

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月14日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21592167

研究課題名（和文） 抗利尿ホルモン投与による血管条の形態変化に伴う聴力障害に関する研究

研究課題名（英文） A study regarding sensorineural hearing impairment with morphological changes in stria vascularis induced by the administration of Arg-Vasopressin

研究代表者

長沼 英明（NAGANUMA HIDEAKI）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00198342

研究成果の概要（和文）：本研究において、1）AVPの過剰投与によりABR閾値は上昇した、2）24時間の脱水負荷を前処置として行うと同量のAVPの投与でABR閾値が上昇するまでの時間が短縮した、3）ただし同量のAVPの投与では蝸牛に形態学的な内リンパ水腫は認められなかった、4）光顕レベルではコルチ器の明らかな形態変化は認められなかった、5）しかし電顕レベルでは、同量のAVP投与で血管条中間細胞に細胞内浮腫と考えられる液胞を認めた、6）24時間の脱水負荷を前処置として行い、同量のAVPを投与すると中間細胞の液胞は増大した、7）この液胞形成はAVP-V2Rを介した反応であると考えられた、8）同量のAVP投与で蝸牛外側壁・血管条の組織酸素分圧は低下したことなどの結果が得られた。これらのことからAVPによるABR閾値の上昇は中間細胞の細胞内浮腫と考えられる液胞により血管条の細胞酸素分圧が低下し、その結果血管条機能が低下したことに伴い生じた可能性が示唆された。また脱水でAVPによる生理的・形態的变化が増大してしまう可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Wistar rats were intraperitoneally injected 0.02 units/g of AVP (Pitressin; Arg-vasopressin, Daiichi-Sankyo, Japan) in the all experiments in this study. ABR thresholds gradually increased significantly up to 60 min after the injection. When the dehydration load pretreatment for 24h was added, ABR thresholds rapidly increased significantly up to 10 min after the injection. However, the morphological endolymphatic hydrops in cochlea was not detected under a light microscopy. However, the enlargement of an area lacking intracellular organelles in the intermediate cells in stria vascularis or a so called “vacuole” was detected under transmission electron microscopy after the AVP injection. When the dehydration load pretreatment for 24h was added, the vacuole area increased with AVP injection. However, when the V2R antagonist (OPC-31260, donated by Otsuka Pharmaceutical) was administered before AVP, vacuole formation was suppressed significantly. Conversely, vacuole formation was not suppressed when the V1aR antagonist (OPC-21268, donated by Otsuka Pharmaceutical) was administered before AVP injection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	200,000	270,000	470,000
2012年度	700,000	0	700,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：Arg-vasopressin, Meniere's disease, V2R antagonist, V1aR antagonist, hydration therapy

1. 研究開始当初の背景

メニエール病における回転性めまい・聴力低下の発生メカニズムは明らかではない。またメニエール病は回転性めまいと蝸牛症状を主症状とし、その病理所見は内リンパ水腫とされているが、そのいずれの発生メカニズムも明らかではない。一方、抗利尿ホルモン(Arg-Vasopressin: AVP)は、精神的・肉体的ストレスにより分泌が増加すること、内リンパ水腫性疾患の代表的疾患であるメニエール病の発症は、ストレス負荷と強い関連性が報告されていること、AVPの過剰投与動物モデルで、内リンパ水腫が形成されることなどが報告され、メニエール病・AVP・ストレスの間の関連性が想定される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、血管条中間細胞の形態変化に伴う聴覚の機能低下、つまり、Arg-Vasopressin投与による聴覚低下動物モデルにおける、蝸牛血管条、外側壁病変を解析することであり、本研究ではこの動物モデルにおいて、同部位の機能に関して形態学的、生理学的に解析することである。

3. 研究の方法

3-1、AVP投与動物モデルにおける聴力変化

Takedaら、KumagamiらによりモルモットにAVPを過剰投与すると蝸牛に内リンパ水腫所見が認められることが報告されている。本研究では、このような動物モデルにおいて実際の内リンパ水腫疾患のように聴力が低下

しているかを確認することを試みた。Wistar系ラットを用いてAVPを過剰(Pitressin, Arg-Vasopressin, 0.02 units/g, Daiichi-Sankyo, Japan, 以下本報告でのAVPまたはその投与量は全て同様である。)投与後、ABR閾値を経時的に測定した。

3-2、AVP投与動物モデルにおける内リンパ水腫所見の有無

前述と同量のAVPの投与において形態学的に内リンパ水腫が生じているかどうかの確認を行った。コントロールとして同量の生理食塩水を投与した。内リンパ水腫の定量方法はTakedaらの報告の方法に準じて行った。

3-3、24時間脱水負荷後のAVP投与による聴力変化

投与したAVP(外因性AVP)の効果を増強させるために24時間の完全な水分摂取制限の後に同量のAVPを投与してABR閾値を再び継続的に測定した。

3-4、血管条の形態変化(電顕レベル)-1 AVP単純投与

次にAVPの投与による聴力低下メカニズムを検討するためにAVP投与後の血管条形態を電顕的に検討した。Wistar系ラットを用い同量のAVPを投与(AVP群)し60分後に断頭し、血管条を電顕的に観察した(定性的検討)。その結果、中間細胞の細胞質に細胞内小器官が存在しない部位、液胞が認められた。この液胞はAVP群に多く認められたがコントロー

ル群（同量の生理食塩水を投与）にも少量ではあるが認められるため、液胞が AVP による有意な所見であるかを確認するためには定量的検討が必要であった。また同液胞は蝸牛の頂回転-基底回転でその量が変化する可能性も存在するため、定量する部位をあらかじめ決定する必要がある。本実験では観察面は蝸牛軸が認められる面とし、第 2 回転の鼓室側の血管条とした。一切片の血管条内においても液胞が均一に存在しない場合もあるため、血管条のライスネル膜の付着する部分から、基底板側まで血管条全体を観察し液胞の量を測定した。第 2 回転の血管条が選ばれたのは以下の理由による。組織切片作製時の行程として、蝸牛に局所の還流固定を行うが、そのため頂回転と基底回転の前庭側に小孔をあけ、後者から固定液を注入し 前者からそれを流出させるがその小孔がそれぞれの血管条の形態に影響する可能性があるためである。

3-5、血管条の形態変化（電顕レベル）-2 脱水負荷の影響

前述のごとく 24 時間の脱水負荷の後、AVP を投与すると AVP 投与後 10 分で ABR 閾値が有意に上昇したが、同様に 24 時間の脱水負荷の血管条形態に対する影響を検討した（脱水後 AVP 群）。中間細胞の細胞質に認められた液胞の定量方法は前述と同様である。

3-6、血管条の形態変化（電顕レベル）-3, AVP 拮抗薬の影響

次に外因性 AVP の効果を抑制するために V2R 拮抗薬、V1aR 拮抗薬を前処置として投与した。その投与 1 時間後に同量の AVP を投与し、血管条形態への影響を検討した。本実験では V2R 拮抗薬として大塚製薬から提供された OPC31260、また V1aR 拮抗薬は同 OPC21268 を用いた。

3-7、蝸牛外側壁・血管条の組織酸素分圧に対する AVP の影響

血管条は多量の酸素を消費する組織と考えられている。AVP の投与によって生じた ABR 閾値の上昇のメカニズムを検討する上で、液胞により血管条の局所の虚血が生じ組織酸素分圧が低下するかを検討した。蝸牛外側壁の骨を削開し、酸素電極を挿入し組織酸素分

圧を測定した。測定部位は前述の血管条の形態変化を定量した蝸牛第 2 回転とした。電極を挿入し酸素分圧の値が安定した後に腹腔内に生理食塩水を投与し、その後前述と同量の AVP を投与し、酸素分圧を経時的に測定した。

4. 研究成果

4-1、AVP 投与動物モデルにおける聴力変化

AVP 腹腔内投与後約 60 分後に ABR 閾値が有意に上昇した。ここで興味深い事は AVP の投与は全身投与であるが ABR 閾値の上昇は一側の場合が多く、またその後は聴力は改善傾向にあった。このことはメニエール病の初期の状態に類似している。コントロールとして生理食塩水を投与した動物では ABR 閾値に変化は認められなかった。

4-2、AVP 投与動物モデルにおける内リンパ水腫所見の有無

実験前の予想では AVP 投与によって蝸牛に内リンパ水腫所見が生じるものと考えられていたが、蝸牛には内リンパ水腫所見は認められなかった。ただし形態学的に内リンパ水腫は形成されていないが内リンパ圧は上昇している可能性は否定できない。

また光顕レベルではあるが、コルチ器、血管条には AVP 投与による明らかな形態異常は認めなかった。特に有毛細胞、支持細胞また辺縁細胞、中間細胞、基底細胞には光顕レベルではコントロール群と AVP 群の間では特に変化は認められなかった。

4-3、24 時間脱水負荷後の AVP 投与による聴力変化

AVP の単純投与では 60-120 分後に ABR 閾値が上昇したが、24 時間の脱水負荷後の AVP 投与では 10 分後に閾値は有意に上昇した。このことは脱水負荷が外因性 AVP の効果を増強したものと考えられる。

脱水負荷により実験動物に何が生じたかということが次の疑問である。脱水により AVP が分泌され（内因性 AVP）、ある程度血中濃度は増加していると考えられるが AVP の投与量（外因性 AVP）は十分に多いため AVP 単純投与後と脱水後 AVP 投与後の血中 AVP 濃度はおそらく大きな違いは無いものと考えられる。脱水後に AVP を投与し場合は ABR 閾値

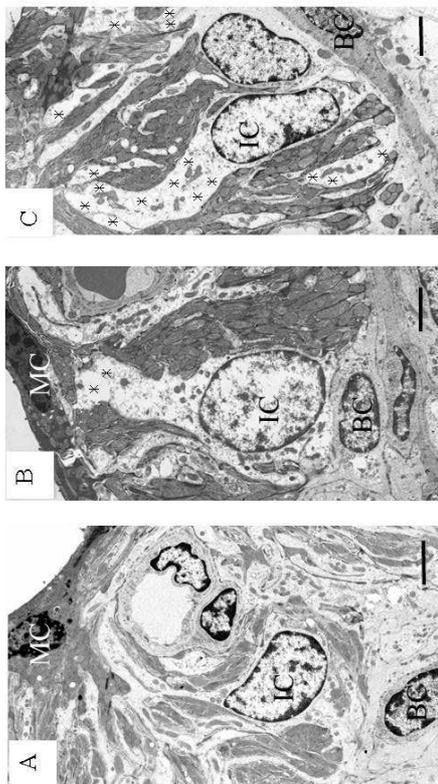
が AVP 投与後 10 分で上昇した理由として、脱水負荷により AVP-receptor の機能の活性化が生じていたものと推測した。そうであれば脱水負荷というストレスは次に投与される外因性 AVP の効果を増大させるというメカニズムが想定される。

4-4, 血管条の形態変化 (電顕レベル) - 1 AVP 単純投与

定量的観察の結果、AVP 群 (図 B) においてコントロール群 (図 A) に比して有意に液胞が多い事が観察された。ただし、辺縁細胞・基底細胞では液胞形成は認められなかった。

4-5, 血管条の形態変化 (電顕レベル) - 2 脱水負荷の影響

脱水負荷後に AVP を投与すると液胞形成は増大し、中間細胞の細胞質全体に液胞がみられる場合も存在した (図 C)。このことから、脱水負荷は外因性の AVP 投与の効果を増大し、血管条形態にも大きく影響することが確認された。ただし前述と同様に辺縁系細胞・基底細胞には形態変化は認められなかった。



MC: 辺縁細胞, IC: 中間細胞, BC: 基底細胞,
*: 液胞, Bar: 2μm.

コントロール群 (図 A), AVP 単純投与群 (図 B),
および 脱水負荷後 AVP 投与群 (図 C)

4-6, 血管条の形態変化 (電顕レベル) - 3, AVP 拮抗薬の影響

V2R 拮抗薬を前投与した群では中間細胞の細胞質の液胞の形成は抑制され、液胞の定量的検討において前述の AVP 群に比して有意に液胞は減少し前述のコントロール群と同レベルであった。また V1aR 拮抗薬の前投与では中間細胞の液胞は抑制されずコントロール群に比して有意に増加しており、AVP 群と同レベルであった。

4-7, 蝸牛外側壁・血管条の組織酸素分圧 に対する AVP の影響

生理食塩水の投与では組織酸素分圧は変化しなかったが、AVP の投与では有意にそれが低下した。ただし同時に測定した体幹の動脈血酸素飽和度は変化しなかった。このことから蝸牛外側壁の組織酸素分圧の低下は中間細胞の液胞との関連性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 34 件)

- (1). 査読 無、長沼英明: Hydration Therapy, 水分摂取療法 耳鼻咽喉科・頭頸部外科、特集 メニエール病 Update、84 巻 13 号: 989-995. 2012
- (2). 査読 無、長沼英明: めまい・メニエール病の治療、メニエール病に対する水分摂取療法 日本医事新報、No. 4579, 2012. 1. 29: 73-75. 2012.
- (3). 査読 有、村山真弓、伊保清子、浅野和江、阿久津二夫、長沼英明、徳増厚二、岡本牧人: 脊髄小脳変性症に対する TRH-T 療法効果の重心動揺検査による短期間評価. Equilibrium Research 71(1):40-46, 2012
- (4). 査読 有、伊保清子、浅野和江、村山真弓、阿久津二夫、長沼英明、徳増厚二、岡本牧人: 脊髄小脳変性症における重心動揺検査: 特に 3 Hz 周期の動揺について. Equilibrium Research 70(2):67-76, 2011
- (5). 査読 無、長沼英明: メニエール病に対する水分摂取療法 (Hydration Therapy). 日本医事新報、学術論文 No. 4537, 2011. 4. 9: 85-88. 2011.
- (6). 査読 無、長沼英明: メニエール病に

に対する水分摂取療法とカクテル療法, Monthly Book ENTONI. 2010/5 No.120 10月号 株式会社 全日本病院出版会 めまいのカクテル療法: 74-80, 2010.

(7). 査読 無、長沼英明: メニエール病の診断と治療、Medico、千代田開発株式会社発行、株式会社共和企画編集、Vol. 41, No. 5、2010年5月: p153-156.

(8). 査読 無、長沼英明: メニエール病に対する薬物療法 -内服・点滴、高浸透圧脱水療法と水分摂取量法- 特集: メニエール病を理解する JOHNS Vol. 25, No. 6, 東京医学社、2009/6: 841-844

(9). 査読 有、Katsumata O, Ohara N, Tamaki H, Niimura T, Naganuma H, Watanabe M, and Sakagami H: IQ-ArfGEF/ BRAG1 is associated with synaptic ribbons in the mouse retina. European Journal of Neuroscience, Vol. 30: 1509-1516, 2009.

[学会発表] (計 62 件)

(1). 特別講演、長沼英明: めまいの予防について 第11回心臓二次予防センター「北里ゆうゆうクラブ」定期講演、2012/10/20 相模原市

(2). Naganuma H, Kawahara K, Sato R, Ochiai A, Tokumasu K, Makino H, Okamoto M: Morphological changes in stria vascularis in experimental animal models administered arginine vasopressin (AVP) -The second report. Influence of dehydration load. 27th Barany Society Meeting, 2012/6/11-13, Uppsala

(3). 特別講演、長沼英明: メニエール病に対する水分摂取療法 -基礎と臨床- 第76回相武耳鼻咽喉科研究会、2012/4/21 厚木市

(4). 特別講演、長沼英明: メニエール病に対する水分摂取療法 -基礎と臨床- 日本耳鼻咽喉科学会神奈川県地方部会学術集会、2012/1/21 横浜市

(5). 特別講演、長沼英明: メニエール病に対する水分摂取療法
津地区医師会、久居一志地区医師会、三重県耳鼻咽喉科医会、三重県医師会、三重県臨床内科医会 学術講演会、2011/7/7、三重県津市

(6). 特別講演、長沼英明: メニエール病コントロールのための水分摂取療法、厚生労

働科学研究・研究成果等普及啓発事業による成果発表会、市民講座、耳からくるめまい、ふらつき、耳鳴 -生活習慣との関連-、2011/2/18 名古屋。

(7). Naganuma H, Kawahara K, Tokumasu K, Ochiai A, Okamoto M: Hydration therapy for patients with Meniere's disease (the second report). 6th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010/11/15, Kyoto.

(8). Ochiai A, Naganuma H, Tokumasu K, Okamoto M: Peak Audiogram of Meniere's Disease. 6th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010/11/15, Kyoto.

(9). Odahara N, Iwashita Y, Takada T, Hatta K, Naganuma H: An investigation regarding the drinking method in Hydration Therapy for patients with Meniere's disease. 6th International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, 2010/11/15, Kyoto.

(10). Naganuma H, Kawahara K, Sato R, Tokumasu K, Ochiai A, Makino H, Okamoto M: Morphological changes in stria vascularis in experimental animal models administered arginine vasopressin. 26th Barany Society Meeting, 2010/8/19, Reykjavik.

(11). Ochiai A, Naganuma H, Tokumasu K, Okamoto M: Vertigo and disequilibrium of SLE patients. 26th Barany Society Meeting, 2010/8/19, Reykjavik.

(12). Makino H, Naganuma H, Ochiai A, Tokumasu K, Okamoto M: A research of disequilibrium disease at department of Neurotology, Kitasato University Hospital. 26th Barany Society Meeting, 2010/8/19, Reykjavik.

(13). シンポジウム、長沼英明: 方向交代性上向眼振をめぐって。方向交代性上向眼振を示す中枢性病巣-耳鼻咽喉科の立場から-: 第68回日本めまい平衡医学会総会・学術講演会 2009/11/27. 徳島。

(14). 特別講演、長沼英明: メニエール病に対する Hydration Therapy (水分摂取療法) 第6回 東京メニエール病カンファレンス 2009/6/27 東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長沼 英明 (NAGANUMA HIDEAKI)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：00198342

(2) 研究分担者

河原 克雅 (KAWAHARA KATSUMASA)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：70134525

阪上 洋行 (SAKAGAMI HIROYUKI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：90261528