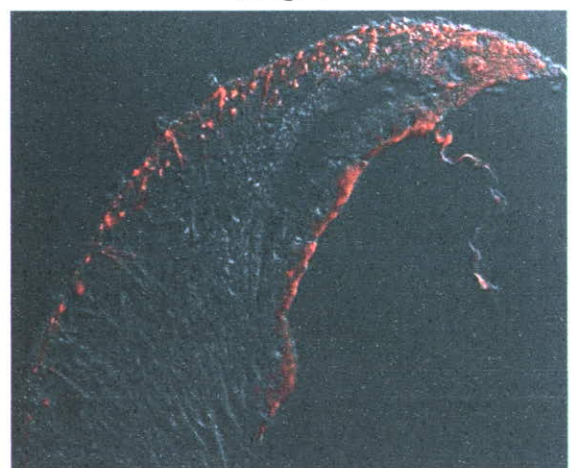


图 6

AQP8

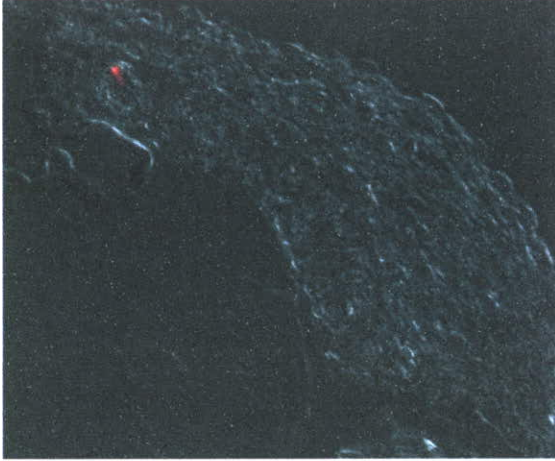


图 7

AQP9

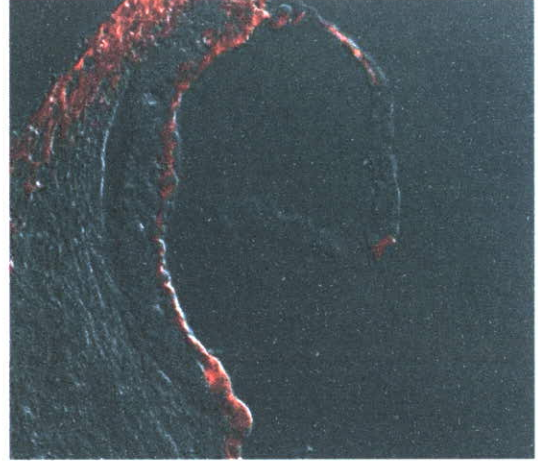


图 8

AQP9

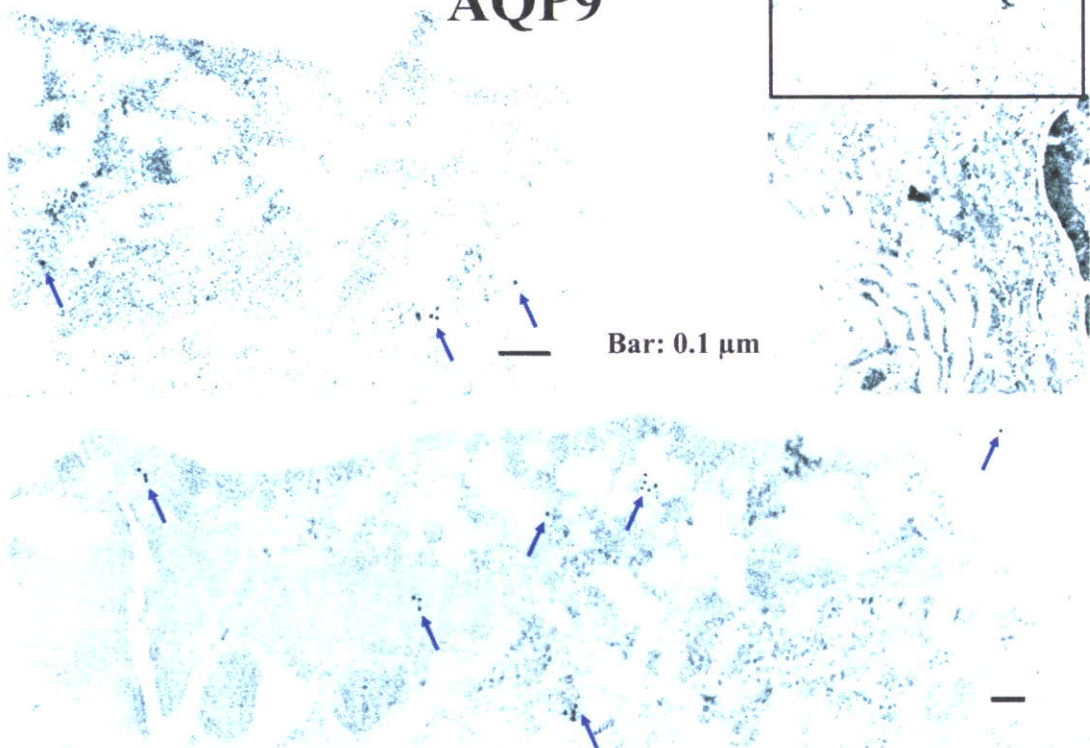


图 9



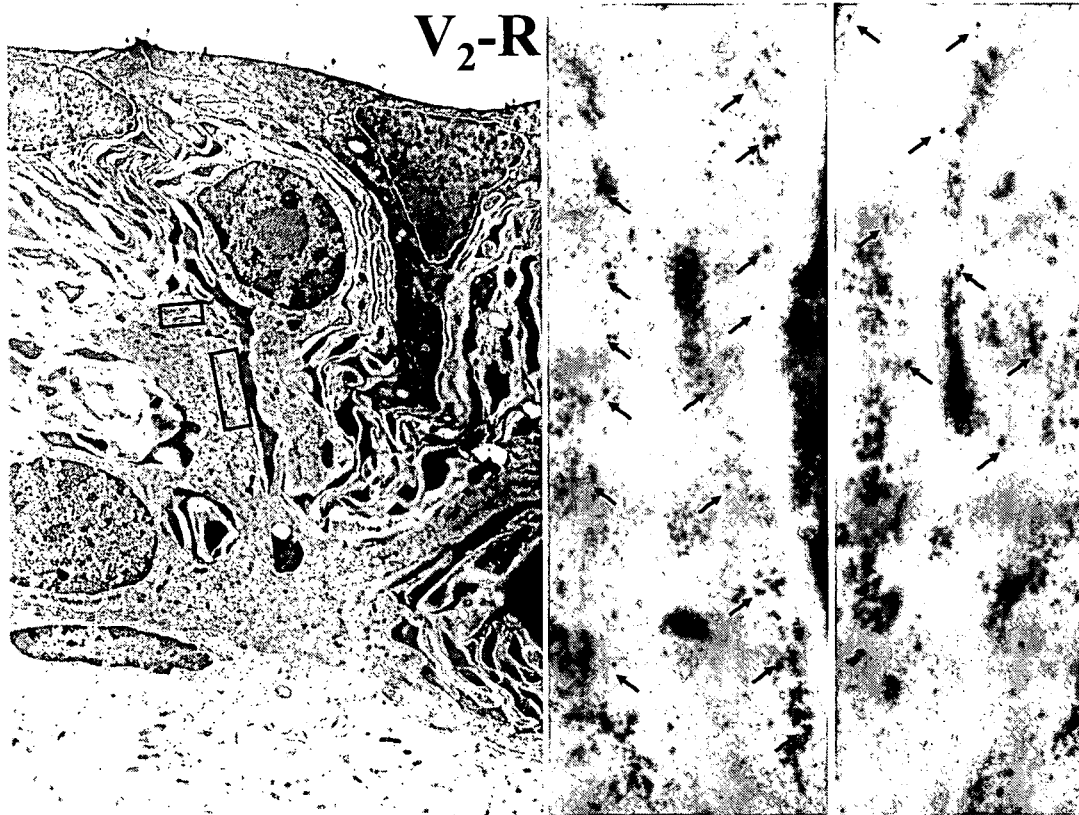


图 10

**AQP2**

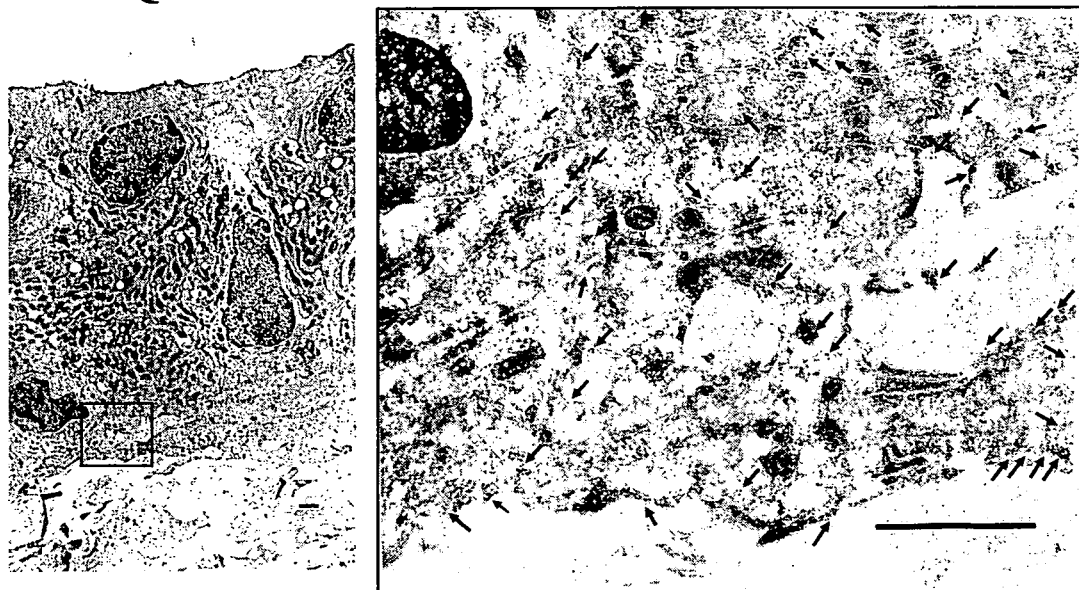


图 11

# AQP3

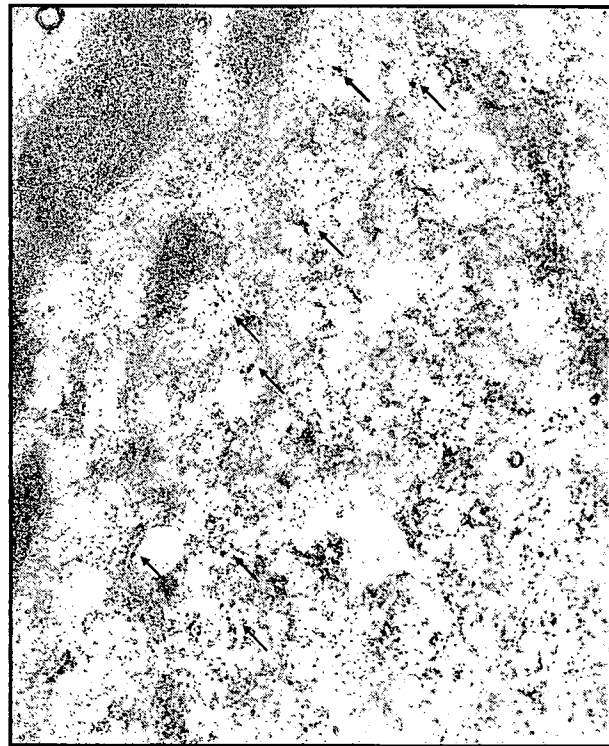
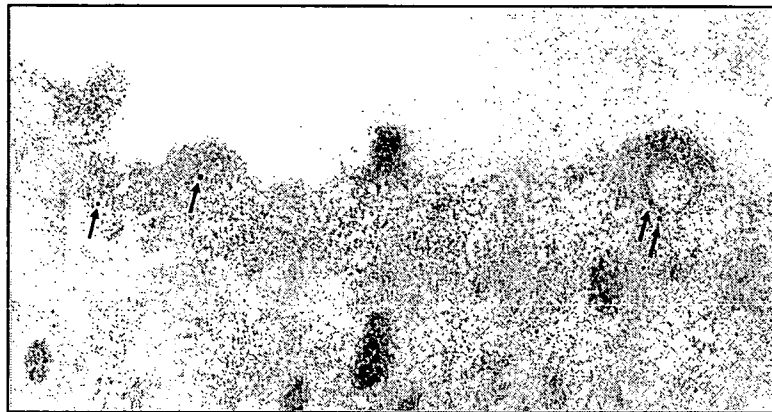
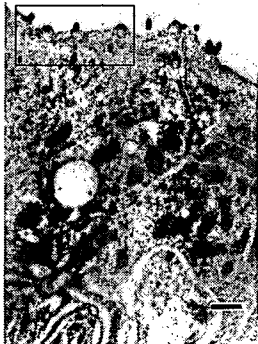


图 1 2

# AQP7



horizontal bar: 0.5  $\mu\text{m}$

图 1 3



## 4. Vasopressin 投与後の蝸牛血管条形態の変化

長沼英明, 徳増厚二, 落合 敦, 岡本牧人 (北里大)  
河原克雅, 佐藤亮平 (同・生理学)

### [はじめに]

メニエール病にみられる内リンパ水腫の発生のメカニズムは未だに不明であるが, 近年, 内リンパ水腫の発生前, 内耳における Vasopressin に対する V<sub>2</sub>receptor や水チャンネル AQP-2 の関与が示唆される Takeda ら<sup>1,5)</sup>, Kumagami ら<sup>6)</sup>の動物実験, 臨床研究が多数報告されている<sup>7,8)</sup>. また我々はこれまでの報告で Vasopressin の腹腔内投与における実験的 Vasopressin 投与動物モデルが, 聴覚低下を起こしうるかを検討し, 聴覚低下を確認し報告してきた<sup>9)</sup>. 今回我々は, この聴覚低下のメカニズムを検討するために, Vasopressin 投与における, 蝸牛血管条の形態の変化を電顕的に解析した.

### [対象と方法]

100-200g の Wistar 系ラットを使用した. Vasopressin 群(n=6, 3 匹)には Arg-Vasopressin (Daiichi-Sankyo, Japan) 0.02units/g を, コントロール群(n=6, 3 匹)には同量の生理食塩水を腹腔内に投与した. 両群ともに 1hr 後にエーテルによる深麻酔下に断頭し, 側頭骨を採取し蝸牛頂回転の前庭階を一部開放し, 基底回転から 2.5%グルタルアルデヒドを注入する還流固定と浸透固定の後に型どおりの方法で, 超薄切片を作製し電子顕微鏡下に観察した. 観察面は蝸牛軸平面とすることを原則とした. 観察の結果, 主に Vasopressin 群の血管条中間細胞に液胞を認めた.

### 液胞の定量

中間細胞に液胞が存在し, 細胞自体が拡大する所見が Vasopressin 群に認められた. ただしコントロール群には中間細胞が拡大する所見は認められないが, 少量の液胞は認められた. そのためこの液胞量を測定することを試みた. またその液胞量は各回転の血管条によって異なり, 頂回転ほど多い傾向が認められた. そのため本研究では, 第2回転の鼓室側の血管条に限定して液胞量を定量して各群で比較した.

電子顕微鏡での観察倍率は 2000 倍とし, 血管条全体を分割して撮影し, フィルムをスキャナーにてパーソナルコンピューターに取り込み, Photoshop Element にて各画像 (フィルム) をソフトウェア上で統合し, 血管条全体を1つの画像にした. 1つの切片上の血管条に存在する液胞の面積を合計して比較した. ただし全ての例で観察面を統一することは困難であり, 観察面が蝸牛軸から軽度にずれていた場合は, 血管条の断面積が増加する可能性があり, 従って前述の液胞の面積も増加することが推測される. そのため本研究では, 1つの血管条あたりの液胞の合計面積の血管条面積に対する比(液胞の面積合計/血管条面積)を求め, それを Vasopressin 群とコントロール群で比較した. ただし測定する液胞は長径が 1  $\mu$ m 以上の液胞のみに限定した.

### [結果]

Vasopressin 群で中間細胞の拡大と細胞内浮腫と思われる所見 (液胞) を認めた (図). 1つの切片上の血管条に存在する液胞の合計面積の血管条面積に対する比は Vasopressin 群では 0.036, コントロール群では 0.011 であり, 有意に Vasopressin 群で増加した ( $p < 0.01$ ).

### [考察]

本研究において体内物質である Vasopressin の投与で血管条の形態変化を来した意義は大きい。これまでの我々の研究で認められた、Vasopressin の投与後の聴覚機能低下は、この現象で説明できる可能性がある。中間細胞の細胞内浮腫の結果、組織全体の循環障害が生じ、酸素分圧の低下が起こり、Na-KATPase などの機能低下を介して、各種のイオン代謝に障害が生じたために、血管条機能が低下した可能性が示唆された。

### [結論]

本研究では、Vasopressin の腹腔内投与で、蝸牛血管条の中間細胞の拡大と細胞内浮腫と考えられる液胞を認めた。

### [参考文献]

- 1) Takeda T, Takeda S, Kitano H, et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration vasopressin. *Hear. Res.* 2000; 140: 1-6.
- 2) Sawada S, Takeda T, Kitano H, et al. Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *Neuro Report* 2002; 13: 1127-1129.
- 3) Takeda T, Sawada S, Takeda S, et al. The effects of V2 antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear. Res.* 2003; 182: 9-18
- 4) Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, et al. Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuro Report* 1999; 10: 1205-1207.
- 5) Takeda T, Kakigi A, Saito H, Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995; Suppl 519: 219-222.
- 6) Kumagami H, Loewenheim H, Beitz E, et al. The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Pflügers Arch.* 1998; 436: 970-975
- 7) Naganuma H, Kawahara K, Tokumasu K, Okamoto M. Water May Cure Patients With Meniere Disease. *Laryngoscope* 2006; 1455-1460.
- 8) Mhatre AN, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani, AK. Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear. Res.* 2002; 170: 59-69.
- 9) 長沼英明, 河原克雅, 鈴木善郎, 岡本牧人, 徳増厚二, 山科正平, 橋本晋一郎. 実験的内リンパ水腫動物モデルにおける聴覚の経時的変化の検討. *Otology Japan* 12(4): 402, 2002.



コントロール群



Vasopressin 群

☒

IC : 中間細胞

\* : 液胞

## 5. バソプレッシン投与によるラット血管条の形態変化について

西村将彦, 西岡利恵, 柿木章伸, 竹田泰三 (高知大),  
土井勝美, 久保 武 (大阪大), 岡田暉彦 (高知大・第二解剖)

### [はじめに]

メニエール病の病理組織学的特徴は内リンパ水腫である。これまでに我々は、メニエール病の患者で血漿バソプレッシン (VP) 値が上昇し(1), 実験的にモルモットに VP を負荷すると内リンパ水腫が生じることを報告してきた(2)。VP は、水チャンネルであるアクアポリン 2 (AQP2) の発現を制御し、水輸送のコントロールを行っている。さらに我々は、内リンパ液の産生部位と考えられている血管条内基底細胞に VP2 型レセプター (V2R) と AQP2 の蛋白発現を免疫組織化学的に証明している(3)。今回我々は、VP をラットに投与し、標的部位と考えられる血管条における組織学的変化を透過型電子顕微鏡を用いて検討した。

### [対象と方法]

Wistar 系ラット 13 匹に VP を  $50 \mu\text{g}/\text{Kg}$  皮下投与し、10, 20, 30, 40, 60 分後に外リンパ灌流固定を行った。その後、蝸牛よりラセン靭帯と共に血管条を摘出し、包埋。透過型電子顕微鏡 (Hitachi H7100) を用いて観察した。

### [結果]

VP 投与 10 分後の血管条には空包形成が見られ (図 1), 20, 30 分後の血管条には中間細胞に浮腫や細胞間隙が拡大する形態変化が生じた (図 2,3)。40, 60 分後の血管条では拡大していた中間細胞の細胞間隙はほぼ消失していた (図 4,5)。

### [考察]

血管条の基底細胞と中間細胞は gap junction により連結されており(4)、基底細胞の基底側膜には AQP2 が、頂側膜には V2R が発現している(5)。VP 負荷により AQP2 が発現すると、水は AQP2 を通過し、基底細胞から中間細胞へと拡散する。次に水は、中間細胞の細胞膜に発現している AQP1 を通過し(6)、一旦細胞間隙へと出た後、辺縁細胞へと向かう。その後、水は辺縁細胞の血管側膜に発現している Na - K - 2Cl 共輸送体により細胞内に汲み上げられる。そして、管腔側に発現している AQP7 および AQP9 を通過し内リンパ腔に移動すると考えられる(5,7)。Na - K - 2Cl 共輸送体は水ポンプとして機能しているが(8)、水の透過性は AQP に比して数分の一程度と評価されている(9)。そのため、VP 負荷により Na - K - 2Cl 共輸送体の水処理能力を超える水が細胞間隙に流入することにより、水が貯留するものと考えられる。

### [結論]

VP をラットに投与し、標的部位と考えられる血管条における組織学的変化を透過型電子顕微鏡を用いて検討した。VP 投与 20, 30 分後の血管条には中間細胞の浮腫や細胞間隙が拡大する形態変化が生じた。VP 負荷により AQP2 が発現し、血管条水処理能力を超える水が血管条内に流入することにより、細胞間隙に水が貯留すると考えられる。