

博士論文

メニエール病モデル動物における内リンパ水腫形成 に関わるバゾプレシンに関する研究

江上 直也

メニエール病モデル動物における内リンパ水腫形成
に関わるバゾプレシンに関する研究

所属：東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室

指導教官：山嵜 達也

申請者：江上 直也

目次

第1章 要 旨

第2章 研究の背景と目的

第3章 <研究①>

内リンパ水腫形成及びめまい発症に関わるバゾプレシン (VP)
に関する研究 ～内リンパ水腫モデル動物を用いた検討～

第4章 <研究②>

内リンパ水腫形成に関わる内耳におけるアクアポリン (AQP)
とバゾプレシン 2 型受容体 (V2R) に関する免疫組織学的研究

第5章 <研究③>

バゾプレシン 2 型受容体 (V2R) 拮抗的阻害薬による内リンパ
水腫軽減効果に関する研究

第6章 結 論及び今後の展望

第7章 謝 辞

第8章 参考文献

第1章 要 旨

メニエール病の病態に関わる因子としてバズプレシン (VP) と内耳水代謝異常に着目し、内リンパ嚢 (管) 閉塞モデル動物に VP2 型受容体 (V2R) 作動薬であるデスマプレシンを投与することで内リンパ嚢の機能不全に VP の V2 効果を相加した内リンパ水腫モデル動物を作成し、VP が内リンパ水腫形成及びめまい発症に関与していることを形態学的、機能的に解明した。次に、内耳水代謝に関わる蝸牛血管条におけるアクアポリン (AQP) 2 及び V2R の局在について免疫組織学的に明らかにした。最後に、V2R 拮抗的阻害薬の内リンパ水腫軽減効果について病理組織学的に検討し、内リンパ水腫形成における VP の関与について明らかにした。

第2章 研究の背景と目的

1. 背景

メニエール病はめまい発作を繰り返し、難聴や耳鳴、耳閉感などの蝸牛症状が反復・消長することを特徴とする疾患であり、その病理組織学的特徴は内耳における内リンパ水腫であることは広く知られている。原因としては、ストレス・血液循環障害・アレルギー・自己免疫・ウイルス・遺伝・水代謝異常など種々のものが考えられているが、現時点では原因として確立されたものはない。また、発作的にめまい・難聴・耳鳴などが起きる発症機序に関してもいまだに不明なことが多い。1965年に Kimura と Schuknecht が内リンパ嚢（管）を閉塞することでモルモットに高率に内リンパ水腫が出現することを報告し[1]、現在でもメニエール病の標準的なモデル動物として広く用いられている。しかしながらメニエール病に最も特徴的であるめまい発作は出現しておらず、メニエール病発作期のモデルとしては不十分であり、メニエール病の病態を忠実に再現するには至っていない。メニエール病患者では長期間に渡り、めまい発作を反復すると永続的な聴力低下をきたすばかりでなく、日常生活の質が著しく損なわれることがあり、臨床上、その対応に苦慮することもある。したがって、めまい発作を発症する内リンパ水腫モデル動物を新たに作成し、内リンパ水腫形成及び発症に関わる病態を解明することが求められている。

1.1. メニエール病について

1861年にフランスの医師 Prosper Meniere は片側の耳鳴を伴う進行する難聴及びめまい発作を繰り返した後、原疾患の白血病で亡くなった少女の剖検例において内耳に出血があることを初めて報告し[2]、めまいが内耳障害によるものであることを指摘した。1867年にこの症例を Adam Politzer がメニエール病として紹介した[3]。

メニエール病は内耳性めまいの代表的疾患の一つであるが、明確な診断基準に基づいて診断がなされる疾患であり、本邦では厚生労働省研究班によって 2008 年に診断基準が改訂されている[4]。世界的には American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery (AAO-HNS) 1995 のメニエール病診断基準（表 1）が最も一般的である[5]。メニエール病の本邦における推定有病率は 1980 年代には人口 10 万人あたり 17~20 人程度と推定されていたが、最近の調査では人口 10 万人あたり 35~48 人程度とされている[6]。このように近年、罹患率が増加している背景には現代のストレス社会との関わりが強く、表 2 に示すストレスが関連していると考えられている耳鼻咽喉科領域の代表的な疾患に挙げられているように生活習慣病としても重要な疾患である[7]。疫学的特徴として几帳面・神経質な性格傾向があり[8]、発症あるいは症状の増悪には心労、過労、不眠などの精神的・肉体的ストレスが関与することが報告されている[9]-[11]。

<p>1. Certain Meniere's disease (確認例) メニエール病確実例で死後、内リンパ水腫が確認されたもの</p> <p>2. Definitive Meniere's disease (確実例) 20分以上の回転性めまい発作が2回以上 1回以上の聴力検査により難聴を確認、難聴側の耳鳴または耳閉感 他の原因疾患が否定</p> <p>3. Probable Meniere's disease (疑い例) 1回の回転性めまい発作 1回以上の聴力検査により難聴を確認、難聴側の耳鳴または耳閉感 他の原因疾患が否定</p> <p>4. Possible Meniere's disease (見込み例) 聴力障害を伴わない回転性めまいあるいは変動する感音難聴と平衡 障害はあるが発作性の回転性めまいを伴わないもの 他の原因疾患が否定</p>
--

表1

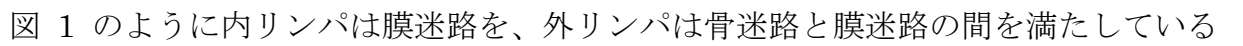
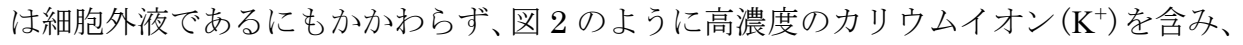
メニエール病の診断基準(AAO-HNS, 1995年)

部位	主な症状
呼吸器系	気管支喘息, 過換気症候群
循環器系	本態性高血圧症, 冠動脈疾患(狭心症, 心筋梗塞)
消化器系	胃・十二指腸潰瘍, 過敏性腸症候群, 潰瘍性大腸炎, 心因性嘔吐
内分泌・代謝系	単純性肥満症, 糖尿病
神経・筋肉系	筋収縮性頭痛, 痙性斜頸, 書痙
皮膚科領域	慢性蕁麻疹, アトピー性皮膚炎, 円形脱毛症
整形外科領域	慢性関節リウマチ, 腰痛症
泌尿・生殖器系	夜尿症, 心因性インポテンス
眼科領域	眼精疲労, 本態性眼瞼痙攣
耳鼻咽喉科領域	メニエール病
歯科・口腔外科領域	顎関節症

表2

各診療領域別の代表的なストレス関連疾患

1.2. 内耳の解剖と生理機能について

内耳は迷路骨包に包まれて、側頭骨岩様部に埋まっており、前から後ろに蝸牛、前庭・半規管がある。蝸牛は音情報を受容するために、前庭・半規管は平衡感覚をつかさどるために高度に分化した末梢器官である。前庭系の感覚器は耳石器と半規管であり、それぞれ直線加速度及び回転加速度を感受している。耳石器には球形囊及び卵形囊があり、それぞれ球形卵形囊管で連なり、内リンパ管となって後頭蓋窩の硬膜内にある内リンパ囊に終わる。内耳は卵形囊と三半規管が属する上部 *pars superior* と蝸牛と球形囊が属する下部 *pars inferior* よりなり、内耳液には内リンパと外リンパがあり、 図 1 のように内リンパは膜迷路を、外リンパは骨迷路と膜迷路の間を満たしている [12]。内リンパ系は蝸牛、前庭、内リンパ囊から成り立つ連続腔であるが、内リンパは細胞外液であるにもかかわらず、 図 2 のように高濃度のカリウムイオン(K^+)を含み、高電位を帯びている [12]。内リンパのこの非常に特殊なイオン・電位環境は聴覚・平衡覚の高い感受性に大きく貢献している。内リンパの流れに関しては、*longitudinal flow theory*、*radial flow theory*、*dynamic flow theory* の3つの仮説があり、電位・電解質は各部位 (蝸牛、前庭・半規管、内リンパ囊) にて独立して調節されており (*radial flow*)、水の流れは蝸牛、前庭・半規管から内リンパ囊に流れている (*longitudinal flow*) とし、*radial flow* と *longitudinal flow* の両者が存在するとする *dynamic flow theory* が今のところ有力とされている [13]。内リンパの主な産生部位は、蝸牛では血管条、前庭・半規管では暗細胞とされ、主な吸収部位は内リンパ囊と考えられている。

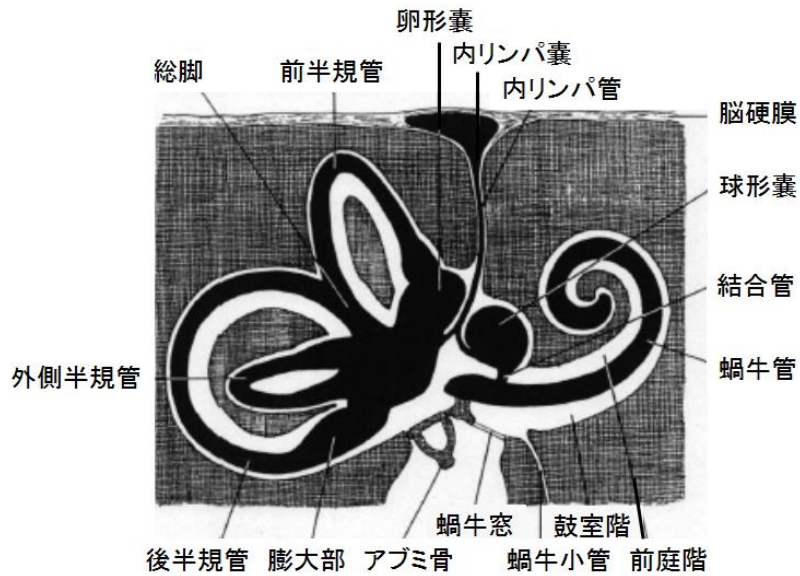


図 1 膜迷路の模型図 [12]

内耳液には内リンパ（黒）と外リンパ（白）があり、内リンパは膜迷路を、外リンパは骨迷路と膜迷路の間を満たしている。内リンパ系は蝸牛、前庭（球形囊・卵形囊）半規管、内リンパ囊から成り立つ連続腔である。

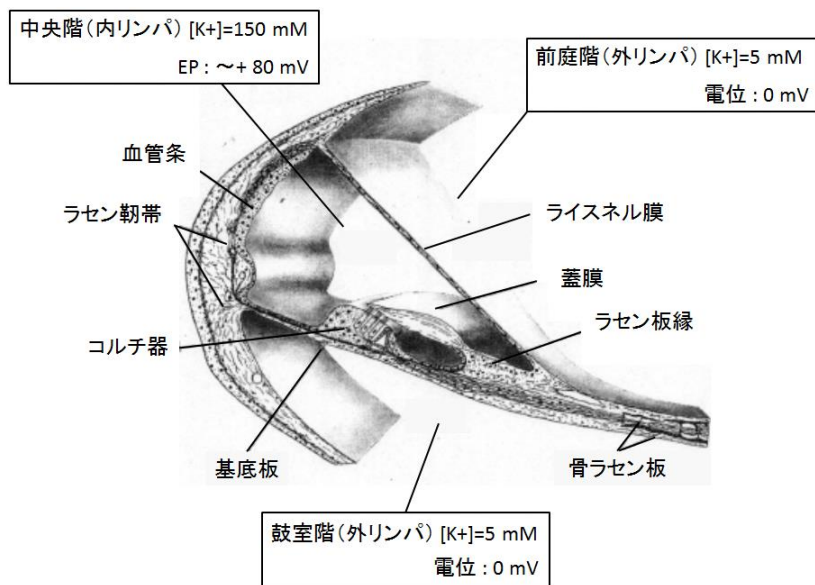


図 2 蝸牛管の解剖 [12]

中央階と前庭階はライスネル膜で分離されている。鼓室階と前庭階は通常の細胞外液とほぼ同じイオン組成である外リンパで満たされている。一方、中央階を満たす内リンパは細胞外液であるにもかかわらず、高濃度のカリウムイオン(K^+)を含み、高電位を帯びている。

1.3. 内リンパ水腫とメニエール病について

メニエール病の病理組織学的特徴は 1938 年の Yamakawa (図 3-A, B)、Hallpike & Cairns らによるヒト側頭骨病理報告以来[14], [15]、内耳に内リンパが過剰に貯留した内リンパ水腫であることは広く知られている。しかしながら「内リンパ水腫がメニエール病の原因か結果か」との問いかけに現在までいまだ答えは出されていない。

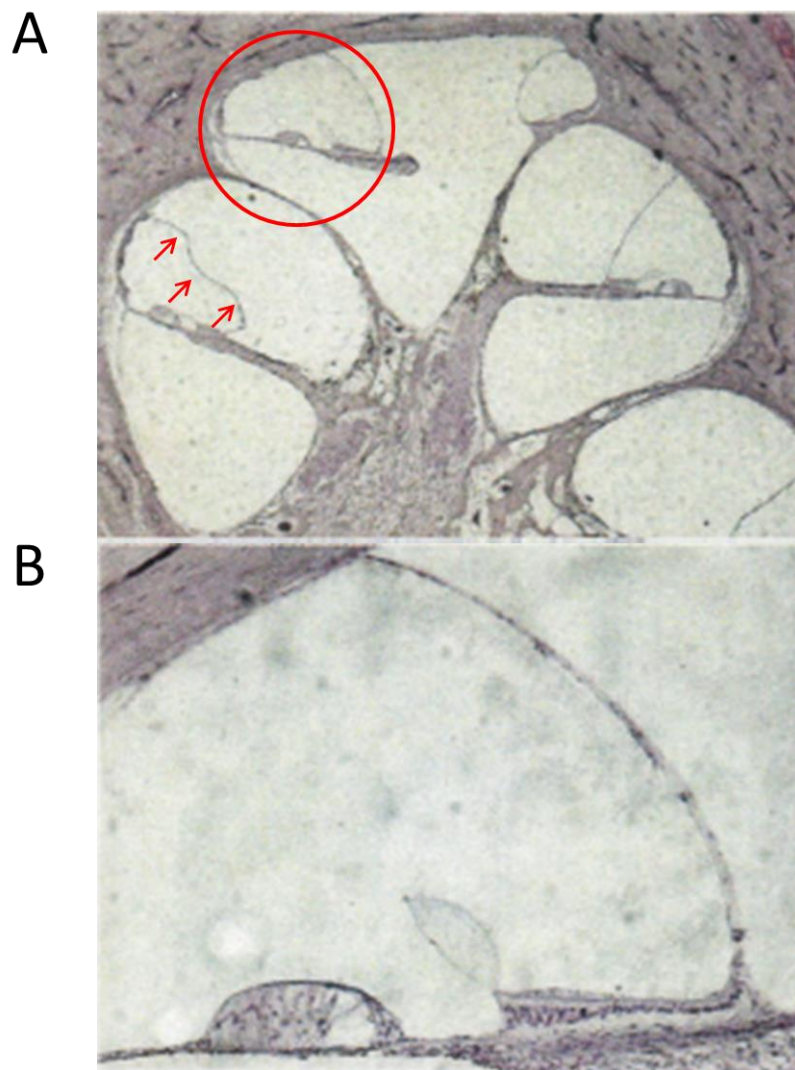


図 3 Yamakawa が報告したメニエール病症例のヒト側頭骨病理所見 [14]

ライスネル膜は膨大し、軽度の内リンパ水腫を認める (BはAの赤丸を拡大したもの)。また赤矢印で示すように籬壁の形成を認める。

近年、上述の報告から 80 年弱経過し、ヒト側頭骨病理所見にみる内リンパ水腫とメニエール病発症の関連性に関する検証が報告されている[16], [17]。Foster らは AAO-HNS 1995 のメニエール病診断基準[5]を満たす症例では全例に内リンパ水腫を認めたものの、全内リンパ水腫症例のうち AAO-HNS 1995 の診断基準を満たしていたのは 3 割強程度であったと報告している[17]。このことより内リンパ水腫単独ではメニエール病発症には至らないと考えられるようになっている。

1.4. ストレスとバゾプレシンについて

1920 年代に Canno は外界からの様々な刺激（ストレッサー）により、諸バランスが崩れた際に生じる生体の緊急反応とホメオスタシス（恒常性維持）の二つの概念を提唱し、1936 年に Selye は生体が刺激を加えられた時に生体に生ずる反応をストレスという概念として発表している[18]。その後の研究により、現在では内分泌系・神経系・免疫系が多くホルモン、神経伝達物質、サイトカインを介して緊密なネットワークを形成し、協同あるいは拮抗し合いながらストレッサーに対する生体防御が行われていると考えられている[19]。ストレッサーには暑さ・寒さや騒音、混雑などの物理的ストレッサー、薬物、酸素欠乏、一酸化炭素などの化学的ストレッサー、人間関係や仕事上・家庭内の問題などの心理・社会的ストレッサーがある。これらの様々なストレス情報は脳内で様々な神経路を介して視床下部に情報伝達され、ストレス反応系である「視床下部－交感神経－副腎髄質系（SAM 系）」と「視床下部－下垂体前葉

「副腎皮質系 (HPA 系)」を活性化させる[19]。SAM 系が活性化されると血液中にカテコールアミンが放出され、血圧上昇、発汗、血糖上昇、覚醒、戦闘態度などの基礎反応が導かれる。HPA 系が活性化されると血液中に糖質コルチコイド (コルチゾールなど) が放出され、血圧上昇、血糖上昇 (糖新生の増加)、心収縮力の上昇、心拍出量の上昇、免疫系 (炎症抑制) など様々な生体の機能に影響を与える[20]。特に HPA 系はストレッサーに対して最初に反応する系として知られている。HPA 系で中枢性に糖質コルチコイド合成・分泌を制御するのは視床下部室傍核のコルチコトロピン放出ホルモン (CRH) ニューロンであり、CRH は下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生細胞を刺激し、副腎皮質における糖質コルチコイド分泌レベルが調整される。CRH ニューロンには抗利尿ホルモンであるバゾプレシン (VP) が共存し、CRH と VP は共に下垂体前葉からの ACTH 分泌を刺激し、ストレス時の内分泌応答調節において相乗的に重要な役割を担っている[21]-[24]。VP は急性ストレッサー以外に先述のメニエール病の疫学的背景からも考えられている発作の誘因になるような心労や不安、疲労などの慢性ストレッサーでも放出されることが知られている[25]-[27]。慢性ストレスにより下垂体前葉では ACTH 産生細胞における POMC (proopiomelanocortin: プロオピオメラノコルチン) mRNA の発現が慢性的に亢進し、糖質コルチコイド分泌レベルが亢進し、副腎が肥大する一方、視床下部室傍核における CRH mRNA の抑制及び CRH の末梢への出力が低下する、相反した反応が報告されている[28]。CRH mRNA レベルの低下と VP mRNA レベルの亢進及び末梢への出力

レベルとして下垂体門脈血中への VP 放出量の亢進は平衡関係にあり[29]、慢性ストレスに対しては CRH よりも VP が HPA 系の活性化に中心的な役割を担っているものと考えられている[30]。

2. 研究の目的

メニエール病の病理組織学的特徴は内耳における内リンパ水腫であり、前述の通り臨床的な特徴である変動する聴力障害や反復する回転性めまい発作は内リンパ囊における内リンパ吸収障害のみならず、その病態には内耳での水代謝異常が潜在することが想定される。前述の疫学的背景よりメニエール病の病態生理にストレスが関与していると考え、ストレスは内耳水代謝に何らかの形で影響を与え、内リンパ水腫を増悪させる機序が存在すると予想される。前述のようにストレスホルモンの一つである VP は昇圧作用以外に抗利尿ホルモン (antidiuretic hormone: ADH) でもあり、水代謝に関与する重要なホルモンである。したがって VP はメニエール病の病態を解明する上で内リンパ水腫形成とメニエール病発症に関する重要な鍵となるものと着想した。本研究では VP が内リンパ水腫形成に関わるかについて内リンパ水腫動物を用いて病理組織学的に検討し、VP の水代謝に関与する VP2 型受容体 (V2R) 及び VP が V2R に結合後、誘導される水チャネル蛋白である AQP2 の内耳における局在を確認するため、以下の事項の検証を行うことを目標とした。

【研究の手順】

研究①：内リンパ水腫形成及びめまい発症に関わる VP に関する研究

～内リンパ水腫モデル動物を用いた検討～

- 内リンパ水腫モデル動物の病理組織学的形態学的検討
- 内リンパ水腫モデル動物のめまい発症に関わる機能評価

研究②：内リンパ水腫形成に関わる内耳における AQP と V2R に関する免疫組織学的研究

- AQP 及び V2R の内耳における局在に関する免疫組織学的検討

研究③：V2R 拮抗的阻害薬による内リンパ水腫軽減効果に関する研究

- 内リンパ水腫軽減効果に関する病理組織学的形態学的検討
- 臨床応用に向けた至適投与量及び投与経路の検討

本研究はヘルシンキ宣言に則って行われ、動物実験の全過程は東京大学医学部動物実験実施規則及び NIH guide for the Care and Use of Laboratory Animals を遵守して施行され、実験動物の苦痛を最小限にするように努めた。

第3章 <研究①>

内リンパ水腫形成及びめまい発症に関わる VP に関する研究

～内リンパ水腫モデル動物を用いた検討～

1. 緒言

メニエール病では内リンパ産生・吸収のバランスが崩れた結果、内リンパ水腫が形成されると考えられる。内リンパの恒常性が破綻する原因として、内リンパ嚢での内リンパ吸収不全が予想され、Kimura らの内リンパ嚢（管）閉塞モデルも内リンパ水腫の原因として、内リンパの流れの途中で閉塞があれば、それより中枢側での内リンパのうっ滞により内リンパ水腫が生じるであろうという仮説の下に考案されている。また、メニエール病患者の側頭骨病理や側頭骨 CT でも内リンパ嚢の発育不全や前庭水管の低形成といった形態学的な報告がなされており[31]-[33]、内リンパ嚢における内リンパの吸収障害が内リンパ水腫の一因であると考えられている。しかしながらメニエール病はめまい発作を繰り返し、難聴や耳鳴などの蝸牛症状を反復・消長することを特徴とする疾患であり、単なる貯留水腫では増悪、軽減する内リンパ水腫を説明することは困難である。また Kimura らの内リンパ嚢（管）閉塞モデル動物では図 4 に示すようにライスネル膜の膨隆所見が見られ、中等度の内リンパ水腫が形成され、難聴を生じるものの[34], [35]、めまい発作は出現していない[36], [37]。メニエール病

発症の病態には内リンパ水腫形成に至る時間経過が機能的な結果の差違に影響を与えるものと思われる。慢性水腫モデルでは緩徐に進行する水腫の増大が形態生理学的な変化を、一方、急性水腫モデルでは内耳水代謝異常による急激な内リンパ腔容積の変化がめまい発作に何らかの影響をもたらすと考え、これら2つの因子を相加するモデルを考案した。VP は抗利尿ホルモンであり、水代謝に関与するホルモンである。内耳基礎研究ではモルモットに VP を投与すると蝸牛血管条が浮腫を起こし、内リンパ水腫が形成されることが報告されている[38], [39]。一方、臨床研究ではメニエール病を中心とする内リンパ水腫関連疾患では VP が異常高値を示すことが報告され、発作時に間歇期と比べより高値となっている[40], [41]。



図 4 Kimura らが報告した内リンパ囊(管)閉塞モデル動物の側頭骨病理所見 [1]

各回転においてライスネル膜の前庭階への膨隆所見が見られ、中等度の内リンパ水腫を認める。

2.1. 方法① 内リンパ水腫モデル動物の病理組織形態学的検討

内リンパ嚢における内リンパ吸収慢性機能不全状態下に VP 急性負荷を相加することとで内リンパ水腫形成が増悪し、めまい発症に至るとの仮説に基づき、内リンパ嚢(管)閉塞術と VP 投与を相加する内リンパ水腫モデル動物を作成した。内リンパ水腫モデル動物の病理組織標本を用いて蝸牛、前庭(球形嚢・卵形嚢)、半規管における形態学的検討を行った。

2.1.1. 実験動物

体重 300g 前後のプライエル反射正常のモルモット(埼玉実験動物供給所) 24 匹を使用した。内リンパ水腫の作成は Kimura らが報告した内リンパ嚢(管)閉塞術に準じて行った[42], [43]。手術操作は左耳のみ行い、右耳は非手術側とした。手術法の詳細は 2.1.2 にて後述する。全ての動物は手術施行後、麻酔から覚醒していることを確認した後、温度管理環境、12 時間毎明暗サイクル環境下のコンベンショナル飼育施設において不断給餌、自由飲水の状態で飼育した。手術施行後、1 週飼育する群 (n=12) と 4 週飼育する群 (n=12) の 2 群に分類した。さらに 1 週もしくは 4 週飼育後に生理食塩水を投与する群 (n=6) と VP2 型受容体 (V2) 作動薬であるデスモプレシンを投与する群に分類した (n=6)。生理食塩水を投与する群では 25 ml/kg の生理食塩水を、デスモプレシンを投与する群では 100 µg/kg (25 ml/kg) のデスモプレシン酢酸塩水和物注射液(デスモプレシン注 4, 協和発酵キリン)を安楽死させる 1 時間前に体幹背

部皮下に注射投与した。2.1.3 にて後述する行程で標本を作製し、手術の有無（左耳：手術耳、右耳：非手術耳）、飼育の期間（1 週飼育もしくは 4 週飼育）、注射の有無（デスマプレシンか生理食塩水）によって図 5 のごとく、以下、(1) 手術後 1 週飼育、生理食塩水投与（右耳）：1W Control group（右耳）、(2) 手術後 1 週飼育、生理食塩水投与（左耳）：1W Surgery group（左耳）、(3) 手術後 1 週飼育、デスマプレシン投与（右耳）：1W Desmopressin group（右耳）、(4) 手術後 1 週飼育、デスマプレシン投与（左耳）：1W Combined group（左耳）、(5) 手術後 4 週飼育、生理食塩水投与（右耳）：4W Control group（右耳）、(6) 手術後 4 週飼育、生理食塩水投与（左耳）：4W Surgery group（左耳）、(7) 手術後 4 週飼育、デスマプレシン投与（右耳）：4W Desmopressin group（右耳）、(8) 手術後 4 週飼育、デスマプレシン投与（左耳）：4W Combined group（左耳）の 8 群（各 n=6）に分類した。

2.1.2. 内リンパ嚢（管）電気焼灼閉塞術

上述の動物をケタミン 35 mg/kg 及びキシラジン 5 mg/kg 左大腿筋肉内注射による深麻酔後、キシロカイン注射液 1% エピレナミン含有を皮膚切開予定部位に局部麻酔後、腹臥位、頭部固定にて手術を施行した。後頭部に 5 cm 程度の正中切開を加え、後頭部頭蓋骨に付着する筋肉を切除し、後頭骨を露出させ、手術用顕微鏡（Carl Zeiss, Germany）下に後頭骨を削開、側頭骨を露出させ、S 状静脈洞を同定、硬膜外アプローチにて内リンパ嚢を同定、露出させた。S 状静脈洞を損傷しないように注意しながら

ら、サージトロンバイポーラ・フォーセップ J1 (Ellman International, USA) にて内リンパ嚢を電気焼灼した後に、歯科用リーマーで内リンパ管を閉塞させた(図 6-A-H)。

手術操作後、皮下組織及び皮膚を縫合した。

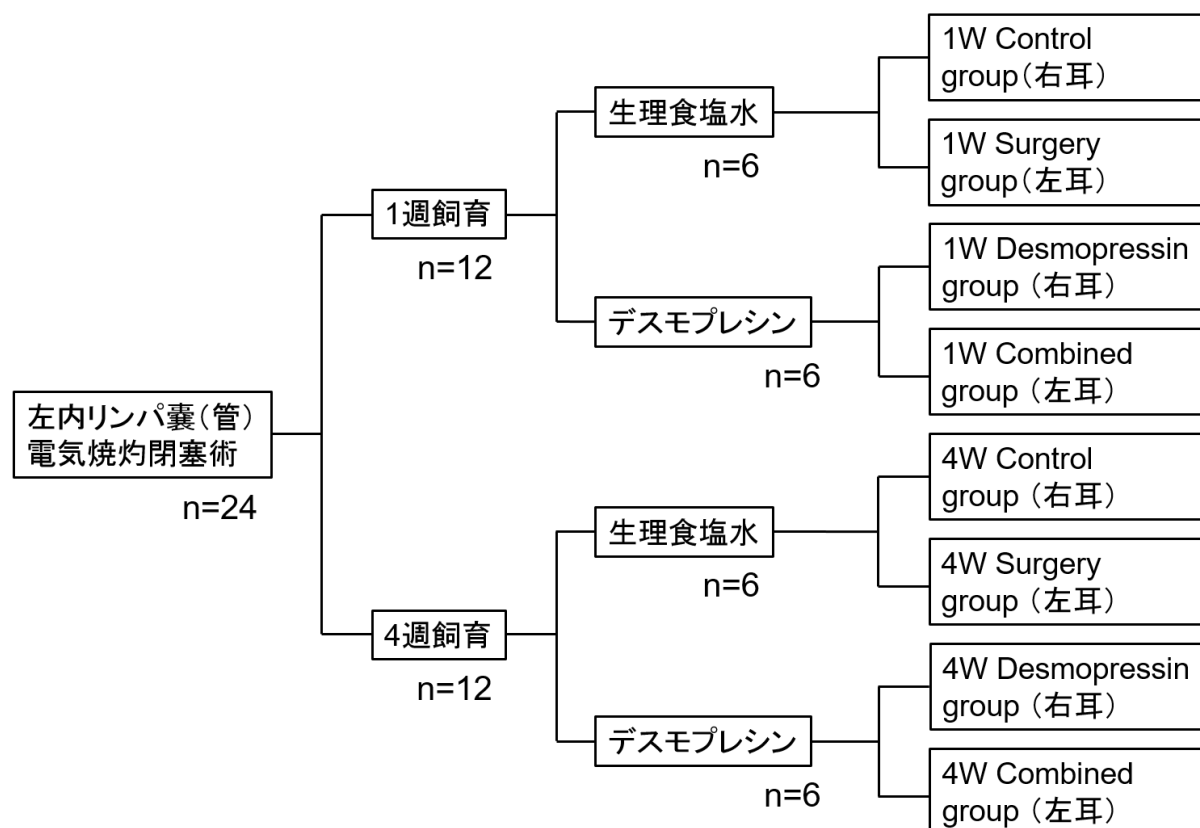


図 5 方法①の実験計画

左内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術施行後、1週飼育する群と4週飼育する群に分類した。さらに1週もしくは4週飼育後に生理食塩水を投与する群とVP2型受容体(V2R)作動薬であるデスモプレシンを投与する群に分類した。手術の有無(左耳:手術耳、右耳:非手術耳)、飼育の期間(1週飼育もしくは4週飼育)、注射の有無(デスモプレシンか生理食塩水)によって8群に分け、側頭骨病理組織標本を作成した。

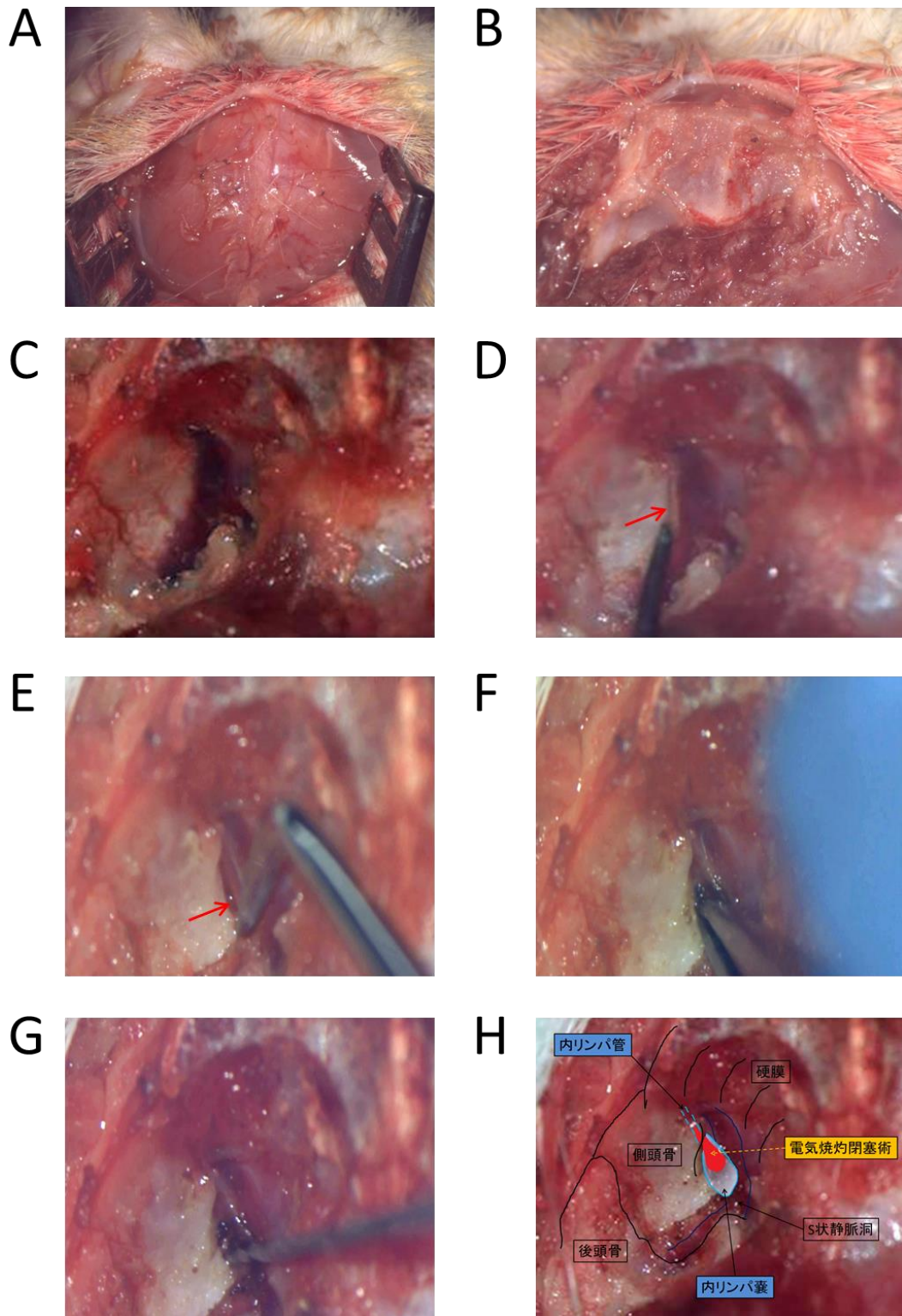


図6 内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術

後頭部正中切開 (A)、後頭骨を露出 (B)、手術用顕微鏡下に後頭骨を削開 (C)、側頭骨を露出させ、S状静脈洞 (赤矢印) を同定 (D)、硬膜外アプローチにて内リンパ嚢 (赤矢印) を同定 (E)、サージトロンバイポーラにて内リンパ嚢を電気焼灼 (F) し、歯科用リーマーで内リンパ管を閉塞させた (G, H)。

2.1.3. 標本作成

2.1.1.の行程後、全ての動物をケタミン 35 mg/kg 及びキシラジン 5 mg/kg 腹腔内注射による深麻酔下にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を左心室経由灌流後、10% 中性緩衝ホルマリン (武藤化学) により左心室経由灌流固定した後に断頭した。下顎及び頭皮を外し、両側側頭骨を摘出後、4°Cにて同ホルマリン液にて 1 週間浸漬固定した。続いて室温にて 10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて、2 週間脱灰を行い、アルコール系列で脱水した後、パラフィンに包埋してブロックを作成した。蝸牛軸に平行に 6 μm 厚の側頭骨切片を作成し、シランコーティングスライドガラス (松浪硝子工業) にマウントして切片をキシレンにて脱パラフィン化し、エタノール系列で親水化後にヘマトキシリントエオジンにて染色し、脱水、透徹、封入し、光学顕微鏡 (ECLIPSE ME600D, Nikon) で観察した。

2.1.4. 内リンパ腔面積の計測

蝸牛、前庭 (球形囊・卵形囊)、半規管における内リンパ水腫の程度を形態学的に評価するために光学顕微鏡にて観察した像をコンピューターに取り込み、画像解析ソフト (Micro Analyzer Ver. 1.1, 日本ポラデジタル) にて内リンパ腔面積を計測した。

蝸牛では蝸牛軸の中央となる切片で各回転において以下の2つのパラメーター(1) 内リンパ水腫形成により増大した中央階断面の面積 (図 7-A) : S_x (x : 各回転)、(2) 正常ライスネル膜の位置と考えられるラセン板縁中央と血管条上縁を結ぶ直線で囲

まれた正常中央階断面の面積（図 7-B）： S_{0x} （ x ：各回転）を指標として面積を計測した上で中央階の面積の増加率の総和（Total IR-S：Increase Ratio of the Scala media）を以下の計算式を用いて計算した。

$$\text{Total IR-S (\%)} = 100 \times \{ \Sigma (S_x - S_{0x}) / S_{0x} \} \quad (x : \text{基底、第 2、第 3、頂回転})$$

球形嚢ではアブミ骨底板を含む切片で前庭全体（図 7-C：灰色部分）に占める球形嚢の内リンパ腔容積（図 7-D：黒色部分）の面積比を、卵形嚢では外側半規管膨大部を含む切片で迷路全体（図 7-E：灰色部分）に占める卵形嚢の内リンパ腔容積（図 7-F：黒色部分）の面積比を計算した。半規管では後半規管膨大部を含む切片で後半規管の骨迷路全体（図 7-G：灰色部分）に占める内リンパ腔容積（図 7-H：黒色部分）の面積比を膨大部と脚部に分けて計算した。

2.1.5. 統計解析

同一個体間の手術耳と非手術耳間の手術による内リンパ腔容積の程度の相違の有意性は paired t -test にて、手術耳及び非手術耳における各 group 間の平均値の比較は Tukey's multiple comparison test にて統計解析ソフト（StatMate IV、アトムス）を用いて検定した。計測値は平均±標準偏差（standard deviation、SD）、有意確率（ P ）は 0.05 未満を有意とした。

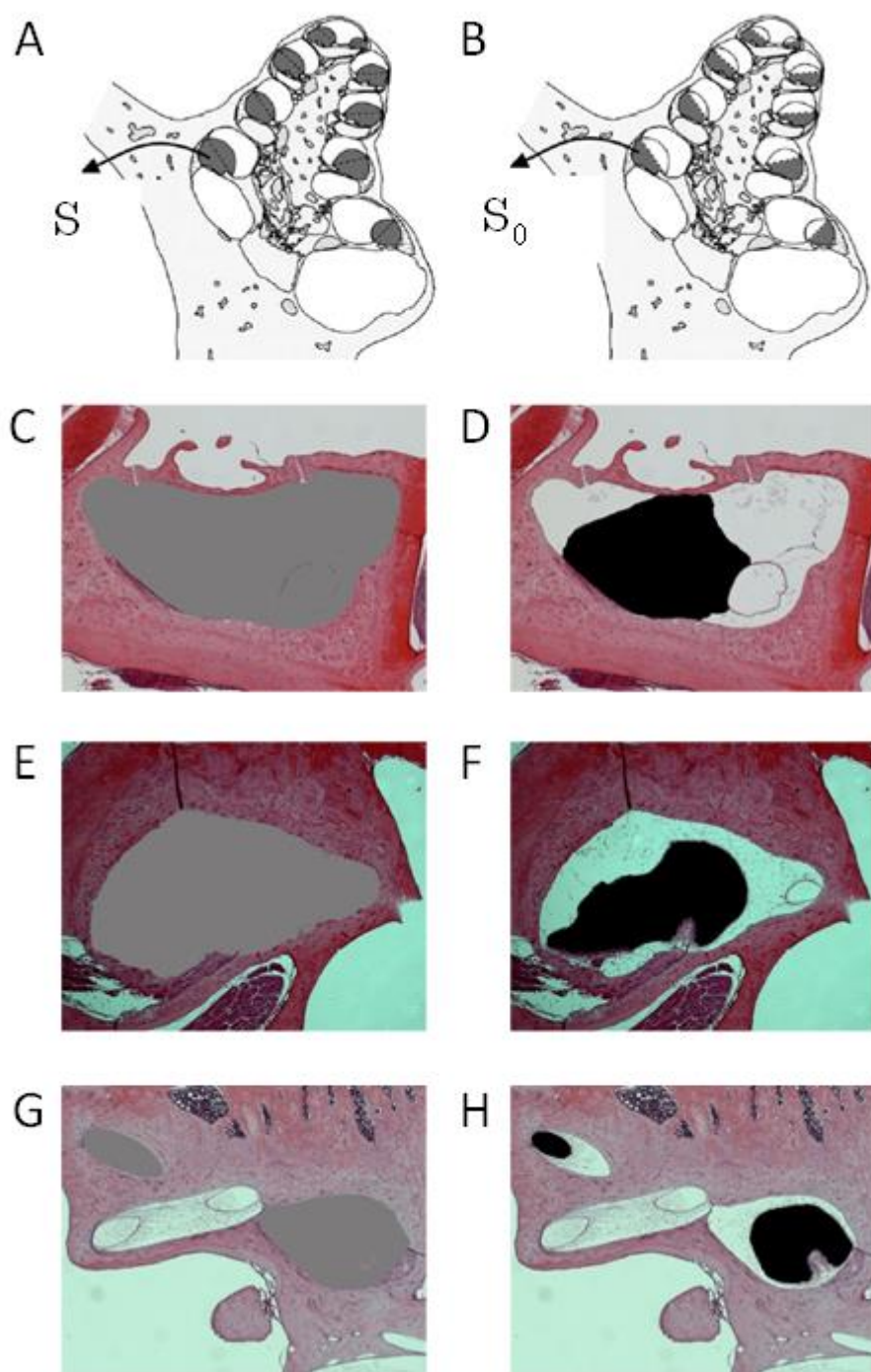


図7 内リンパ腔面積の計測

(A) 水腫形成により増大した中央階断面の面積(S)、(B) 正常中央階断面の面積(S_0)、
 (C) アブミ骨底板を含む切片で前庭全体(灰色部分)、(D) 球形囊の内リンパ腔容積(黒色部分)、
 (E) 外側半規管膨大部を含む切片で迷路全体(灰色部分)、(F) 卵形囊の内リンパ腔容積(黒色部分)、
 (G) 後半規管膨大部を含む切片で後半規管の骨迷路全体(灰色部分)、(H) 内リンパ腔容積(黒色部分)

2.2. 方法② 内リンパ水腫モデル動物の機能評価

本研究では自発眼振の出現及び転倒傾向を示す体平衡障害の出現をめまい発作発症の現象と考え、めまい発作がおきるかについて内リンパ囊（管）閉塞術による内リンパ慢性機能不全状態単独及び内リンパ囊（管）閉塞術による内リンパ慢性機能不全状態に VP 急性負荷を相加させることで機能評価として自発眼振及び体平衡障害を検討した。

2.2.1. 実験動物

体重 300g 前後のプライエル反射正常のモルモット（埼玉実験動物供給所）24 匹を使用した。うち 16 匹は 2.1.1-2.1.2 と同様の手法にて内リンパ囊（管）電気焼灼閉塞術を行った。手術施行後、1 週飼育する群（n=8）と 4 週飼育する群（n=8）の 2 群に分類した。さらに 1 週もしくは 4 週飼育後に生理食塩水を投与する群（n=4）と VP2 型受容体（V2R）作動薬であるデスモプレシンを投与する群に分類した（n=4）。残りの 8 匹は非手術動物とした。生理食塩水を投与する群では 25 ml/kg の生理食塩水を、デスモプレシンを投与する群では 100 µg/kg（25 ml/kg）のデスモプレシン酢酸塩水和物注射液（デスモプレシン注 4, 協和発酵キリン）を体幹背部皮下に注射投与後、1 時間に渡り、後述の方法にて自発眼振及び体平衡障害の有無について観察した。手術の有無、飼育の期間（1 週飼育もしくは 4 週飼育）、注射の有無（デスモプレシンか生理食塩水）によって図 8 のごとく、以下、(1) 非手術、生理食塩水投与：V-Control group、

(2) 非手術、デスマプレシン投与：V-Desmopressin group、(3) 手術後 1 週飼育、生理食塩水投与：V-1W Surgery group、(4) 手術後 1 週飼育、デスマプレシン投与：V-1W Combined group、(5) 手術後 4 週飼育、生理食塩水投与：V-4W Surgery group、(6) 手術後 4 週飼育、デスマプレシン投与：V-4W Combined group の 6 群（各 n=4） に分類した。

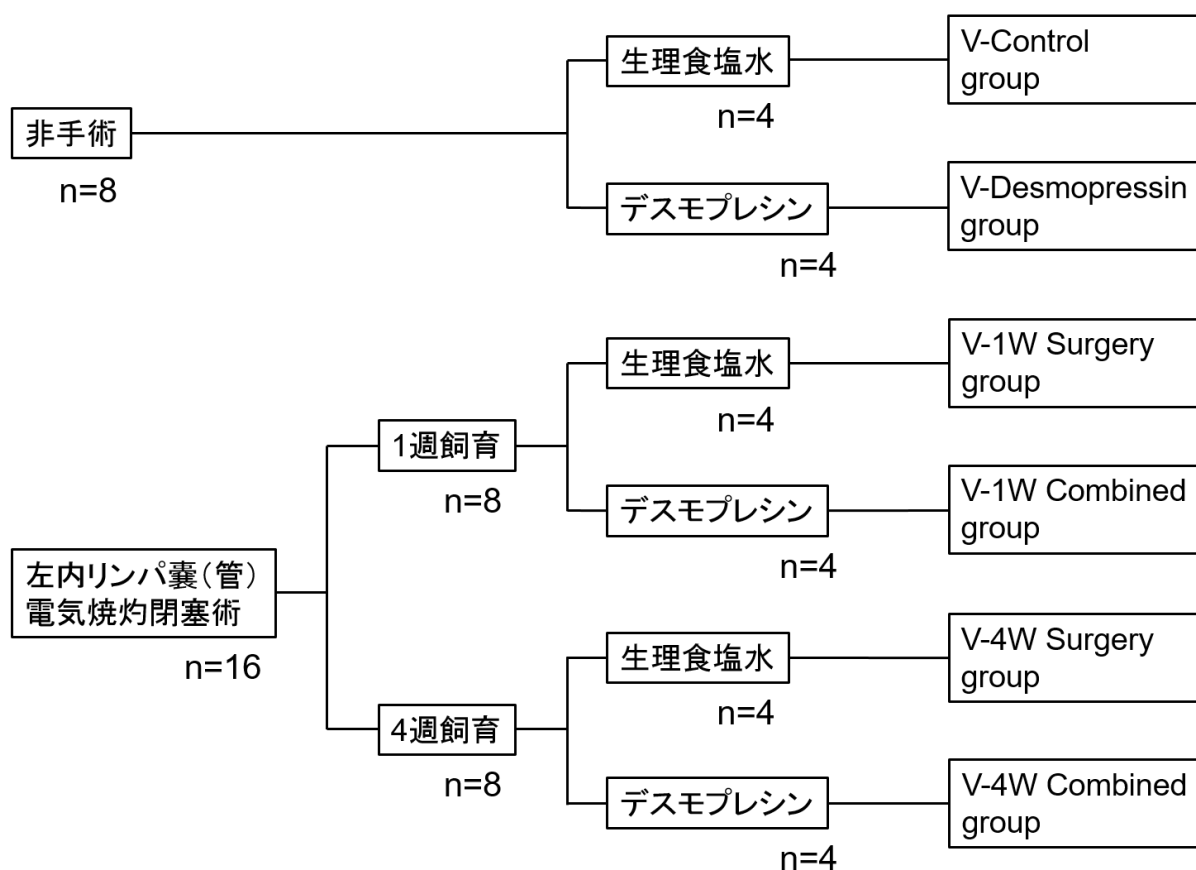


図 8 方法②の実験計画

左内リンパ囊（管）電気焼灼閉塞術施行後、1 週飼育する群と 4 週飼育する群に分類した。さらに 1 週もしくは 4 週飼育後に生理食塩水を投与する群と VP2 型受容体 (V2R) 作動薬であるデスマプレシンを投与する群に分類した。残りの 8 匹は非手術動物とした。手術の有無、飼育の期間（1 週飼育もしくは 4 週飼育）、注射の有無（デスマプレシンか生理食塩水）によって 6 群に分け、自発眼振及び体平衡機能を観察した。

2.2.2 前庭機能評価

生理食塩水もしくはデスマプレシン投与後1時間、暗所にて自発眼振の有無について赤外線 CCD カメラ下に眼球運動を記録し、眼球運動解析システム（図9）を用いて眼振の向きと最大緩徐相速度を測定した。体平衡障害の有無についても生理食塩水もしくはデスマプレシン投与後1時間に渡り観察し、ビデオカメラに記録した。

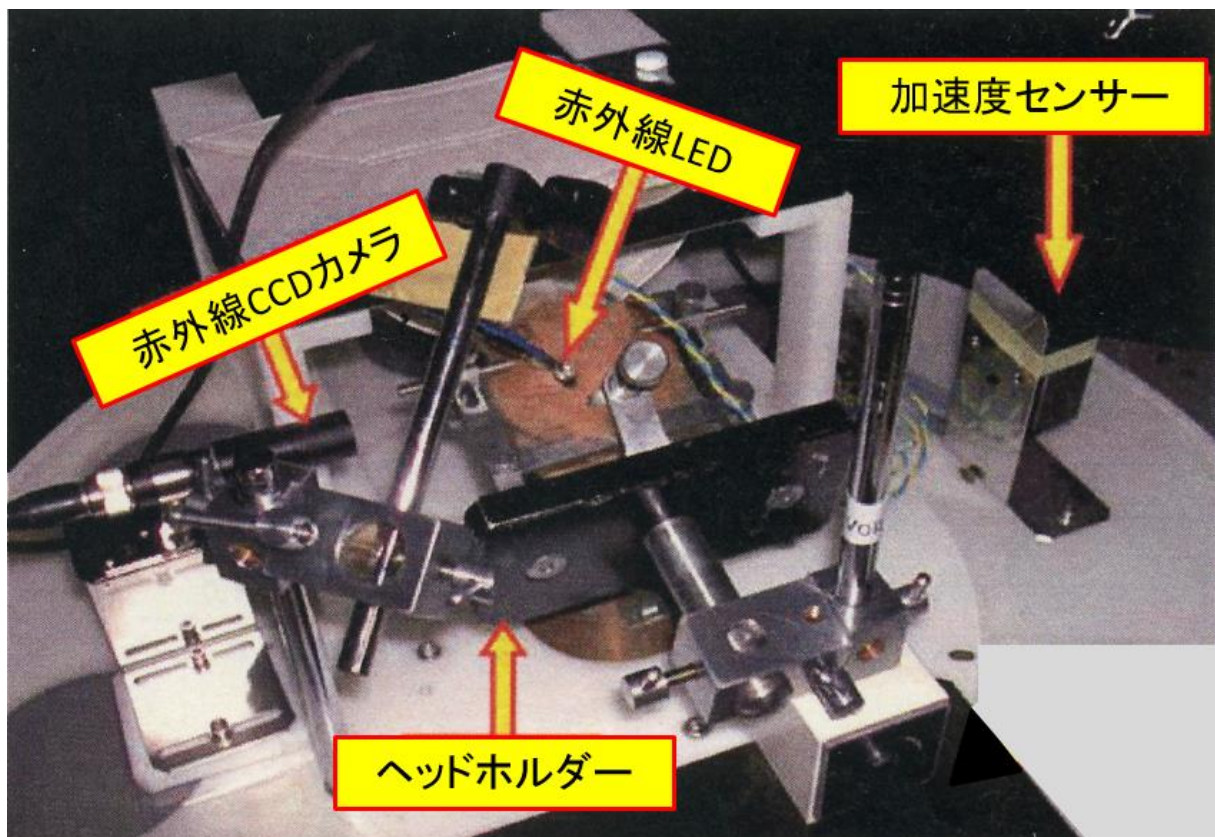


図9 眼球運動解析システム

生理食塩水もしくはデスマプレシン投与後1時間、暗所にて自発眼振の有無について赤外線 CCD カメラ下に眼球運動を記録し、眼球運動解析システムを用いて眼振の向きと最大緩徐相速度を測定した。

3. 結果

3.1.1. 方法① 内リンパ水腫モデル動物の病理組織所見の検討

図 10～16 に蝸牛、球形嚢、卵形嚢及び半規管の各群の代表的な病理組織標本写真（生理食塩水投与非手術耳：A、生理食塩水投与手術耳：B、デスマプレシン投与非手術耳：C、デスマプレシン投与手術耳：D）を示す。

蝸牛では1週飼育でも4週飼育でも非手術耳では内リンパ水腫形成を認めなかった（図 10, 11-A, C）。一方、手術単独耳では1週飼育ではライスネル膜がわずかに膨隆し、軽度の内リンパ水腫形成を（図 10-B）、4週飼育ではライスネル膜がさらに膨隆しており、中等度の内リンパ水腫形成を示していた（図 11-B）。また手術にデスマプレシン投与を相加した耳においては1週飼育ではライスネル膜が前庭階中央付近まで膨隆し、中等度の内リンパ水腫形成を認めた（図 10-D）。さらに手術後4週飼育し、デスマプレシン投与を相加した耳では図 11-D で示すようにライスネル膜が前庭階の上壁骨に広範囲に接着しており、高度の内リンパ水腫形成を認めた。

次に球形嚢では1週飼育でも4週飼育でも非手術耳では球形嚢の内腔に変化は認めず、蝸牛と同様、内リンパ水腫形成を認めなかった（図 12, 13-A, C）。一方、手術単独耳では1週飼育では球形嚢はわずかに膨隆し、軽度の内リンパ水腫形成を（図 12-B）、4週飼育では前庭の中央付近までさらに膨隆しており、中等度の内リンパ水腫形成を示していた（図 13-B）。また手術にデスマプレシン投与を相加した耳においては1週飼育では手術単独やデスマプレシン投与非手術耳と比較すると膨隆し、軽度～

中等度の内リンパ水腫形成を認めた (図 12-D)。さらに手術後 4 週飼育し、デスマプレシン投与を相加した耳の球形嚢内腔は著明に拡張し、球形嚢膜がアブミ骨底板に接着しており、高度の内リンパ水腫形成を認めた (図 13-D)。

同じ耳石器のうち卵形嚢は 1 週飼育では各耳ともに目立った差はなく、内リンパ腔の増大は認めなかった (図 14-A-D)。一方、4 週飼育では手術にデスマプレシン投与を相加した耳においては他耳 (図 15-A-C) と比べて内リンパ腔が増大し、迷路骨に卵形嚢膜が接している所見を示し、内リンパ水腫形成を示す耳を認めた (図 15-D)。

最後に半規管では 1 週飼育でも 4 週飼育でも非手術耳、手術単独耳、手術にデスマプレシン投与を相加した耳ともに膨大部、脚部いずれも内リンパ腔の増大を認めず、内リンパ水腫形成を認めなかった (図 16- A-H)。

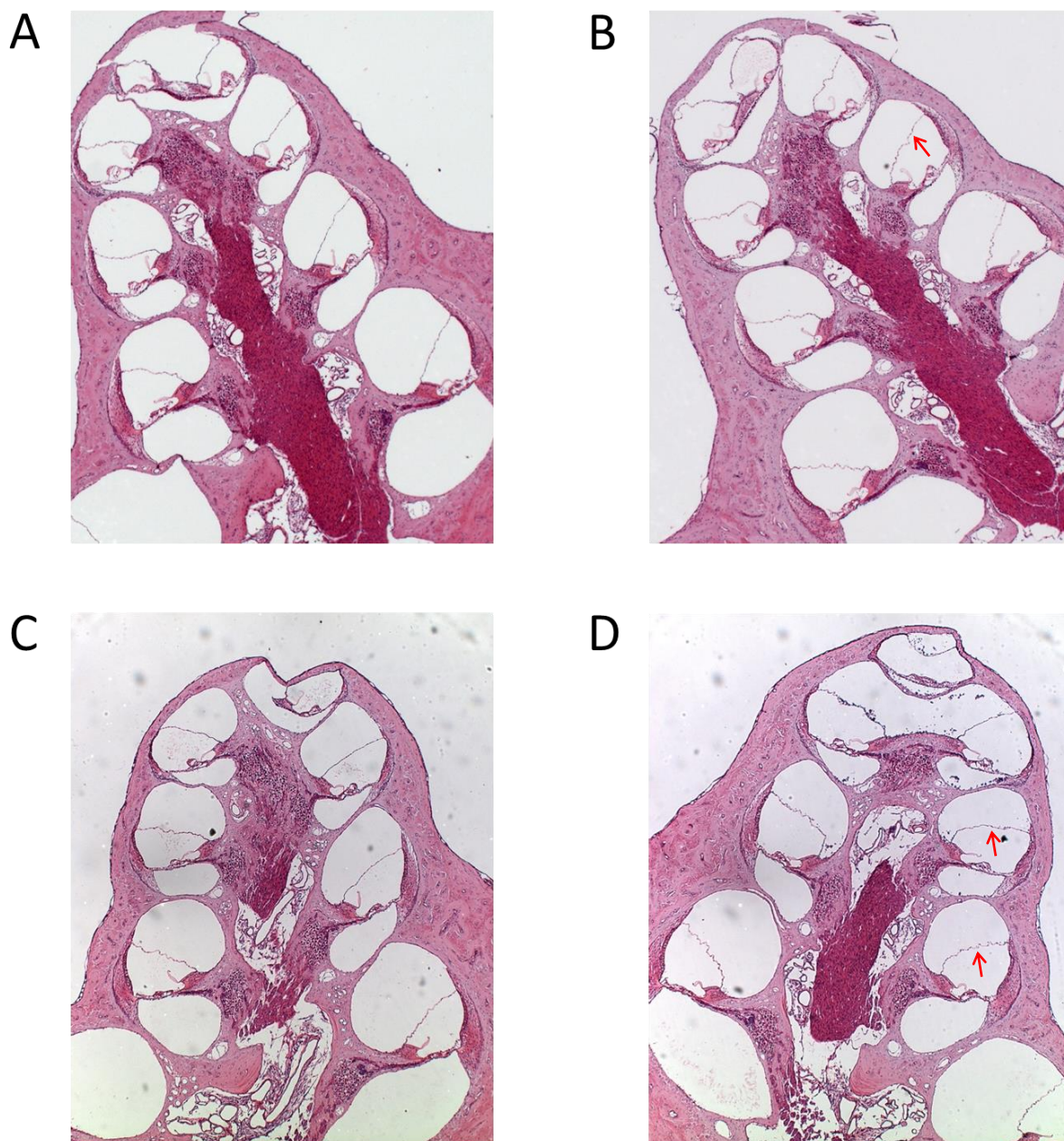


図 10

左内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術施行後、1週飼育後の蝸牛の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水投与非手術耳:A、生理食塩水投与手術耳:B、デスモプレシン投与非手術耳:C、デスモプレシン投与手術耳:D)

非手術耳では内リンパ水腫形成を認めなかった(A, C)。手術単独耳ではライスネル膜がわずかに膨隆し(赤矢印)、軽度の内リンパ水腫形成を示していた(B)。手術にデスモプレシン投与を相加した耳ではライスネル膜が前庭階中央付近まで膨隆し(赤矢印)、中等度の内リンパ水腫形成を認めた(D)。

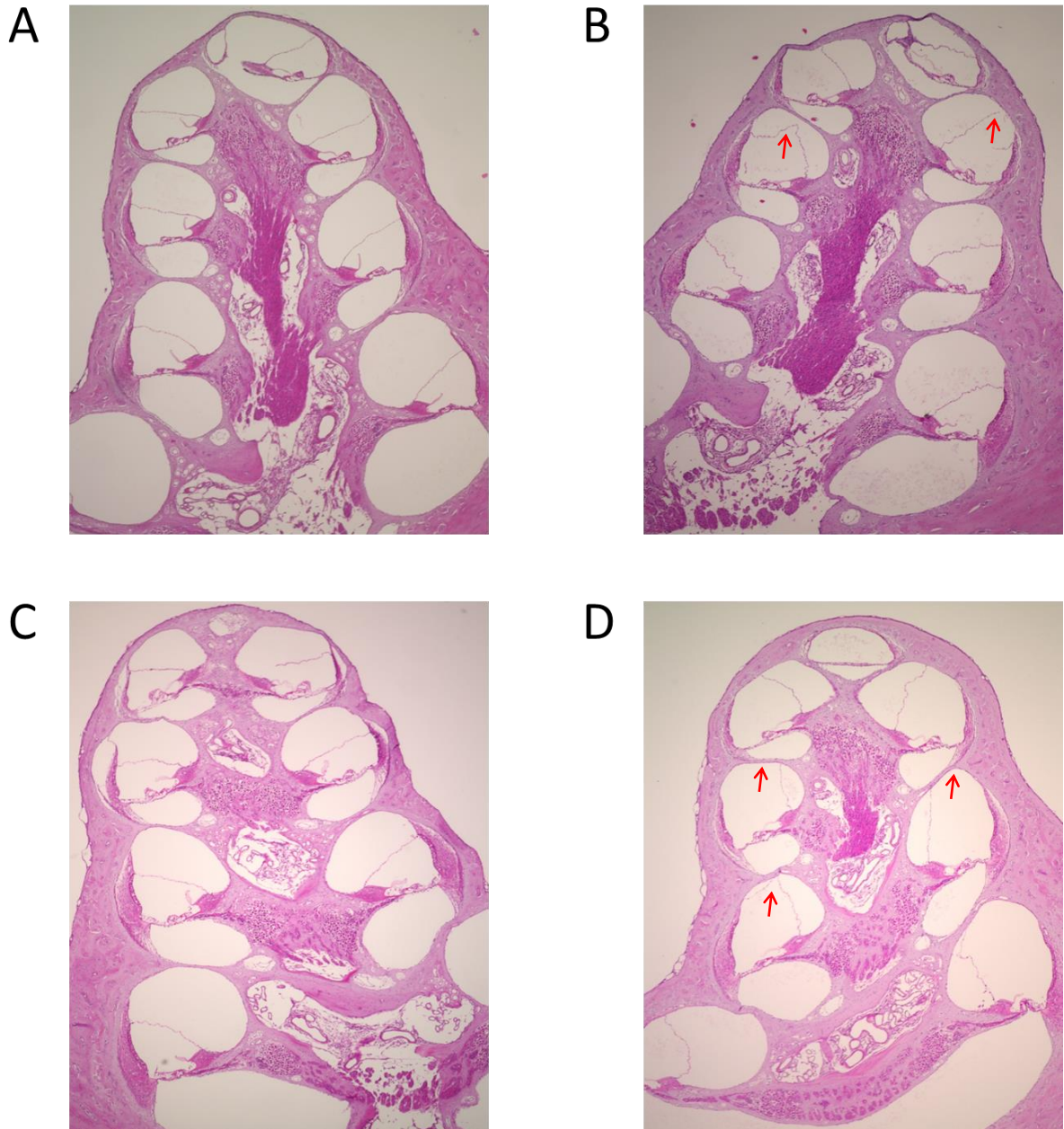


図 11

左内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術施行後、4週飼育後の蝸牛の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水投与非手術耳:A、生理食塩水投与手術耳:B、デスモプレシン投与非手術耳:C、デスモプレシン投与手術耳:D)

非手術耳では内リンパ水腫形成を認めなかった(A、C)。手術単独耳ではライスネル膜が1週飼育後よりもさらに膨隆しており(赤矢印)、中等度の内リンパ水腫形成を示していた(B)。手術にデスモプレシン投与を相加した耳ではライスネル膜が前庭階の上壁骨に広範囲に接着しており(赤矢印)、高度の内リンパ水腫形成を認めた(D)。

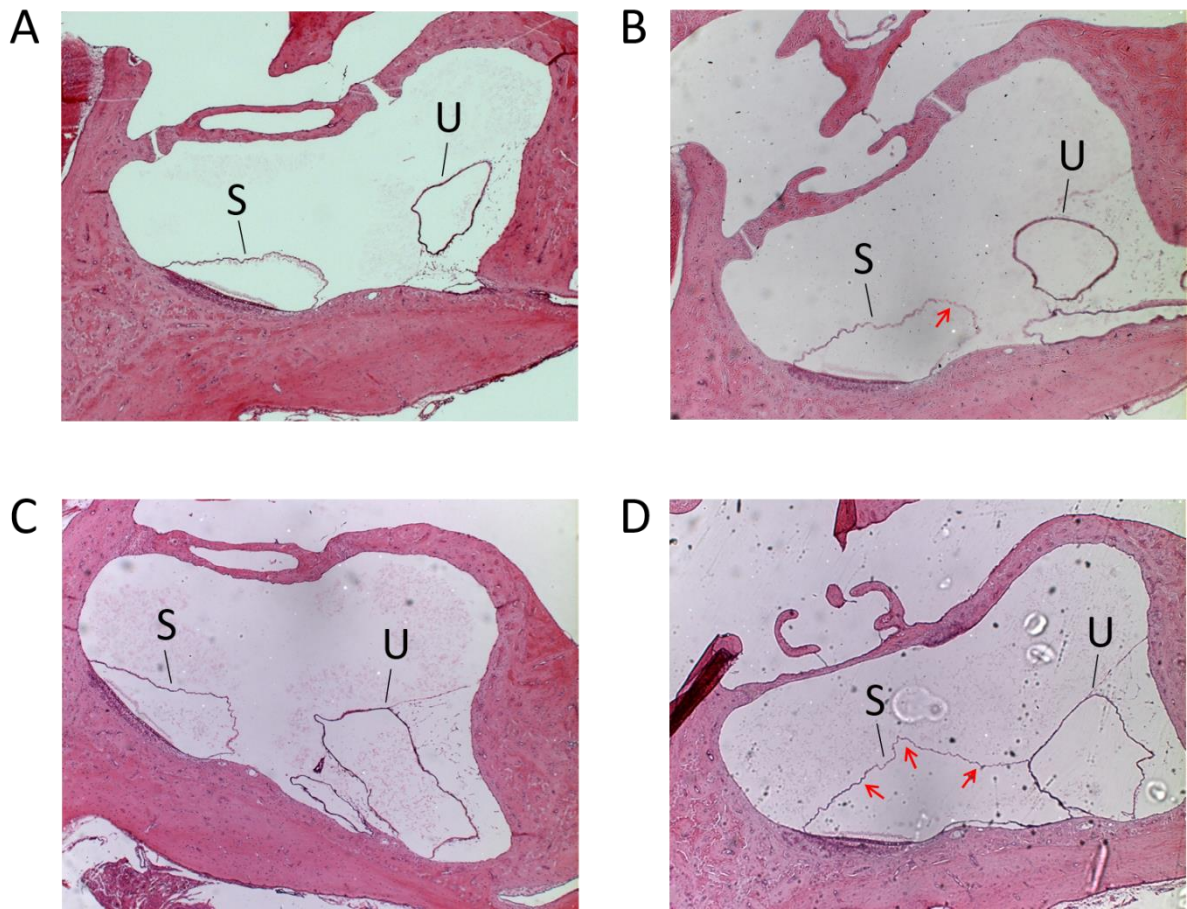


図 12

左内リンパ囊（管）電気焼灼閉塞術施行後、1週飼育後の球形囊の代表的な病理組織標本写真（生理食塩水投与非手術耳：A、生理食塩水投与手術耳：B、デスモプレシン投与非手術耳：C、デスモプレシン投与手術耳：D）

非手術耳では球形囊の内腔に変化は認めず、内リンパ水腫形成を認めなかった（A, C）。手術単独耳では球形囊はわずかに膨隆し（赤矢印）、軽度の内リンパ水腫形成を示していた（B）。手術にデスモプレシン投与を相加した耳では手術単独やデスモプレシン投与非手術耳と比較すると球形囊は膨隆し（赤矢印）、軽度～中等度の内リンパ水腫形成を認めた（D）。S:球形囊 U:卵形囊

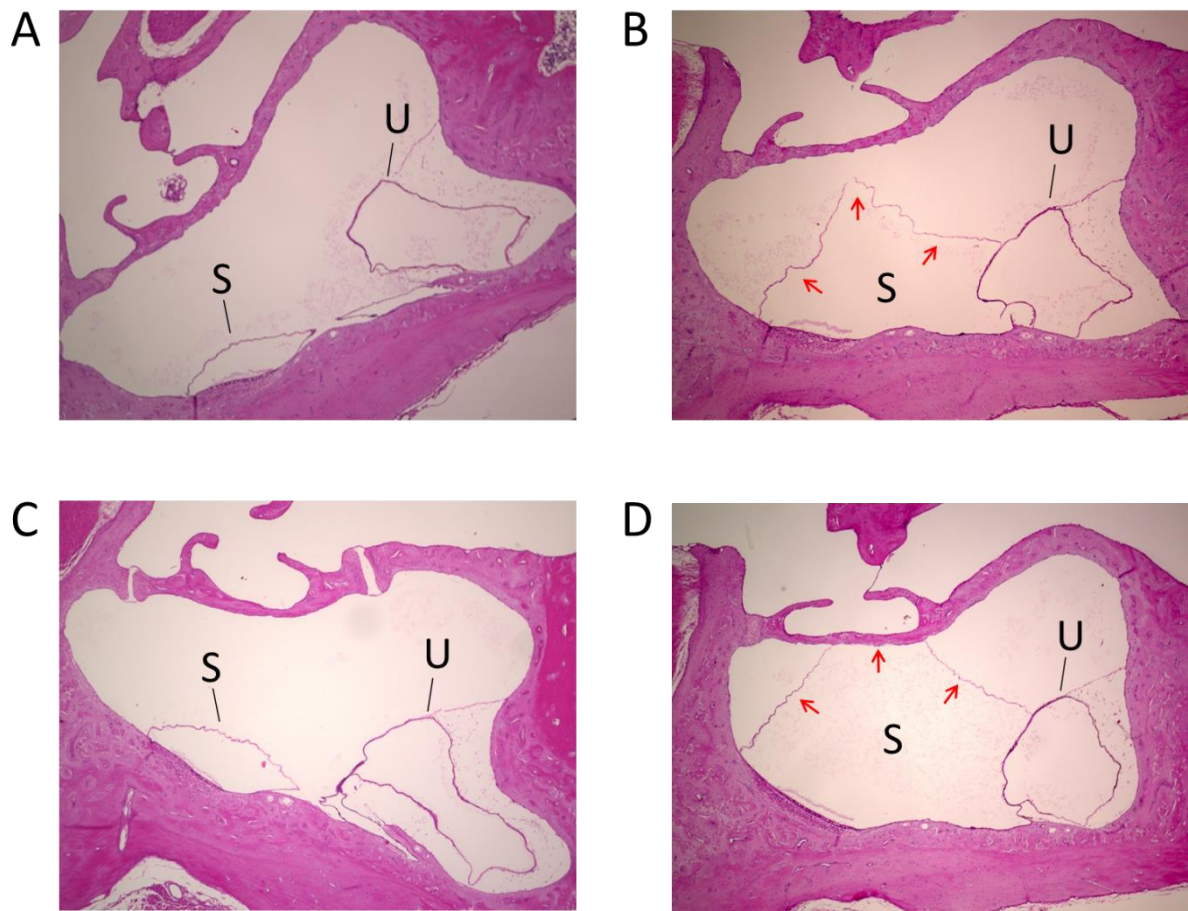


図 13

左内リンパ囊(管)電気焼灼閉塞術施行後、4週飼育後の球形囊の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水投与非手術耳:A、生理食塩水投与手術耳:B、デスマプレシン投与非手術耳:C、デスマプレシン投与手術耳:D)

非手術耳では球形囊の内腔に変化は認めず、内リンパ水腫形成を認めなかった(A,C)。手術単独耳では球形囊は1週飼育後よりも前庭の中央付近までさらに膨隆しており(赤矢印)、中等度の内リンパ水腫形成を示していた(B)。手術にデスマプレシン投与を相加した耳の球形囊内腔は著明に拡張し、球形囊膜がアブミ骨底板に接着しており(赤矢印)、高度の内リンパ水腫形成を認めた(D)。S:球形囊 U:卵形囊

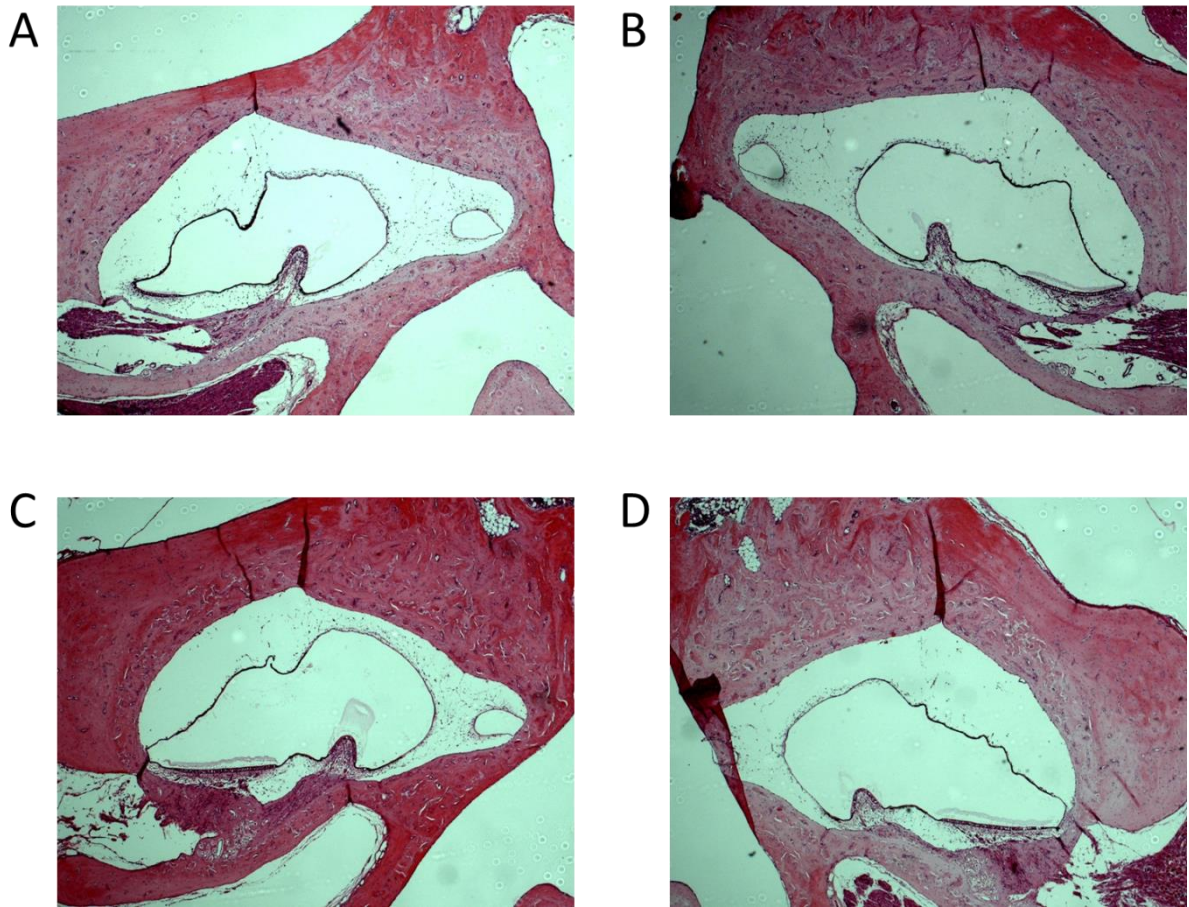


図 14

左内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術施行後、1週飼育後の卵形嚢の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水投与非手術耳:A、生理食塩水投与手術耳:B、デスモプレシン投与非手術耳:C、デスモプレシン投与手術耳:D)

各耳ともに目立った差違はなく、内リンパ腔の増大は認めなかった(A-D)。

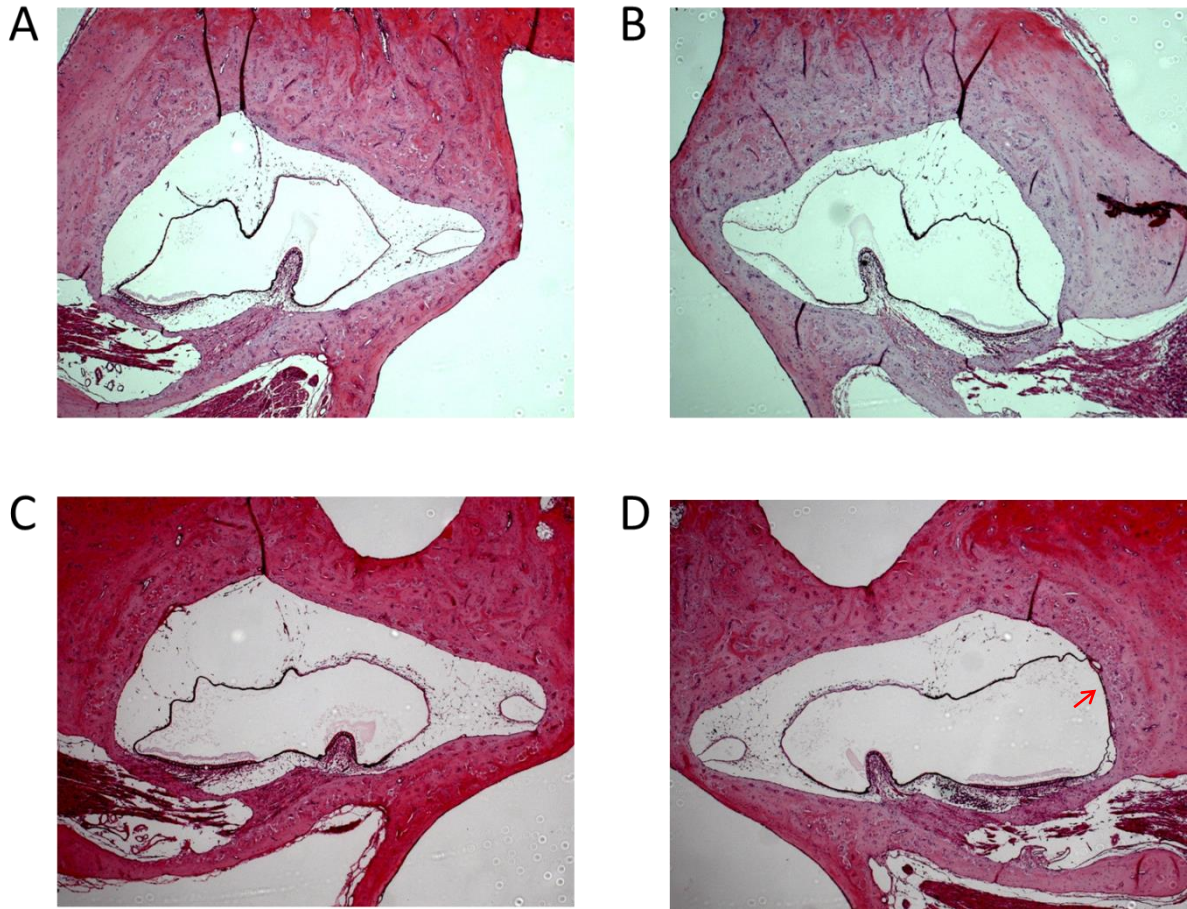


図 15

左内リンパ囊(管)電気焼灼閉塞術施行後、4週飼育後の卵形囊の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水投与非手術耳:A、生理食塩水投与手術耳:B、デスモプレシン投与非手術耳:C、デスモプレシン投与手術耳:D)

手術にデスモプレシン投与を相加した耳(D)では他耳(A-C)と比べて内リンパ腔が増大し、迷路骨に卵形囊膜が接している所見(赤矢印)を示し、内リンパ水腫形成を認めた。

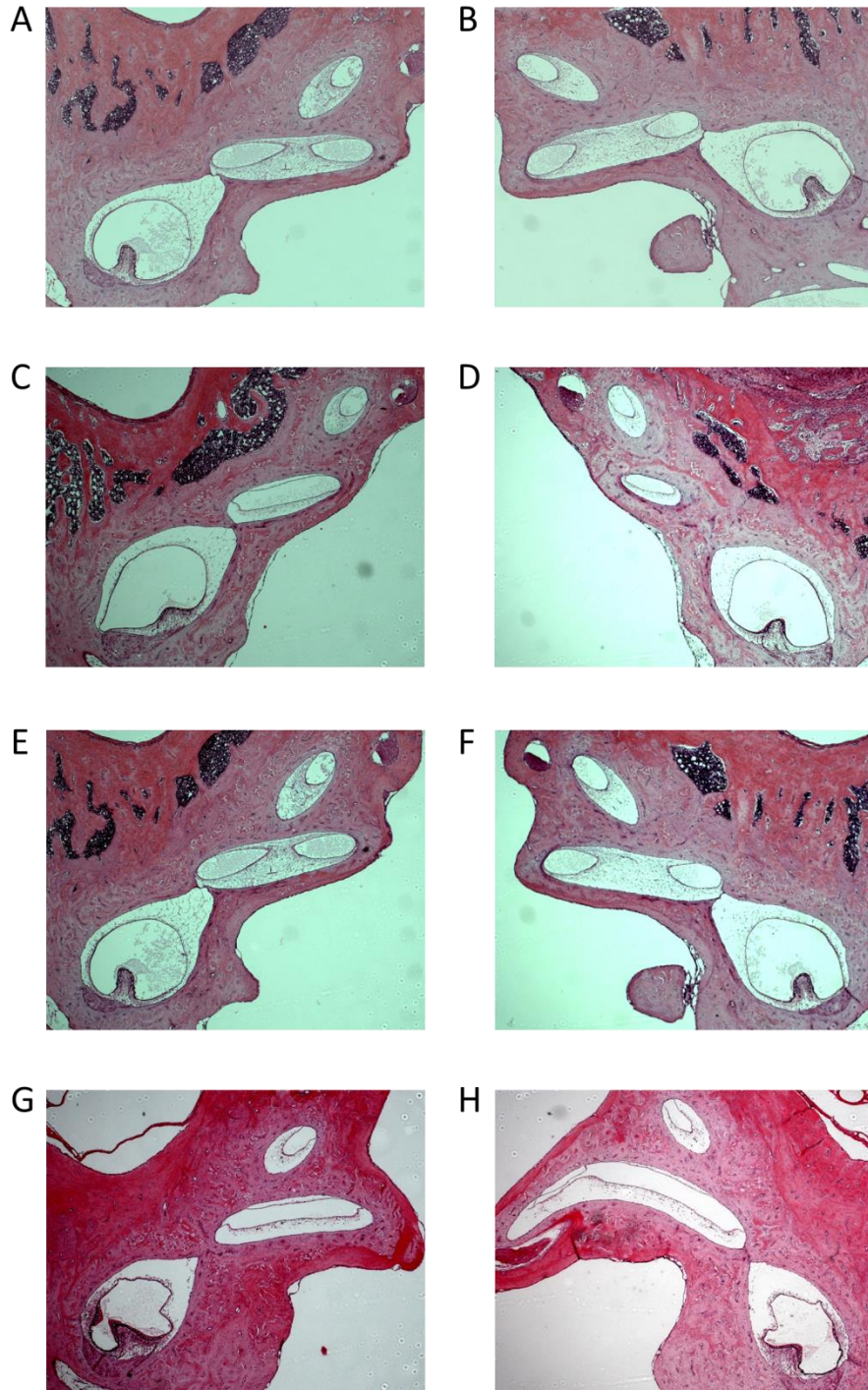


図 16

左内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術施行後、1週飼育後(A-D)、4週飼育後(E-H)の半規管の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水投与非手術耳:A, E、生理食塩水投与手術耳:B, F、デスモプレシン投与非手術耳:C, G、デスモプレシン投与手術耳:D, H)

非手術耳、手術単独耳、手術にデスモプレシン投与を相加した耳ともに内リンパ腔の増大を認めず、内リンパ水腫形成を認めなかった。

3.1.2. 方法① 内リンパ水腫モデル動物の病理組織形態学的検討

2.1.1 で分類した 8 群の病理組織所見について内リンパ腔の面積を計測し、形態学的統計解析を行った結果を図 17-A-E に示す。

蝸牛では手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率は 1 週飼育、4 週飼育ともにデスマプレシン投与単独非手術群 (*Desmopressin group*) と比較して有意に大きく、有意な内リンパ水腫形成を認められた (*paired t-test*, 1 週飼育 : $P < 0.05$, 4 週飼育 : $P < 0.01$)。手術の有無 (*Surgery group* と *Control group*) による各回転の中央階内リンパ腔の総増加率は 4 週飼育群では有意な差を認めたが (*paired t-test*, $P < 0.05$)、1 週飼育群では有意な差は認めなかった。デスマプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) による各回転の中央階内リンパ腔の総増加率は 1 週飼育群、4 週飼育群ともに有意な差を認めた (*t-test*, $P < 0.05$)。手術を施行した 4 群の中でデスマプレシン投与を相加した 4 週飼育群 (*4W Combined group*) は他の 3 群 (*1W Surgery group*, *1W Combined group* と *4W Surgery group*) と比較して有意に内リンパ腔の増加率が大きく (*Tukey's multiple comparison test*, $P < 0.001$)、高度の内リンパ水腫形成を示していた。一方、手術を施行していない 4 群の中ではデスマプレシン投与の有無 (*Control group* と *Desmopressin group*) 及び飼育期間 (1 週と 4 週) ともに内リンパ腔の増加率に有意な差は認めなかった (図 17-A)。

球形嚢でも蝸牛と同様、手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) の前庭に占める球形嚢内リンパ腔の面積率は 1 週飼育、4 週飼育ともにデスマプレシ

ン投与単独非手術群 (*Desmopressin group*) と比較して有意に高く、有意な内リンパ水腫形成を認めた (*paired t-test*, 1 週飼育 : $P < 0.05$, 4 週飼育 : $P < 0.001$)。手術の有無 (*Surgery group* と *Control group*) による前庭に占める球形囊の面積率は 1 週飼育群、4 週飼育群ともに有意な差を認めた (*paired t-test*, $P < 0.05$)。デスモプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) による前庭に占める球形囊の面積率は 1 週飼育群、4 週飼育群ともに有意な差を認めた (*t-test*, 1 週飼育 : $P < 0.05$, 4 週飼育 : $P < 0.001$)。手術を施行した 4 群の中でデスモプレシン投与を相加した 4 週飼育群 (*4W Combined group*) は他の 3 群 (*1W Surgery group*, *1W Combined group* と *4W Surgery group*) と比較して有意に前庭に占める球形囊の面積率が大きく (*Tukey's multiple comparison test*, $P < 0.001$)、蝸牛と同様、球形囊においても高度の内リンパ水腫形成を認めた。一方、手術を施行していない 4 群の中ではデスモプレシン投与の有無 (*Control group* と *Desmopressin group*) 及び飼育期間 (1 週と 4 週) とともに前庭に占める球形囊の面積率に有意な差は認めなかった (図 17-B)。一方、卵形囊及び半規管では骨迷路に占める卵形囊の内リンパ腔及び半規管膨大部と脚部の内リンパ腔の面積率は 1 週飼育群、4 週飼育群いずれも手術の有無 (*Surgery group* と *Control group*) 及びデスモプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) に関わらず各群間に有意な差はなく、卵形囊と半規管における内リンパ水腫形成は認めなかった (図 17-C-E)。

A

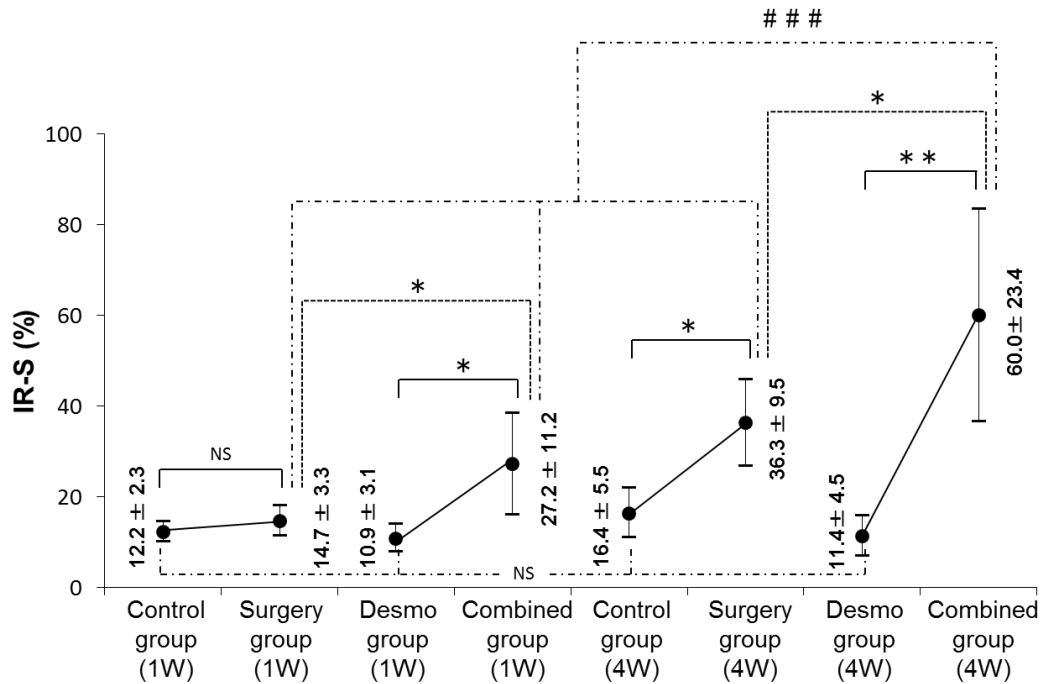


図 17

内リンパ腔面積計測による形態学的統計解析(A: 蝸牛)

手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) は1週、4週飼育ともにデスマプレシン投与単独非手術群 (*Desmopressin group*) と比較して有意な内リンパ水腫形成を認めた (paired *t*-test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。デスマプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) による中央階内リンパ腔の増加率は1週、4週飼育ともに有意な差を認めた (*t*-test, * $P < 0.05$)。手術を施行した4群の中でデスマプレシン投与を相加した4週飼育群 (4W *Combined group*) は他の3群 (1W *Surgery group*、1W *Combined group* と 4W *Surgery group*) と比較して有意に高度な内リンパ水腫形成を示していた (Tukey's multiple comparison test, ### $P < 0.001$)。手術を施行していない4群の中ではデスマプレシン投与の有無 (*Control group* と *Desmopressin group*) 及び飼育期間(1週と4週)ともに中央階内リンパ腔の増加率に有意差はなかった(各群 $n=6$)。

B

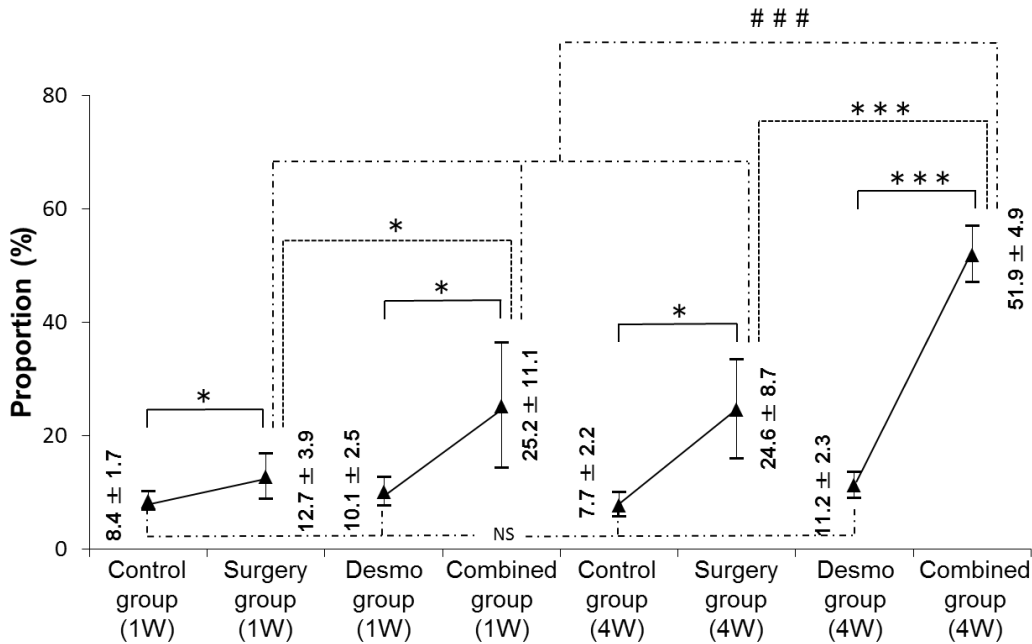


図 17

内リンパ腔面積計測による形態学的統計解析(B:球形嚢)

手術にデスモプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) は1週、4週飼育ともにデスモプレシン投与単独非手術群 (*Desmopressin group*) と比較して有意な内リンパ水腫形成を認めた (paired *t*-test, **P*<0.05,****P*<0.001)。デスモプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) による前庭に占める球形嚢の面積率は1週、4週飼育ともに有意な差を認めた (*t*-test, **P*<0.05,****P*<0.001)。手術を施行した4群の中でデスモプレシン投与を相加した4週飼育群 (4W *Combined group*) は他の3群 (1W *Surgery group*, 1W *Combined group* と 4W *Surgery group*) と比較して有意に高度な内リンパ水腫形成を示していた (Tukey's multiple comparison test, ###*P*<0.001)。手術を施行していない4群の中ではデスモプレシン投与の有無 (*Control group* と *Desmopressin group*) 及び飼育期間 (1週と4週) とともに前庭に占める球形嚢の面積率に有意な差は認めなかった (各群 n=6)。

C

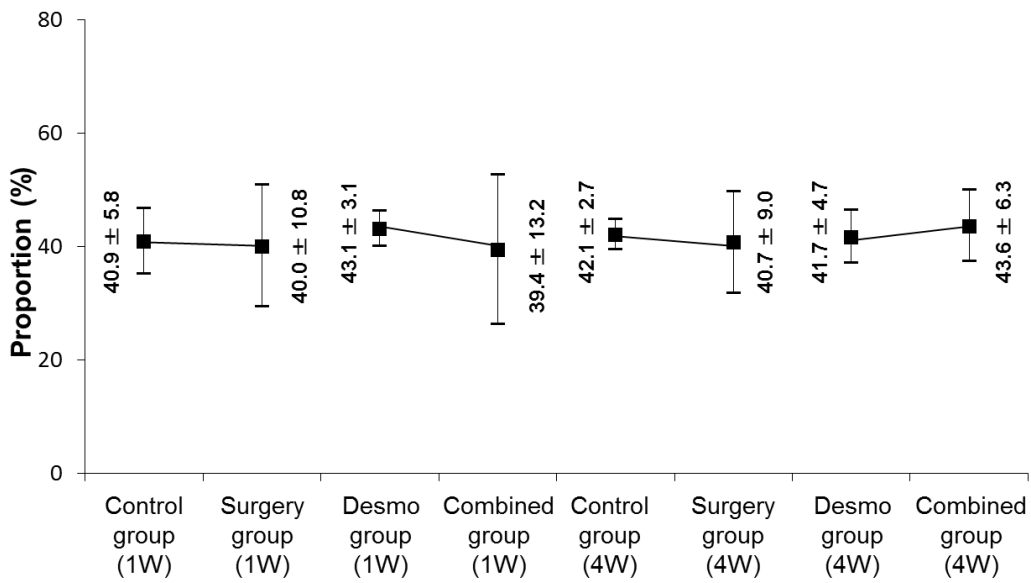
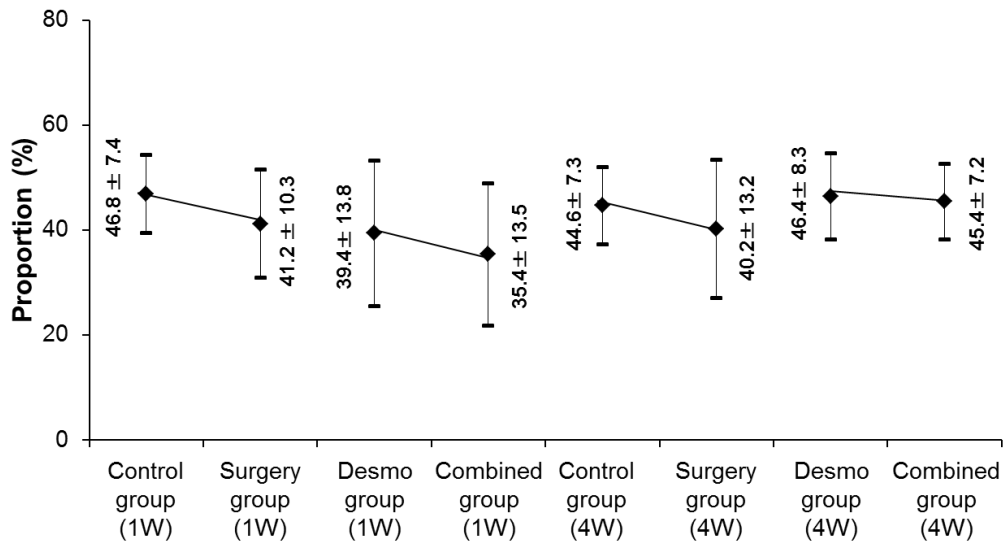


図 17

内リンパ腔面積計測による形態学的統計解析 (C: 卵形囊)

骨迷路に占める卵形囊の内リンパ腔の面積率は 1 週飼育群、4 週飼育群いずれも手術の有無 (*Surgery group* と *Control group*) 及びデスモプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) に関わらず各群間に有意な差はなく、卵形囊における内リンパ水腫形成は認めなかった (各群 n=6)。

D



E

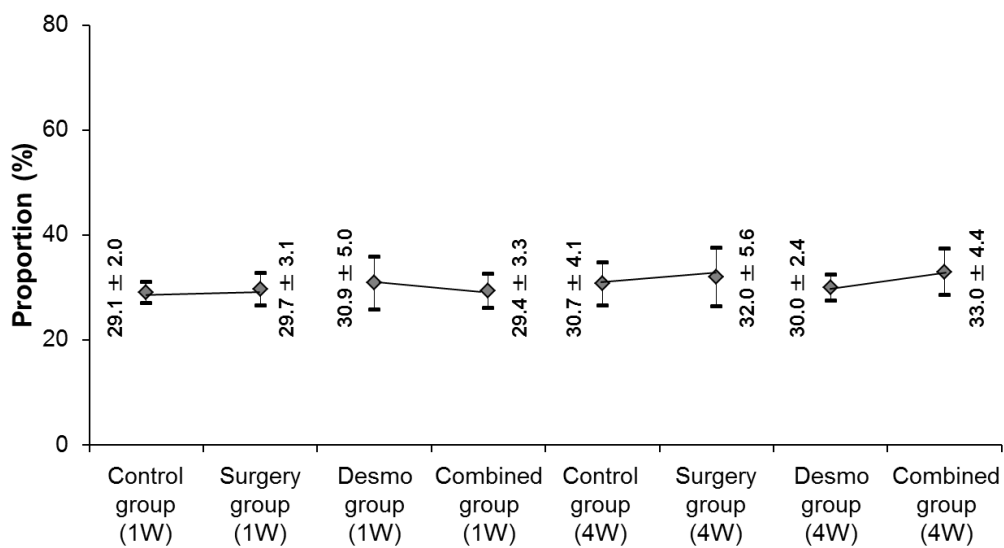


図 17

内リンパ腔面積計測による形態学的統計解析 (D: 半規管膨大部, E: 半規管脚部)

骨迷路に占める半規管膨大部と脚部の内リンパ腔の面積率は 1 週飼育群、4 週飼育群いずれも手術の有無 (*Surgery group* と *Control group*) 及びデスモプレシン投与の有無 (*Combined group* と *Surgery group*) に関わらず各群間に有意な差はなく、半規管における内リンパ水腫形成は認めなかった (各群 n=6)。

3.1.3. 方法① 内リンパ水腫増加率の検討

3.1.2 で有意な内リンパ水腫形成を認めた蝸牛及び球形囊における手術単独群 (*Surgery group*) と手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) の内リンパ水腫の1時間あたりの増加率を計算した (表3)。

蝸牛では手術単独群 (*Surgery group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率の平均値は1週飼育、4週飼育それぞれ14.7%と36.3%であった。一方、非手術群 (*Control group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率の平均値は1週飼育、4週飼育それぞれ12.2%と16.4%であった。したがって1週 (168時間) もしくは4週 (672時間) で2.5%あるいは19.9%増加し、1時間あたりの増加率は1週飼育、4週飼育それぞれ0.008%あるいは0.025%であった。手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率の平均値は1週飼育、4週飼育それぞれ27.2%と60.0%であった。一方、手術単独群 (*Surgery group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率の平均値は前述の通り、1週飼育、4週飼育それぞれ14.7%と36.3%であり、手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) ではデスマプレシン投与後の1時間で各回転の中央階内リンパ腔が1週飼育、4週飼育それぞれ12.5%あるいは23.7%増加していた。球形囊では手術単独群 (*Surgery group*) の前庭に占める球形囊の面積率の平均値は1週飼育、4週飼育それぞれ12.7%と24.6%であった。一方、非手術群 (*Control group*) の前庭に占める球形囊の面積率の平均値は1週飼育、4週飼育それぞれ8.4%と7.7%であった。したがって1週 (168時間) もしくは4週 (672

時間) で 4.3%あるいは 16.9%増加し、1 時間あたりの増加率は 1 週飼育、4 週飼育それぞれ 0.03%あるいは 0.05%であった。手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) の前庭に占める球形嚢の面積率の平均値は 1 週飼育、4 週飼育それぞれ 25.2%と 51.9%であった。一方、手術単独群 (*Surgery group*) 前庭に占める球形嚢の面積率の平均値は前述の通り、1 週飼育、4 週飼育それぞれ 12.7%と 24.6%であり、手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) ではデスマプレシン投与後の 1 時間で前庭に占める球形嚢の面積率が 1 週飼育、4 週飼育それぞれ 12.5%あるいは 27.3%増加していた。

	蝸牛	球形嚢	計算式
1W Surgery	0.008%/h	0.03%/h	(1W Surgery-1W Control) / 168h (1 week)
4W Surgery	0.025%/h	0.05%/h	(4W Surgery-4W Control) / 672h (4 week)
1W Combined	12.5%/h	12.5%/h	(1W Combined-1W Surgery) / 1 hour
4W Combined	23.7%/h	27.3%/h	(4W Combined-4W Surgery) / 1 hour

表 3

蝸牛及び球形嚢における手術単独群と手術にデスマプレシン投与を相加した群の内リンパ水腫の 1 時間あたりの増加率

手術単独群 (*Surgery group*) と非手術群 (*Control group*) の内リンパ腔の面積増加率より 1 週 (168 時間) もしくは 4 週 (672 時間) での面積増加率を計算した。また手術にデスマプレシン投与を相加した群 (*Combined group*) と手術単独群 (*Surgery group*) の内リンパ腔の面積増加率よりデスマプレシン投与 1 時間後の内リンパ水腫の増加率を計算した (各群 n=6)。

3.2.1. 方法② 内リンパ水腫モデル動物の機能評価

2.2.1 で分類した 6 群の自発眼振出現の有無について表 4 に示す。手術後 1 週あるいは 4 週飼育した後、デスマプレシンを投与した群 (V-1W Combined group と V-4W Combined group) ではすべての動物に自発眼振の出現を認めた。生理食塩水を投与した群では手術の有無、飼育期間に関わらず (V-Control group、V-1W Surgery group と V-4W Surgery group) 自発眼振は出現しなかった。手術を施行していないデスマプレシンを投与した群 (V-Desmopressin group) 4 匹中、1 匹に自発眼振が見られた。手術後 1 週あるいは 4 週飼育した後、デスマプレシンを投与した群 (V-1W Combined group と V-4W Combined group) に見られた自発眼振の最大緩徐相速度を表 5 に示す。動物 2 (V-1W Combined group)、6 と 7 (V-4W Combined group) では観察中、自発眼振の出現から約 10 分経過後に自発眼振の急速相の向きが手術側 (左方向) から非手術側 (右方向) に変化し、刺激性から麻痺性眼振に変化した。動物 1 (V-1W Combined group)、5 と 8 (V-4W Combined group) では自発眼振の急速相が非手術側 (右方向) 向きの麻痺性眼振のみを、動物 3 と 4 (V-1W Combined group) では自発眼振の急速相が手術側 (左方向) 向きの刺激性眼振のみを認めた。手術後 4 週飼育した後、デスマプレシンを投与した群 (V-4W Combined group) の体平衡の観察を記録した動画の一部を図 18 に示す。手術後 1 週あるいは 4 週飼育した後、デスマプレシンを投与した群 (V-1W Combined group と V-4W Combined group) は全ての動物が、デスマプレシン投与 10 分後ぐらいから転倒傾向を示すようになり、投与 20 分後をピークに投与 1 時間後に

は転倒傾向を示さなくなった。動物によっては、最初は非手術側である右側に転倒傾向を示す刺激性体平衡障害を認め、観察中に手術側である左側に転倒傾向を示す麻痺性体平衡障害を認めるように変化した。

	自発眼振	
	あり	なし
<i>V-Control group</i>	0%	100%
<i>V-Desmopressin group</i>	25%	75%
<i>V-1W Surgery group</i>	0%	100%
<i>V-4W Surgery group</i>	0%	100%
<i>V-1W Combined group</i>	100%	0%
<i>V-4W Combined group</i>	100%	0%

表4 自発眼振の有無

内リンパ嚢（管）電気焼灼閉塞術後、1週あるいは4週飼育した後、デスモプレシンを投与した群ではすべての動物に自発眼振の出現を認めた。一方、内リンパ嚢（管）電気焼灼閉塞術単独のみの動物では自発眼振は出現しなかった（各群 n=4）

V-1W Combined group	最大緩徐相速度 (° /sec)
動物 1	-3.71
動物 2	3.99 → -1.09
動物 3	14.7
動物 4	2.41
V-4W Combined group	最大緩徐相速度 (° /sec)
動物 5	-5.08
動物 6	6.51 → -6.8
動物 7	5.59 → -2.47
動物 8	-3.66

表5 各動物の自発眼振（最大緩徐相速度）

刺激性眼振：自発眼振の急速相の向きが手術側(左方向) +
 麻痺性眼振：自発眼振の急速相の向きが手非術側(右方向) -

動物 2、6、7 では自発眼振の急速相の向きが手術側 (左方向) から非手術側 (右方向) に変化し、刺激性眼振から麻痺性眼振に変化した。



図 18 体平衡障害の観察

左内リンパ嚢（管）閉塞術後 4 週飼育した後、デスモプレシンを投与した群（V-4W Combined group）の体平衡を観察した動画の静止画を示す。手術側である左側に転倒傾向を示す麻痺性体平衡障害を認めた。

4. 考 察

本研究ではメニエール病における内リンパ水腫形成及びめまい発作発症は内リンパ嚢の機能障害とストレスによる内耳水代謝恒常性機構が破綻した結果であるとする仮説のもと、内リンパ嚢(管)閉塞術による古典的な内リンパ水腫モデル動物に抗利尿ホルモンであるVPのV2作動薬であるデスモプレシンによるV2効果を急性に相加させることでめまい発作をきたす新しい内リンパ水腫モデル動物を作成した。内リンパ水腫形成に関する病理組織学的な評価を形態学的に、めまい発症に関する評価を自発眼振及び体平衡障害出現の有無から機能的に検証した。

病理組織形態学的な観点ではメニエール病のヒト側頭骨病理では蝸牛（100%）、球形嚢（86%）、卵形嚢（50%）、後半規管（36%）、前半規管（27%）、外側半規管（23%）の順に内リンパ水腫を認め、膜迷路の正常と想定される位置からの変位度で内リンパ水腫の程度をみると、球形嚢（52%）、蝸牛（44%）、卵形嚢（21%）、後半規管（13%）、前半規管（8%）、外側半規管（2%）であったと報告されている[44]。この報告からメニエール病では特に蝸牛及び球形嚢において高率に内リンパ水腫が形成され、内リンパ水腫の発生率及び程度に解剖学的差違があることが推察される。本研究でも蝸牛及び球形嚢において高度の水腫形成を認めた一方、卵形嚢や半規管では内リンパ水腫の形成が見られなかったことより、病理組織形態学的にはメニエール病のヒト側頭骨病理所見と同様の結果であったと言える。内耳は発生学的に蝸牛と球形嚢が属する *pars inferior* と卵形嚢と半規管が属する *pars superior* に分類される。内リンパ水腫の発生率

及び程度に解剖学的差違がみられた要因としては発生学的な相違による内リンパ産生能の相違や膜迷路伸展性の相違が挙げられ、特に外側半規管は厚い膜迷路からなっており[60]、形態学的に内リンパ水腫を形成しにくい要因となっていると思われる。

また内リンパの流れを考慮すると、内リンパの主な産生部位である蝸牛血管条と球形嚢は結合間で球形嚢と内リンパ管は球形嚢管でそれぞれ直結しているが、内リンパ吸収部位である内リンパ嚢との解剖学的な位置関係により、蝸牛と球形嚢では内リンパ水腫が形成されやすく、卵形嚢と半規管では内リンパ水腫形成に至りにくいと考えられる。蝸牛では手術の有無による内リンパ腔の増加率は4週飼育群では有意な差を認めたが、1週飼育群では有意な差を認めなかったことより、内リンパ嚢(管)閉塞後、長期間経過することで内リンパ嚢の線維化が緩徐に形成され、慢性的な内リンパ嚢機能不全が進行し、内リンパ水腫形成に至るものと考えられることができる。メニエール病患者の側頭骨病理でも内リンパ嚢の線維化について報告されており[45]、longitudinal flow theory による内リンパ嚢における内リンパの吸収障害は内リンパ水腫形成の一因であると考えられる。

一方、機能的な観点では、内耳性めまいは前庭刺激に基づく前庭動眼反射による自発眼振の出現と前庭脊髄反射による体平衡障害の出現を特徴とする。前庭機能検査としては温度刺激検査が半規管機能を評価する手法として臨床では古くから広く行われているが、前庭機能検査の異常はかならずしもめまい発作出現時の機能を反映するものではないため、本研究ではメニエール病めまい発作の特徴である、一過性発作を

示す現象として自発眼振及び体平衡体平衡障害を機能評価の対象とした。眼振は半規管膨大部刺激による前庭刺激に基づく緩徐な偏位運動（緩徐相）と脳幹網様体等の中枢性要因による急速な復元運動（急速相）により構成される。したがって前庭刺激の指標として本研究では自発眼振出現の有無の評価に加え、眼振出現時の最大反応の定量評価の対象となる最大緩徐相速度を計測した。内リンパ嚢（管）閉塞術単独では飼育期間に関わらず、自発眼振、体平衡障害ともに出現しなかった。この結果より内リンパ水腫形成単独ではメニエール病に特徴的なめまい発症に至るには不十分であることが証明された。メニエール病の臨床像が急性のめまい・難聴発作を反復しながら、可逆的・進行性に増悪していくことを考慮すると内リンパ水腫形成には内リンパ嚢における内リンパの吸収障害の他に内リンパ産生亢進をきたす二相性の作用が病態として関与していると考えられる。内リンパ水腫モデル動物は基礎研究において内リンパ水腫とメニエール病の病態について理解するために重要であるが、内リンパ水腫による機能的な結果は水腫形成の時間経過に左右されるため急性及び慢性水腫モデルは別に考える必要がある [46]。これまでも内リンパ嚢の部分的な閉塞やリポポリサッカライド (LPS) 投与による免疫反応により迷路炎をきたした動物にアルドステロンを全身投与する内リンパ水腫モデル動物が報告されている [47], [48]。アルドステロンを投与することで血管条における Na/K ATPase レベルが亢進し、内リンパへの K⁺分泌亢進による内リンパ産生亢進をきたすものと考えられる。本研究でもメニエール病患者の発症に慢性的なストレス要因が関与していること、慢性ストレスにより VP

分泌が亢進すること、VP は内耳水代謝恒常性維持に関与していると考えられること、以上の臨床的、基礎的背景より VP に着眼するに至り、上述の通り、緩徐に進行する水腫の増大が形態生理学的な変化をもたらす慢性水腫モデルに、急激な内リンパ容積の変化を相加する急性水腫モデルを考案した。手術を施行していない群の中ではデスマプレシン投与の有無及び飼育期間（1 週と 4 週）に関わらず、内リンパ腔の増加率に有意な差を認めなかった。また機能的にもデスマプレシン投与単独非手術群で自発眼振を認めたのは 1 例のみであり、デスマプレシン急性投与単独のみでは内リンパ水腫形成及びめまい発作発症には至りにくいことがわかった。過去の報告でも VP 慢性投与によって形成される内リンパ水腫は比較的軽度であり[38]、メニエール病のヒト側頭骨病理で見られるような高度水腫は形成されていない。一方、蝸牛、球形嚢ともに手術にデスマプレシン投与を相加した群と手術単独群とを比較すると 1 週飼育、4 週飼育ともに手術にデスマプレシン投与を相加した群では有意に内リンパ水腫が増大していた。内リンパ嚢（管）閉塞による内リンパ嚢機能不全にデスマプレシン投与を相加することで形態学的にはさらなる内リンパ水腫形成に働いたと考えることができる。さらに内リンパ嚢（管）閉塞術にデスマプレシン投与を相加した群では全例に自発眼振及び体平衡障害を認めたことから、機能的にもメニエール病めまい急性期の臨床像にあった発症モデルとして妥当であることが検証された。そこでデスマプレシンを急性投与することで V2 効果による内耳水代謝が亢進し、急激な内リンパ容積の変化が相加されるのかという点について検討した。実際、手術単独群と手術にデス

モプレシン投与を相加した群の蝸牛及び球形囊における内リンパ水腫の1時間あたりの内リンパ水腫の増加率を計算すると手術単独群では内リンパ囊（管）閉塞術後、1週もしくは4週かけて緩徐に増加しており、1時間あたりの増加率は軽微であり、機能的にも手術単独群では自発眼振も体平衡障害も認められなかった。一方、手術にデスマプレシン投与を相加した群ではデスマプレシン投与1時間後に急激な内リンパ水腫の増加を認め、機能的にも全ての動物に自発眼振と体平衡障害を認めた。VPの急性投与によりラットの血管条において細胞内浮腫を電顕レベルで認めたとする形態変化についての報告がある[39]。この報告ではVP投与20分後に最も高度の細胞内浮腫を認めたとしているが、本研究における体平衡障害の観察でも内リンパ囊（管）閉塞術にデスマプレシン投与を相加した動物ではデスマプレシン投与10分後ぐらいから転倒傾向を示すようになり、投与20分後をピークに投与1時間後には転倒傾向を示さなくなっている。この結果からめまい発作発症にはデスマプレシンによる急性反応が深く関与しており、急激な内リンパ容積の変化を伴う内耳水代謝異常に起因する前庭刺激による一過性のめまい発作を誘発するに至ったと考えることができ、メニエール病発症の病態には内リンパ水腫形成における時間経過が機能的な結果の差違に影響を与えるものと考えられた。以上より、内リンパ吸収部位である内リンパ囊閉塞による不可逆的な機能不全を背景に、VPの急性V2効果による内リンパ産生亢進による内耳水代謝異常による急性前庭刺激による一過性の自発眼振と体平衡障害を発現したと推察された。

第4章 <研究②>

内リンパ水腫形成に関わる内耳における

AQP と V2R に関する免疫組織学的研究

1. 緒言

細胞膜を形成する脂質二重層で構成されている生体膜を水が通過するための透過機構である水チャネルは、赤血球の膜蛋白の構造解析によって水の透過性を持つ小孔を形成することが Peter Agre により発見され、アクアポリン (AQP) と命名された[49]。

哺乳類には現在までに AQP0~12 までの 13 種類が確認されている。最初に発見された AQP1 は赤血球のみならず、腎臓の尿濃縮や、毛細血管、肺などでの水輸送に関与していることが明らかにされている。続いて発見された AQP2 は腎臓の集合管に存在し、尿濃縮に決定的な役割を果たしており、多飲多尿をきたす腎性尿崩症はこの遺伝子変異が原因であることが明らかになっている。水移動の直接の駆動力は浸透圧勾配であるが、水移動の増減は AQP の発現量に依存すると考えられ、AQP2 の発現は VP によって制御されている。VP の受容体には2つのサブタイプがあり、1型は血管収縮に作用し、2型受容体 (V2R) は腎臓尿細管に分布し、水代謝に関与している。腎集合管における VP-AQP2 システムの作動様式はこれまでも広く検討されている。

AQP2 は腎臓集合管において主細胞の細胞内小胞にあり、VP の刺激により V2R を介して細胞膜上に移行し、管腔側からの水の再吸収に重要な働きをしているとされてお

り、細胞内に入った水は基底側壁部膜 AQP3 及び AQP4 の作用で血管側へ移送される。また V2R 阻害薬や VP-AQP2 システムの阻害剤であるリチウムは腎集合管の水の透過性を抑制すると報告されている[50]-[53]。内耳は第 2 章 1.2. で述べたように特殊なイオン組成を持つ内・外リンパからなる液体で主に構成されており、内耳における正常な機能を維持するためには内耳液性成分の恒常性維持が必要不可欠である。内耳の水チャンネルの発現とその局在についても分子生物学的、免疫組織学的に解明が進んでいる。RT-PCR による検討では AQP1 から AQP9 の mRNA が蝸牛、前庭、内リンパ囊のすべて或いはいずれかに発現することが諸家により報告されている[54]-[57]。このように内耳においても水代謝が VP-AQP2 システムによって制御されている可能性が示唆され、メニエール病では VP-AQP2 システムの異常により内耳液恒常性維持機構が破綻した結果、内リンパ水腫を形成、発症に至ると仮説を立てることができる。VP が内リンパ水腫形成に関与するのであれば、V2R が内耳に局在し、VP が V2R に結合後、誘導される AQP2 も内耳に局在しているはずである。研究②では内耳における水チャンネル及び VP-AQP2 システムの関与を確認するために、免疫組織学的手法にて AQP 及び V2R の内耳における局在を検討する。

2. 方法

2.1. 実験動物

生後 1 ヶ月の雌 SD ラット（埼玉実験動物供給所）を使用した。全ての動物は温度

管理環境、12 時間毎明暗サイクル環境下のコンベンショナル飼育施設において不断給餌、自由飲水の状態で飼育した。

2.2. 固定、組織標本の作製

全ての動物をケタミン 50 mg/kg 及びキシラジン 5 mg/kg 腹腔内注射による深麻酔下に開胸の後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を左心室経由灌流後、10%中性緩衝ホルマリン (武藤化学) により左心室経由灌流固定した。断頭後、下顎及び頭皮を除去し、両側側頭骨を摘出後、4°Cにて同ホルマリン液にて 48 時間、浸積固定した。陽性コントロールとして腹壁を切開し、腎臓を摘出した。その後、側頭骨を室温にて 10% エチレンジアミン四酢酸 (EDTA; pH 7.0) にて 2 週間、脱灰した。脱灰終了後、側頭骨及び腎臓組織を洗浄し、4°Cにて 10%及び 20%ショ糖 (和光純薬工業) 添加 PBS にてそれぞれ一晩ずつ洗浄した。凍結組織切片作製用包埋剤 (ティシュー・テック®O.C.T. コンパウンド、サクラファインテックジャパン) に包埋、液体窒素に浸して、急速に凍結させた。凍結切片作製機 (ティシュー・テック クライオ 3、サクラファインテックジャパン) を用いて側頭骨は厚さ 6µm で腎臓は 10µm で凍結切片を薄切し、シランコーティングスライドガラス (松浪硝子工業) にマウントし、切片を室温で乾燥させ、免疫染色用の切片とした。

2.3. 免疫組織化学

蝸牛血管条及び前庭における AQP1~12 及び VP2 型受容体 (V2R) の発現を検討するために免疫組織化学による染色を行った。一次抗体として、ウサギ抗 AQP1 抗体 (AB2219, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP2 抗体 (AB3274, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP3 抗体 (178613, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP4 抗体 (AB3594, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP5 抗体 (AB3069, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP6 抗体 (AB9024, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP7 抗体 (AB3075, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP8 抗体 (AB3077, Merck Millipore, Germany; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP9 抗体 (AQP91-A, Alpha Diagnostic International, USA; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP10 抗体 (AQP10-1001AP, FabGennix International, USA; 1:100 倍希釈) ウサギ抗 AQP11 抗体 (AQP11-1101AP, FabGennix International, USA; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AQP12 抗体 (AQP12-1201AP, FabGennix International, USA; 1:100 倍希釈)、ウサギ抗 AVPR V2 抗体 (ab108145, abcam, United Kingdom; 1:100 倍希釈) を使用した。抗体の非特異反応阻止のために 5%正常ヤギ血清 (和光純薬工業) 含 PBS (pH 7.4) にて室温 1 時間のブロッキング処理をおこなった。その後、上記、一次抗体を 4°C で一晩反応させた。洗浄後、抗ウサギ蛍光二次抗体 (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, USA; 1:200 倍希釈) を室温で 1 時間反応させた。陽性コントロールとして腎臓切片を用いて同様の条件で免疫反応を行い、陰性

コントロールでは一次抗体を省略した。洗浄後、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE ME600D, Nikon) にて観察、撮影した。

3. 結果

3.1. 免疫組織化学

腎臓陽性コントロールでは抗 AQP1 抗体は近位尿細管の内腔に面する頂部に (図 19-A)、抗 AQP2 抗体は集合管主細胞の内腔に面する頂部に (図 19-B)、抗 AQP3 抗体と抗 AQP4 抗体は集合管主細胞の基底側壁部にそれぞれ発現していた (図 19-C, D)。蝸牛血管条は蝸牛外側壁側から基底細胞、中間細胞、辺縁細胞で構成されているが (図 20-A)、抗 AQP1 抗体は蝸牛血管条中間細胞に局在していた (図 20-B)。抗 AQP2 抗体は蝸牛では血管条基底細胞及びらせん靱帯に (図 20-C)、前庭では前庭感覚上皮に (図 20-D) 局在していた。抗 AQP3 抗体は前庭感覚細胞及び支持細胞に局在していた (図 20-E)。抗 AVPR V2 抗体は蝸牛血管条基底細胞に局在していた (図 20-F)。陰性コントロールでは一次抗体で示される免疫反応は見られなかった。抗 AQP4~12 抗体は今回の検討では蝸牛血管条及び前庭における有意な免疫反応を認めなかった。

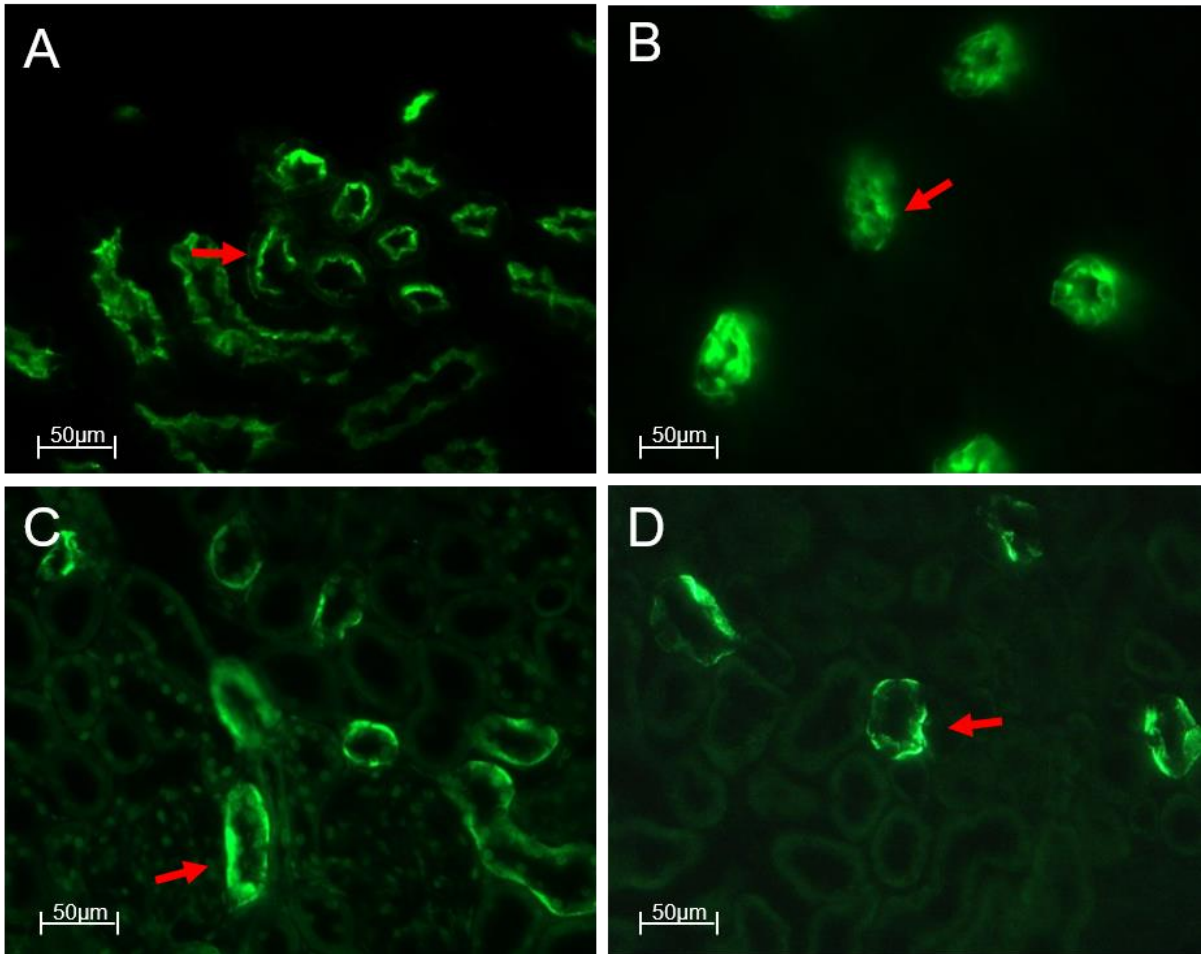


図 19 蛍光免疫染色(腎臓)

抗 AQP1 抗体 (A) は近位尿細管の内腔に面する頂部、抗 AQP2 抗体 (B) は集合管主細胞の内腔に面する頂部、抗 AQP3 抗体 (C) と抗 AQP4 抗体 (D) は集合管主細胞の基底側壁部にそれぞれ発現していた (矢印)。

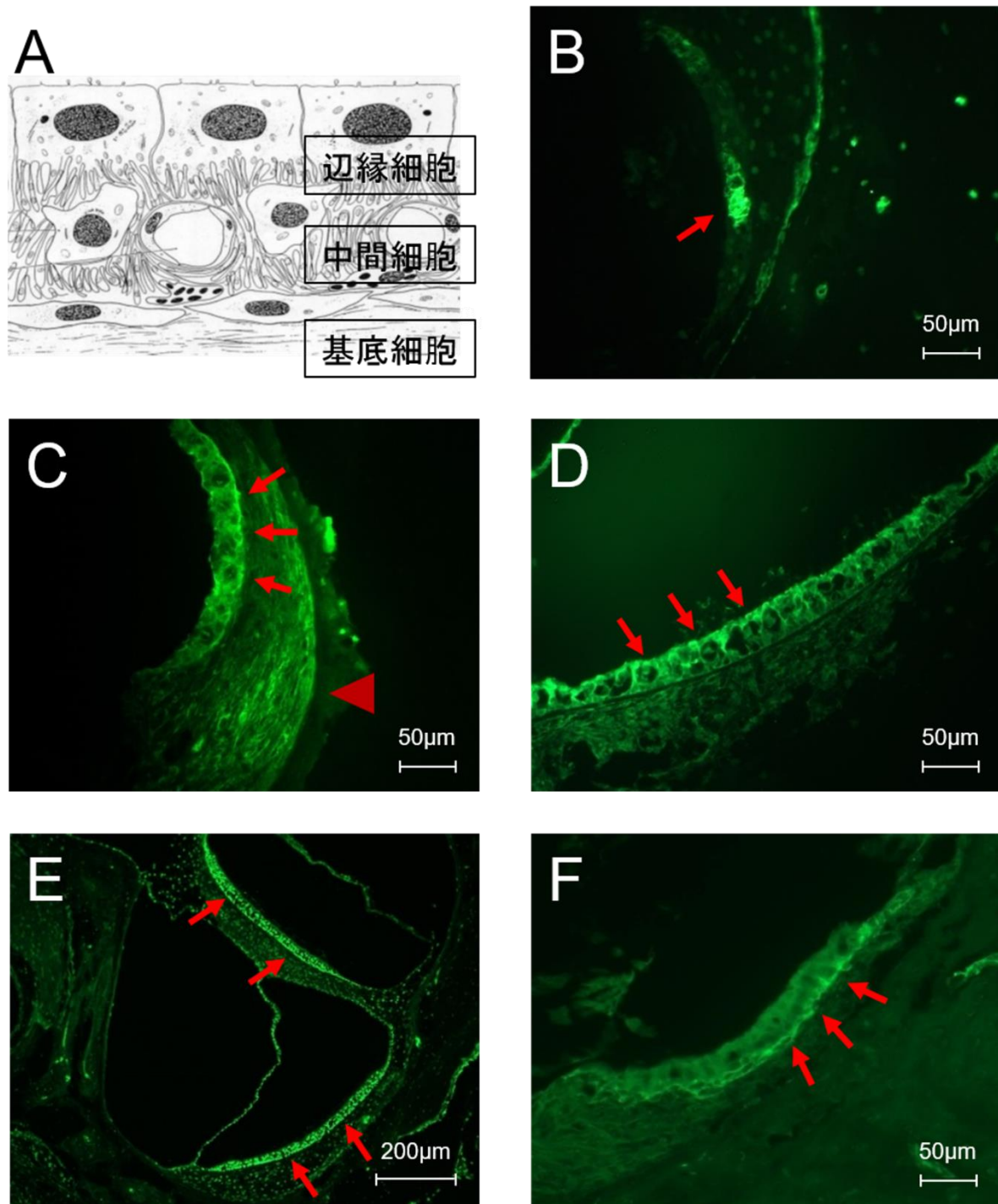


図 20 蛍光免疫染色(蝸牛・前庭)

蝸牛血管条は外リンパ腔に面する外側壁側から基底細胞、中間細胞、辺縁細胞で構成されている (A)。抗 AQP1 抗体は蝸牛血管条中間細胞 (矢印) に局在していた (B)。抗 AQP2 抗体は蝸牛では血管条基底細胞 (矢印) 及びらせん靭帯 (矢頭) に (C)、前庭では感覚上皮に局在していた (D)。抗 AQP3 抗体は前庭感覚細胞及び支持細胞に局在していた (E)。抗 AVPR V2 抗体は蝸牛血管条基底細胞に局在していた (F)。

4. 考 察

研究①で VP が内リンパ水腫形成及びめまい発作発症に関与していることがわかった。研究②では分子生物学的に AQP 及び V2R が内リンパ水腫形成に関与するかについて免疫組織染色にて検証した。腎臓では AQP2 は腎臓集合管において主細胞の細胞内小胞にあり、VP の刺激により V2R を介して細胞膜上に移行し、細胞膜内外の浸透圧差により水が細胞膜を越えて移動する。基底膜には AQP3 と AQP4 が存在しており、管腔側からの水の再吸収に重要な働きをしている[51]-[53]。また V2R の拮抗薬や VP-AQP2 システムの阻害剤であるリチウム（アデニル酸シクラーゼの阻害剤）を投与することにより水の再吸収が抑制されることが報告されており[50]、VP-AQP2 システムが水代謝に強く関与している。ラットやマウスの内耳でも本研究と同様、血管条の基底細胞に AQP2 及び V2R が局在することが免疫組織学的に報告されている[58]-[60]。内リンパは外リンパから供給されると考えられており、血管条は外リンパと内リンパを隔てており、血管条内を水が移動することが予想される。AQP2 は外リンパが存在しているらせん靭帯と接する血管条基底細胞基底膜上に発現しており、浸透圧勾配によりらせん靭帯から血管条基底細胞に水が流入した後、血管条辺縁細胞頂側膜まで水が移動するものと考えられる。また VP 負荷により蝸牛において V2R mRNA の発現を抑制し[61]、逆に AQP2 mRNA の発現を促進すると報告されている[62]。また V2R 拮抗的阻害薬（OPC-31260）[63]やリチウム負荷 [64]は AQP2 mRNA の発現を抑制するとされている。形態学的にも VP の投与は内リンパ水腫を形成し[38], [59],

[65]、VP の急性投与により血管条中間細胞の浮腫や細胞間隙をもたらすことが報告されており、血管条内に水が流入したことが示唆される[39]。以上より内耳においても VP-AQP2 システムが機能しており、VP 投与により VP-AQP2 システムが亢進し、水代謝が促進し、内リンパ水腫形成に関与しているものと考えられる。

第5章 <研究③>

バゾプレシン2型受容体（V2R）拮抗的阻害薬による 内リンパ水腫軽減効果に関する研究

1. 緒言

うっ血性心不全や肝硬変などのように水分が貯留する状態では有効循環血液量が低下し、近位尿細管での水再吸収亢進によって細胞外液量が増加する [66], [67]。細胞外液増加型の低 Na 血症の治療は Na を補うのではなく、水分を減らすことであり、有効な治療法がなかったものの、近年、Vaptan 系の非ペプチド性 VP2 型受容体 (V2R) 拮抗的阻害薬が開発され、臨床応用されるようになった [68], [69]。特に OPC-31061 及び OPC-41061 は本邦で開発された低 Na 血症の治療に有用な経口 V2R 拮抗的阻害薬である [52], [70], [71]。作用機序は腎臓における V2 受容体を阻害することで VP-AQP2 システムの作用を抑制し、AQP2 の down-regulation による水再吸収亢進を正常化させ、水利尿による細胞外への水貯留を改善するものと考えられている [72], [73]。OPC-31260 はラットの腎臓では V2 受容体選択性が V1 受容体の 25 倍と高い選択性があるとされているが、ヒトではその受容体選択性が 10 倍と選択性が低下することが報告されており [74]、臨床応用には至っていない。一方、OPC-41061 (トルバプタン) はヒトではその受容体選択性が 29 倍とされており [71]、トルバプタンはその高い V2 受容体選択性から心不全の治療において重篤な副反応を示すことなく短期間の臨床

所見及び臨床症状を改善したとする大規模な臨床研究の結果を受け[75]、重症心不全の治療で広く使用されるようになってきている。研究①、②より内耳における水貯留である内リンパ水腫は VP による VP-AQP2 システムの亢進が原因となっていることが考えられた。本研究では VP-AQP2 システムの阻害薬であるトルバプタンによる内リンパ水腫動物の内リンパ水腫軽減効果について検討する。

2. 方法

2.1. 方法① 内リンパ水腫軽減効果に関する病理組織学的検討

内耳における VP-AQP2 システムの亢進が内リンパ水腫形成を促進させるという仮説に基づき、内リンパ嚢（管）閉塞術による内リンパ水腫モデル動物に V2R 拮抗的阻害薬を投与し、病理組織学的に内リンパ水腫軽減効果を検討した。

2.1.1. 実験動物

体重 300g 前後のプライエル反射正常のハートレー系白色モルモット雌 20 匹（埼玉実験動物供給所）を使用した。内リンパ水腫の作成は研究① 2.1.2. と同様の手術法にて内リンパ嚢（管）電気焼灼閉塞術を左耳のみ行い、右耳は非手術側とした。全ての動物は手術施行後、麻酔から覚醒していることを確認した後、温度管理環境、12 時間毎明暗サイクル環境下のコンベンショナル飼育施設において不断給餌、自由飲水の状態で飼育した。手術後、4 週飼育した後に生理食塩水を経口投与する群（Cauterized ES

group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与する群 (Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group)、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与する群 (Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与する群 (Cauterized ES tolvaptan (RW) group) の全 4 群 (図 21) に分類した (n=5)。各 4 群とも本章、2.1.2. で後述する投与方法、投与間隔、投与経路にて生理食塩水あるいはトルバプタンを投与した後に研究① 2.1.3. と同様の行程で病理組織標本を作製し、手術の有無 (左耳:手術耳、右耳:非手術耳) によって図 21 のごとく、以下、(1) 手術後、生理食塩水経口投与 (右耳:非手術耳) : Intact ES group (右耳)、(2) 手術後、生理食塩水経口投与 (左耳:手術耳) : Cauterized ES group (左耳)、(3) 手術後、tolvaptan 10 mg/kg 経口投与 (右耳:非手術耳) : Intact ES tolvaptan 10 mg/kg group (右耳)、(4) 手術後、tolvaptan 10 mg/kg 経口投与 (左耳:手術耳) : Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group (左耳)、(5) 手術後、tolvaptan 100 mg/kg 経口投与 (右耳:非手術耳) : Intact ES tolvaptan 100 mg/kg group (右耳)、(6) 手術後、tolvaptan 100 mg/kg 経口投与 (左耳:手術耳) : Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group (左耳)、(7) 手術後、tolvaptan 1 mg/body 経正円窓投与 (右耳:非手術耳) : Intact ES tolvaptan (RW) group (右耳)、(8) 手術後、tolvaptan 1 mg/body 経正円窓投与 (左耳:手術耳) : Cauterized ES tolvaptan (RW) group (左耳) の 8 群 (各 n=5) に分類した。

2.1.2. 薬物投与方法（全身投与及び局所投与方法）

図 21 に本実験のプロトコールを示す。薬物を経口投与する群では栄養カテーテル 5Fr（アトムメディカル）を口腔から胃内に挿入し、午前 6 時に 5 日間連日、生理食塩水あるいはトルバプタン（大塚製薬薬効開拓研究所）を 2 分間で緩徐に経口投与した。トルバプタンは 10 mg/kg もしくは 100 mg/kg の投与量となるように薬剤をヒプロメロース（Sigma-Aldrich, USA）に溶解し、懸濁液を調整した。局所投与する群ではケタミン 35 mg/kg 及びキシラジン 5 mg/kg を左大腿筋肉内注射し、深麻酔後、キシロカイン注射液 1%エピレナミン含有を皮膚切開予定部位に局部麻酔後、耳後切開をおき、手術用顕微鏡（Carl Zeiss, Germany）下に中耳骨胞を開放、正円窓窩にあらかじめ調整しておいたトルバプタン 1 mg と生理食塩水を混じたキサントガム（Sigma-Aldrich, USA）を含んだゼラチンスポンジ（スポンゼル®：アステラス製薬）を留置した。手術操作後、皮膚を縫合、手術施行後、麻酔から覚醒していることを確認した後、同様の環境で 30 時間飼育した。

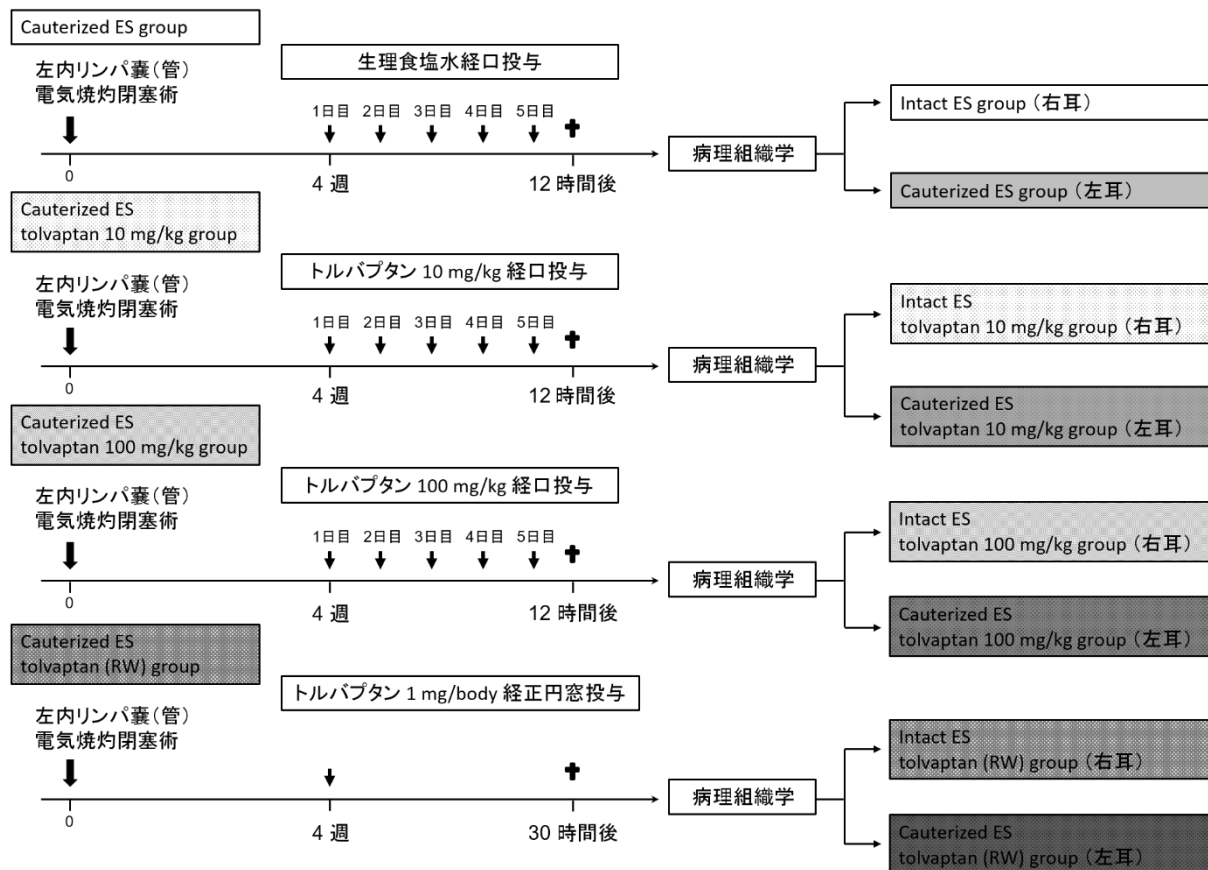


図 21 方法①の実験プロトコール

V2R 拮抗的阻害薬による内リンパ水腫動物の内リンパ水腫軽減効果を検討する実験のプロトコールを示す。左内リンパ囊（管）電気焼灼閉塞術施行後、4 週飼育した後に生理食塩水を経口投与する群(Cauterized ES group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与する群(Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group)、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与する群(Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与する群(Cauterized ES tolvaptan (RW) group) の4 群に分類し(各群 n=5)、病理組織標本を作成した。

2.1.3. 標本作成

2.1.1 の行程後、生理食塩水あるいはトルバプタン 10 mg/kg 及び 100 mg/kg を経口投与する群では最終投与の 12 時間後、トルバプタン 1 mg/body を局所投与する群では前述 2.1.2. の手術の 30 時間後、全ての動物をケタミン 35 mg/kg 及びキシラジン 5 mg/kg 腹腔内注射し、深麻酔下にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を左心室経由灌流後、10%中性緩衝ホルマリン (武藤化学) により左心室経由灌流固定後に断頭した。下顎及び頭皮を外し、両側側頭骨を摘出後、4°Cにて同ホルマリン液にて 1 週間浸漬固定した。室温にて 10%エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて、2 週間脱灰を行い、アルコール系列で脱水した後、パラフィンに包埋してブロックを作成した。研究①の 2.1.3 と同様の行程にて蝸牛軸に平行に 6 µm 厚の側頭骨切片を作成し、キシレンにて脱パラフィン化し、エタノール系列で親水化後にヘマトキシリントエオジンにて染色し、脱水、透徹、封入し、光学顕微鏡 (ECLIPSE ME600D, Nikon) で観察した。

2.1.4. 内リンパ腔面積の計測と統計解析

蝸牛及び球形嚢における内リンパ水腫軽減効果を病理組織形態学的に評価するために研究①の 2.1.4 と同様の行程にて蝸牛及び球形嚢の内リンパ腔面積を計測した。同一個体間の手術耳と非手術耳間の手術による内リンパ腔容積の相違の有意性は paired *t*-test にて、手術耳及び非手術耳における各 group 間の内リンパ腔容積の平均値の比較は Tukey's multiple comparison test にて統計解析ソフト (StatMate IV、アトム

ス) を用いて検定した。計測値は平均±標準偏差 (standard deviation、SD)、有意確率 (*P*) は 0.05 未満を有意とした。

2.2. 方法② 血漿 VP 値及び血漿浸透圧値の測定

VP2 型受容体 (V2R) 拮抗的阻害薬の経口投与及び局所投与による全身的な影響を確認するために血漿 VP 値及び血漿浸透圧値を測定した。

2.2.1. 実験動物

体重 300g 前後のハートレー系白色モルモット雌 20 匹 (埼玉実験動物供給所) を使用した。全ての動物は本章、方法①と同様の飼育環境にて飼育した。生理食塩水を経口投与した群 (control group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 10 mg/kg group)、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 100 mg/kg group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群 (tolvaptan RW group) の全 4 群に分類した (各 n=5)。各 4 群とも本章、2.1.2. と同様の薬剤調整法、投与方法、投与間隔、投与経路にて生理食塩水あるいはトルバプタンを投与した (図 22)。

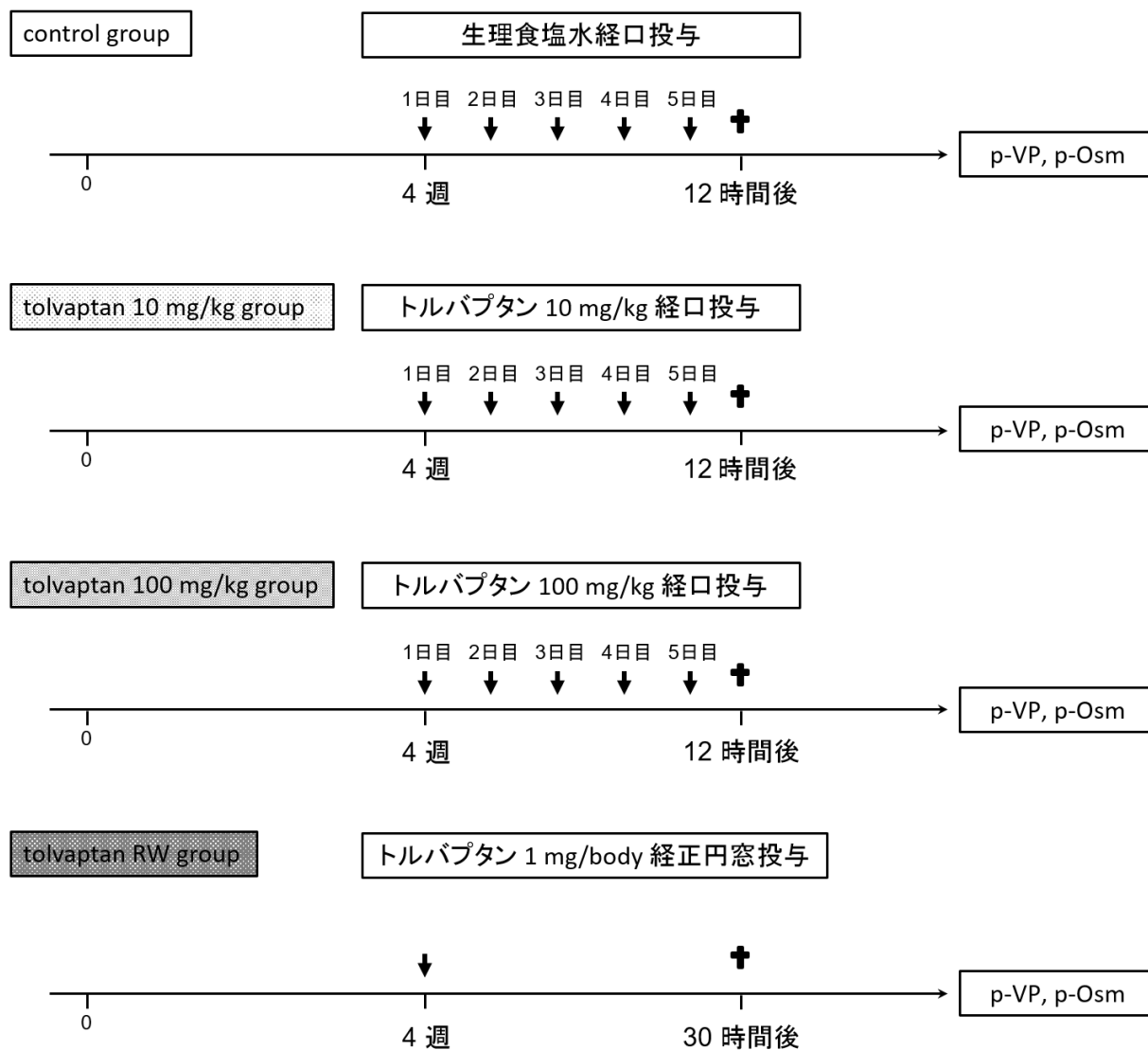


図 22 方法②の実験プロトコール

V2R 拮抗的阻害薬の経口投与及び局所投与による血漿 VP 値及び血漿浸透圧値を測定する実験のプロトコールを示す。生理食塩水を経口投与した群(control group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群(tolvaptan 10 mg/kg group)、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群(tolvaptan 100 mg/kg group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群(tolvaptan RW group)の 4 群に分類し(各群 n=5)、血漿 VP 値及び血漿浸透圧値を測定した。

2.2.2. 血漿 VP 値及び血漿浸透圧値の測定法

全ての動物をケタミン 35 mg/kg 及びキシラジン 5 mg/kg 腹腔内注射による深麻酔下に午前 6 時に断頭し、頸動脈から 10cc 以上、血液を採取した。血漿 VP 測定用の血液は直ちに EDTA 入り試験管に移し、4℃、3000 回転で 10 分間、遠心分離した後に血漿成分のみをエッペンドルフに採取し、-20℃で凍結保存した。残りの血液は採取後、分離材入り試験管に移し、常温で 30 分保存後、常温、3000 回転で 10 分間、遠心分離した後に血漿成分のみをエッペンドルフに採取し、-20℃で凍結保存した。血漿 VP 値はラジオイムノアッセイ法で、血漿浸透圧値は氷点降下法を用いてそれぞれ免疫学的検定法にて計測した (エス アール エル)。

3. 結果

3.1.1. 方法① 蝸牛及び球形嚢の病理組織所見の検討

蝸牛及び球形嚢、それぞれ以下の群の代表的な病理組織標本写真 (生理食塩水経口投与手術耳 : A、生理食塩水経口投与手術耳 : B、トルバプタン 10 mg/kg 経口投与手術耳 : C、トルバプタン 100 mg/kg 経口投与手術耳 : D、トルバプタン 1 mg/body 経口投与手術耳 : E) を図 23 及び図 24 に示す。

蝸牛では生理食塩水を経口投与した動物の非手術耳はライスネル膜の膨隆はなく、ほぼ直線であり、内リンパ水腫形成を認めなかった (図 23-A)。一方、同動物の手術耳ではライスネル膜が前庭階に向け、膨隆し、中等度の内リンパ水腫形成を示してい

た(図 23-B)。トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した動物の手術耳では生理食塩水を経口投与した動物の手術耳と比較してライスネル膜の膨隆が軽減しており、内リンパ水腫軽減効果を認めた(図 23-C, E)。一方、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した動物の手術耳ではライスネル膜が前庭階の上壁骨に接着している回転も見られ、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳と比較して内リンパ水腫の増大を認めた(図 23-D)。

次に球形嚢では生理食塩水を経口投与した動物の非手術耳は球形嚢の内腔に変化は認めず、蝸牛と同様、内リンパ水腫形成を認めなかった(図 24-A)。一方、同動物の手術耳では球形嚢内腔は拡張し、球形嚢膜がアブミ骨底板に一部接着しており、中等度～高度の内リンパ水腫形成を認めた(図 24-B)。トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した動物の手術耳では生理食塩水を経口投与した動物の手術耳と比較して球形嚢内腔は縮小しており、内リンパ水腫軽減効果を認めた(図 24-C, E)。一方、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した動物の手術耳では球形嚢膜がアブミ骨底板に広く接着し、生理食塩水やトルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳と比較して内リンパ水腫の増大を認めた(図 24-D)。

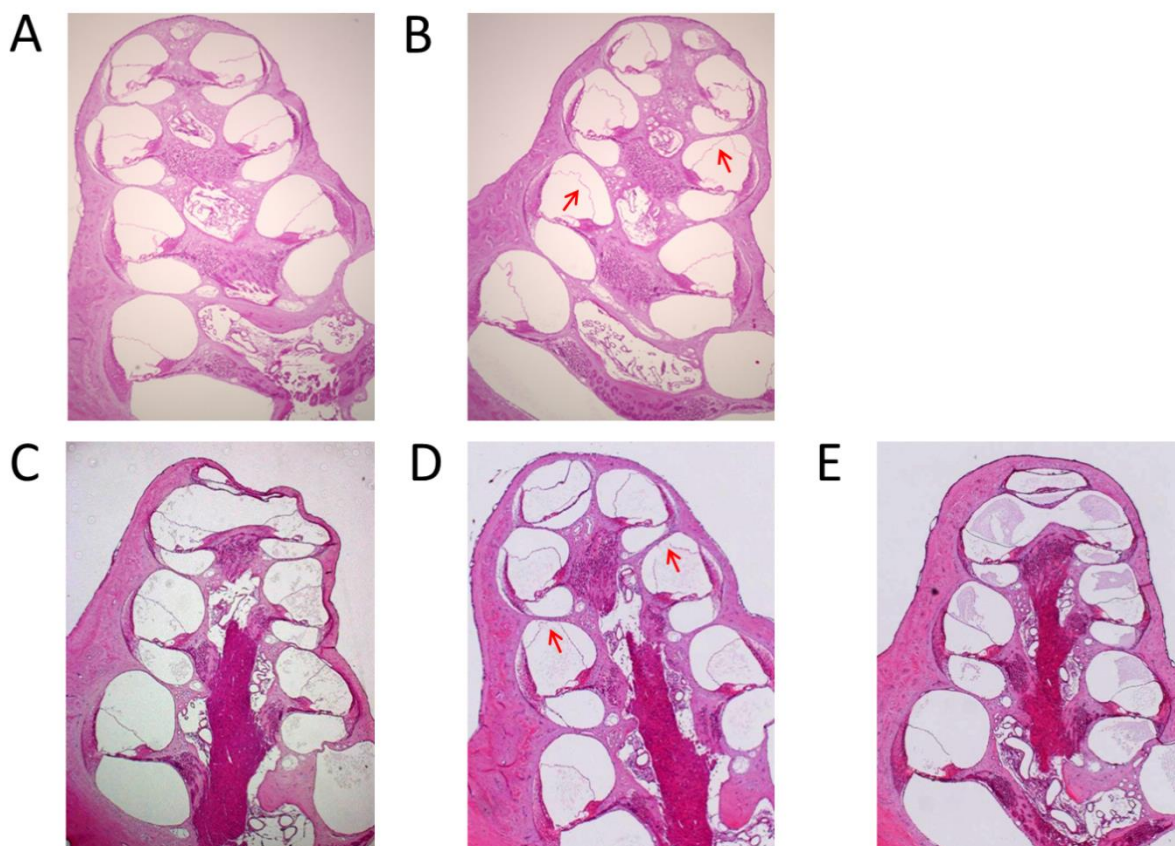


図 23

左内リンパ嚢(管)電気焼灼閉塞術施行後、4 週飼育後の各群の蝸牛の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水経口投与非手術耳:A、生理食塩水経口投与手術耳:B、トルバプタン 10 mg/kg 経口投与手術耳:C、トルバプタン 100 mg/kg 経口投与手術耳:D、トルバプタン 1 mg/body 経正円窓投与手術耳:E)

生理食塩水を経口投与した動物の非手術耳はライスネル膜の膨隆はなく、ほぼ直線であり、内リンパ水腫形成を認めなかった(A)。同動物の手術耳ではライスネル膜が前庭階中央付近まで膨隆し(赤矢印)、内リンパ水腫形成を示していた(B)。トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した動物の手術耳では生理食塩水を経口投与した動物の手術耳と比較してライスネル膜の膨隆が軽減しており、内リンパ水腫軽減効果を認めた(C, E)。トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した動物の手術耳ではライスネル膜が前庭階の上壁骨に接着している回転も見られ(赤矢印)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳と比較して内リンパ水腫の増大を認めた(D)。

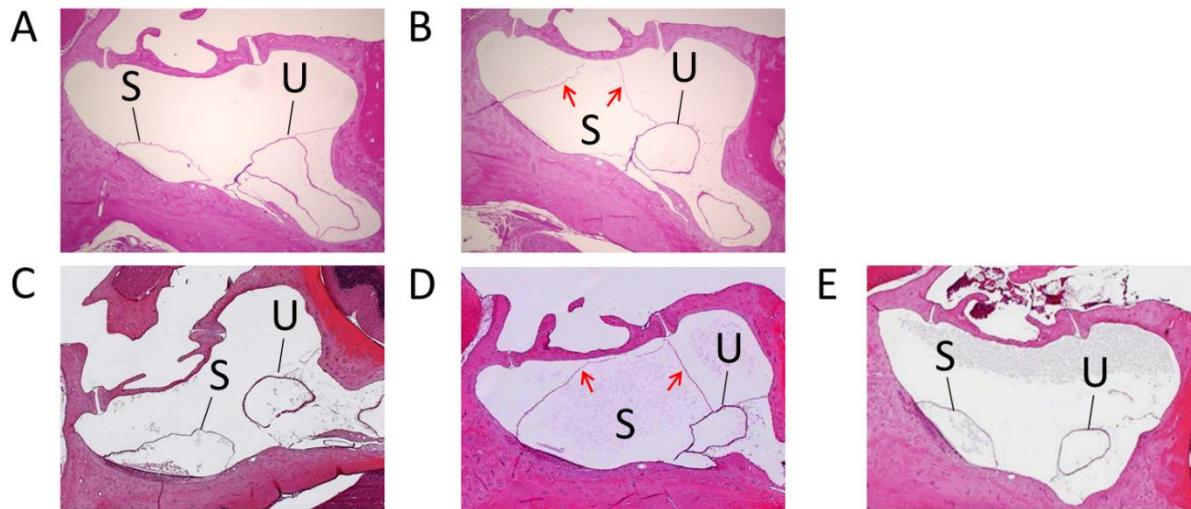


図 24

左内リンパ囊(管)電気焼灼閉塞術施行後、4週飼育後の各群の球形囊の代表的な病理組織標本写真(生理食塩水経口投与非手術耳:A、生理食塩水経口投与手術耳:B、トルバプタン 10 mg/kg 経口投与手術耳:C、トルバプタン 100 mg/kg 経口投与手術耳:D、トルバプタン 1 mg/body 経正円窓投与手術耳:E)

生理食塩水を経口投与した動物の非手術耳は球形囊の内腔に変化は認めず、内リンパ水腫形成を認めなかった(A)。同動物の手術耳では球形囊内腔は拡張し、球形囊膜がアブミ骨底板に一部接着しており、中等度～高度の内リンパ水腫形成を認めた(B)。トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した動物の手術耳では生理食塩水を経口投与した動物の手術耳と比較して球形囊内腔は縮小しており、内リンパ水腫軽減効果を認めた(C, E)。トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した動物の手術耳では球形囊膜がアブミ骨底板に広く接着し、生理食塩水やトルバプタン 10 mg/kg を経口投与した動物の手術耳と比較して内リンパ水腫の増大を認めた(D)。S:球形囊 U:卵形囊

3.1.2. 方法① 水腫軽減効果に関する病理組織形態学的検討

2.1.1 で分類した 8 群の病理組織所見について内リンパ腔の面積を計測し、内リンパ水腫軽減効果について形態学的統計解析を行った。

蝸牛では (図 25-A) 手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率は $38.9 \pm 7.8\%$ で、生理食塩水を経口投与した非手術耳群 (*Intact ES group*) の $13.9 \pm 3.8\%$ と比較して有意に大きく、有意な内リンパ水腫形成を認めた (*paired t-test* : $P < 0.001$)。手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と手術後、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経路で投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan (RW) group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率はそれぞれ $10.7 \pm 3.2\%$ と $10.9 \pm 8.0\%$ で手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) と比較して有意に各回転の中央階内リンパ腔の総増加率は減少しており、有意な水腫軽減効果を認めた (*Tukey's multiple comparison test*, $P < 0.01$)。しかしながら手術後、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group*) の各回転の中央階内リンパ腔の総増加率は $46.9 \pm 18.8\%$ で、手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と比較して有意に増大しており、内リンパ水腫の増大を認めた (*t-test*, $P < 0.001$)。一方、非手術耳の 4 群 (*Intact ES group*、*Intact ES tolvaptan 10 mg/kg group*、*Intact ES tolvaptan 100 mg/kg group*、*Intact ES tolvaptan (RW) group*) の中では内リンパ腔の増加率に有意な差は認めなかった (*Tukey's multiple comparison test*, $P > 0.05$)。

球形嚢でも (図 25-B) 蝸牛と同様、手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) の前庭に占める球形嚢の面積比は $32.8 \pm 11.2\%$ で、生理食塩水を経口投与した非手術耳群 (*Intact ES group*) の $10.6 \pm 4.5\%$ と比較して有意に大きく、有意な内リンパ水腫形成を認めた (paired *t*-test, $P < 0.05$)。手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と手術後、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経路で投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan (RW) group*) の前庭に占める球形嚢の面積比はそれぞれ $13.3 \pm 5.0\%$ と $9.7 \pm 5.3\%$ で手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) と比較して有意に減少しており、トルバプタンの全身投与あるいは局所投与による有意な水腫軽減効果を認めた (Tukey's multiple comparison test, $P < 0.01$)。しかしながら手術後、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group*) の前庭に占める球形嚢の面積比は $49.3 \pm 4.5\%$ で、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した非手術耳群 (*Intact ES tolvaptan 100 mg/kg group*) の $11.7 \pm 3.6\%$ と比較して有意に大きく、有意な内リンパ水腫形成を認めた (paired *t*-test, $P < 0.05$)。また手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) や手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と比較して有意に高く、内リンパ水腫の増大を認めた (Tukey's multiple comparison test, *Cauterized ES group*: $P < 0.05$, *Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*: $P < 0.001$)。一方、手術を施行していない 4 群 (*Intact ES group*, *Intact ES tolvaptan 10 mg/kg group*, *Intact ES tolvaptan 100 mg/kg group*, *Intact ES tolvaptan (RW) group*) の中では前庭に占める球形

囊の面積比に有意な差は認めなかった (Tukey's multiple comparison test, $P > 0.05$)。

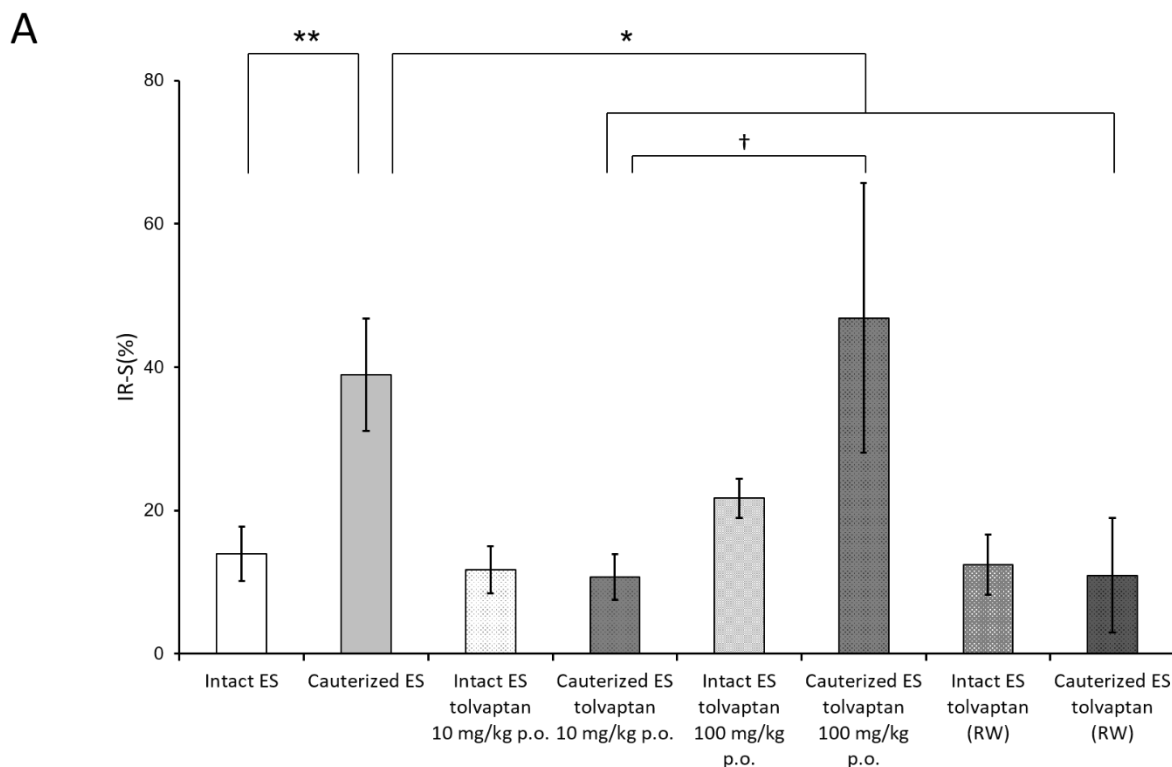


図 25 内リンパ腔面積計測による病理組織形態学的統計解析 (A: 蝸牛)

手術後、生理食塩水経口投与した手術耳群 (*Cauterized ES group*) では非手術耳群 (*Intact ES group*) と比較して有意な内リンパ水腫形成を認めた (paired *t*-test, $**P < 0.001$)。手術耳群の中で手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と手術後、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan (RW) group*) は手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) と比較して有意な水腫軽減効果を認めた (Tukey's multiple comparison test, $*P < 0.01$)。一方、手術耳群の中で手術後、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group*) は手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と比較して有意に内リンパ水腫の増大を認めた (*t*-test, $†P < 0.001$) (各群 $n=5$)。

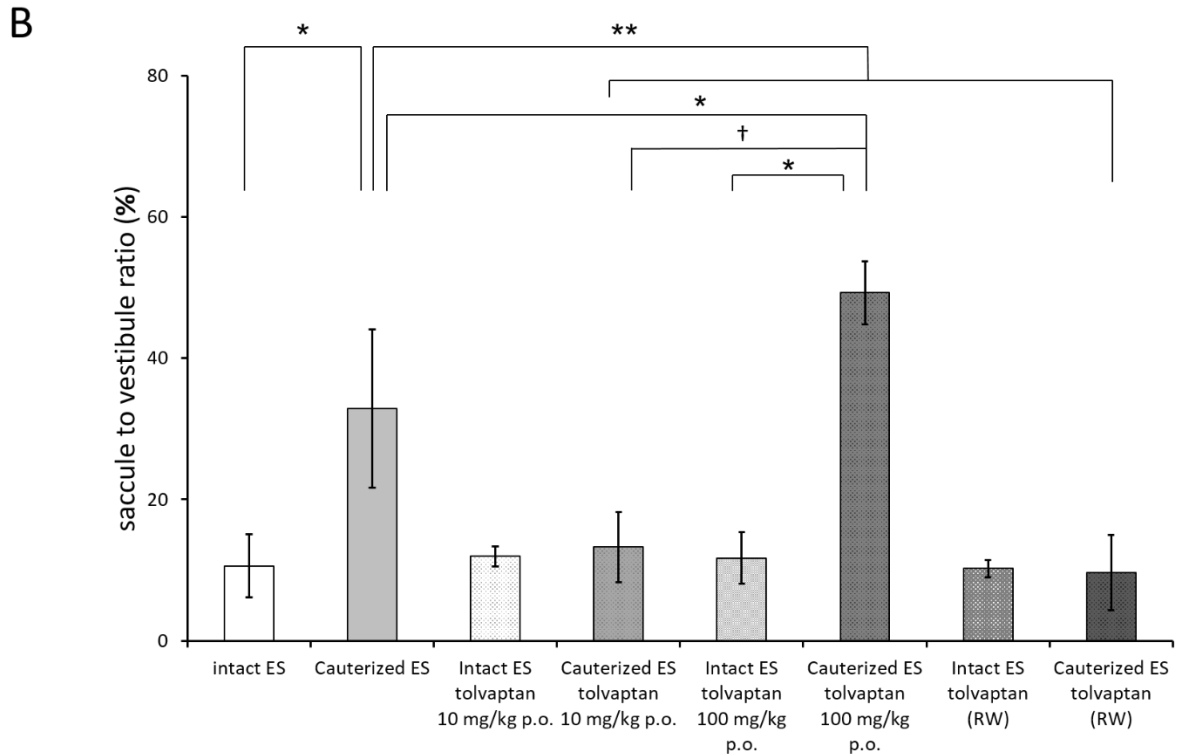


図 25 内リンパ腔面積計測による病理組織形態学的統計解析(B: 球形囊)

手術後、生理食塩水経口投与した手術耳群 (*Cauterized ES group*) では非手術耳群 (*Intact ES group*) と比較して有意な内リンパ水腫形成を認めた (paired *t*-test, $*P < 0.05$)。手術耳群の中で手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と手術後、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan (RW) group*) は手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) と比較して有意な水腫軽減効果を認めた (Tukey's multiple comparison test, $**P < 0.01$)。一方、手術後、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した手術耳群 (*Cauterized ES tolvaptan 100 mg/kg group*) はトルバプタン 100 mg/kg を経口投与した非手術耳群 (*Intact ES tolvaptan 100 mg/kg group*) と比較して有意な内リンパ水腫形成を認め (paired *t*-test, $*P < 0.05$)、手術耳群の中で手術後、生理食塩水経口投与した群 (*Cauterized ES group*) や手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (*Cauterized ES tolvaptan 10 mg/kg group*) と比較して有意に内リンパ水腫の増大を認めた (Tukey's multiple comparison test, $*P < 0.05$, $^{\dagger}P < 0.001$) (各群 $n=5$)。

3.2. 方法② 血漿 VP 値及び血漿浸透圧値の検討

トルバプタンの投与による血漿 VP 値及び血漿浸透圧値への影響について検討した。

3.2.1. 血漿 VP 値

生理食塩水を経口投与した群 (control group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 10 mg/kg p.o. group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群 (tolvaptan RW group) の血漿 VP 値はそれぞれ 1.3 ± 0.2 pg/ml、 2.1 ± 0.6 pg/ml、 1.4 ± 0.3 pg/ml で有意な差は認めなかった (Tukey's multiple comparison test, $P > 0.05$)。一方、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 100 mg/kg p.o. group) の血漿 VP 値は 15.6 ± 5.0 pg/ml で他の群より有意に高かった (Tukey's multiple comparison test, $P < 0.05$) (図 26)。

3.2.2. 血漿浸透圧値

生理食塩水を経口投与した群 (control group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 10 mg/kg p.o. group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群 (tolvaptan RW group) の血漿浸透圧はそれぞれ 288.0 ± 4.4 mOsm/kg、 294.3 ± 1.7 mOsm/kg、 292.3 ± 0.6 mOsm/kg で有意な差は認めなかった (Tukey's multiple comparison test, $P > 0.05$)。一方、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 100 mg/kg p.o. group) の血漿浸透圧値は 305.7 ± 5.9 mOsm/kg で生理食塩水を経口投与した群

(control group) 及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経路で投与した群 (tolvaptan RW group) より有意に高かった (Tukey's multiple comparison test, $P < 0.05$) (図 26)。

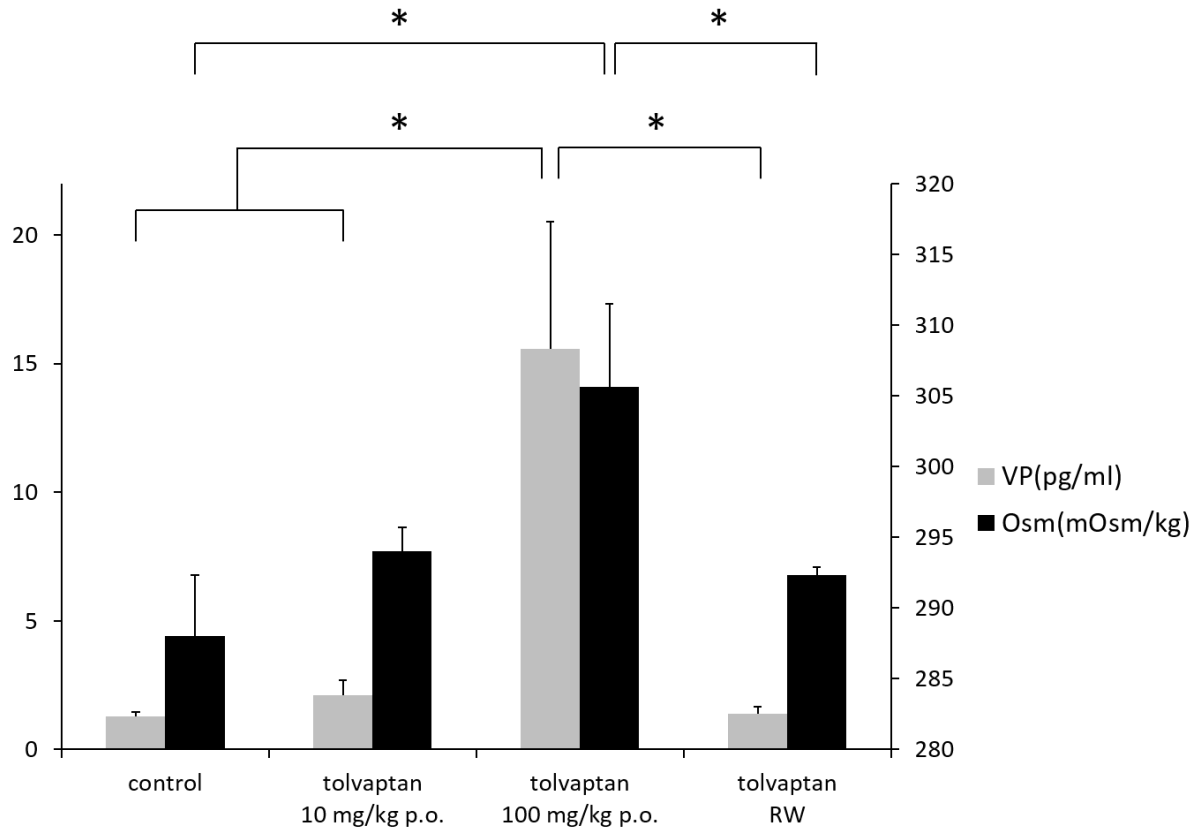


図 26 血漿 VP 値(縦軸左)及び血漿浸透圧値(縦軸右)

生理食塩水を経口投与した群 (control group)、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 10 mg/kg p.o. group)、トルバプタン 1 mg/body を正円窓経路で投与した群 (tolvaptan RW group) の血漿 VP 値及び血漿浸透圧に有意な差は認めなかった。一方、トルバプタン 100 mg/kg を経口投与した群 (tolvaptan 100 mg/kg p.o. group) の血漿 VP 値は他の群より有意に高く (Tukey's multiple comparison test, $*P < 0.05$)、血漿浸透圧値は生理食塩水を経口投与した群 (control group) 及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経路で投与した群 (tolvaptan RW group) より有意に高かった (Tukey's multiple comparison test, $*P < 0.05$) (各群 n=5)。

4. 考 察

メニエール病の治療は主に内リンパ水腫軽減のため内リンパ腔の余剰な水貯留を軽減させることを目標とするものであり、本邦では浸透圧利尿剤が治療薬として広く使用されている。しかしながら浸透圧利尿剤の長期投与による血漿浸透圧及び血漿 VP 値の上昇には注意が必要とされている[76]。研究①、②より内耳における VP-AQP2 システムの亢進がメニエール病発症の病態に深く関与していることが示唆され、VP-AQP2 システムの阻害薬がメニエール病の新しい治療戦略の一つになりうるとの仮説に基づき研究③を行った。これまでも内リンパ水腫モデル動物に V2R 拮抗的阻害剤である OPC-31260 を投与することで水腫軽減効果を認めたことが報告されている[63], [77]。本研究でも内リンパ嚢（管）閉塞術後にトルバプタン 10mg/kg を経口で全身投与もしくはトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で局所投与した群では内リンパ嚢（管）閉塞術に生理食塩水を同様の行程で投与した群と比較すると内リンパ水腫軽減効果を認めたことより、V2R 拮抗的阻害薬により VP が V2R に結合することが阻害され、結果的に外リンパが存在しているらせん靭帯と接する血管条基底細胞基底膜上に発現している AQP2 を介した内リンパへの水の輸送が阻害され、内リンパ腔での余剰な貯留が抑制され、内リンパ水腫が軽減したと考えられる。一方、内リンパ嚢（管）閉塞術後にトルバプタン 100 mg/kg を経口で全身投与した群は蝸牛では手術後、トルバプタン 10 mg/kg を経口投与した群と比較して、球形嚢では手術後、生理食塩水を同様の行程で投与した経口投与した群や手術後、トルバプタン 10 mg/kg を

経口投与した群と比較して有意な内リンパ水腫の増大を認めた。先述の OPC-31260 による先行研究でも OPC-31260 の経口全身投与もしくは正円窓経由局所投与で内リンパ嚢（管）閉塞術後の内リンパ水腫軽減効果を認めた一方で、全身投与では非手術耳（健側耳）のライスネル膜の拡張像を認めたと報告されている[63], [77]。この報告では OPC-31260 の全身投与による血漿 VP 値の亢進が全身的な反応として健側耳に内リンパ水腫を形成する要因になったと考察されている。本研究では OPC-31260 の全身投与による血漿 VP 値の亢進が全身的な反応として健側耳に内リンパ水腫を形成する要因になったことを考慮し、トルバプタンの投与量及び投与経路による全身への影響を評価するために血漿 VP 値及び血漿浸透圧値について検証した。トルバプタン 10 mg/kg を経口で全身投与もしくはトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で局所投与した群では血漿 VP 値及び血漿浸透圧値ともに影響は見られなかったが、トルバプタン 100 mg/kg を経口で全身投与した群では血漿 VP 値は他の全ての群より、血漿浸透圧値は生理食塩水を経口投与した群及びトルバプタン 1 mg/body を正円窓経由で投与した群より有意に高かった。ラットではトルバプタンの全身投与により、投与量依存性に血漿浸透圧と血漿 VP 値が上昇したと報告されており、1 mg/kg もしくは 3 mg/kg では control と血漿浸透圧と血漿 VP 値ともに差はないものの、本研究で使用した低容量 10 mg/kg では血漿浸透圧と血漿 VP 値ともに高値であった[71]。積算投与量についてモルモットに関しては組織培養の実験結果のみしか報告されていないが、ラットでは 1,000 mg/kg/日、26 週までは臓器特異性障害を認めなかったと報告されている[78]。細

胞外液における浸透圧の変化に対して視床下部における VP 分泌反応は鋭敏で、ヒトでは血漿浸透圧が 1%上昇しただけでも血漿 VP 値は 1 pg/ml 上昇するとされている [79]。V2R 拮抗的阻害薬は強力な利尿効果を有するため血漿浸透圧が上昇し、結果的に血漿 VP 値が亢進するとされている [80], [81]。VP 受容体のうち血管収縮に作用する V1a 受容体は主に血管平滑筋に細胞に局在するが、腎臓にも存在し、遠位尿細管緻密斑においてレニン・アンギオテンシン・アルドステロン系に作用し、血圧上昇のみならず水代謝にも関与しているとされている [82], [83]。また V1a 受容体は mRNA レベルでは内耳にも存在すると報告されており [84]、内耳水代謝機構維持に何らかの影響を及ぼし、内リンパ水腫形成に関与している可能性がある。以上より VP-AQP2 システムの阻害薬であるトルバプタンを全身投与或いは局所投与することで内リンパ水腫が軽減したことより、内リンパ水腫形成に至る病態には内耳における VP-AQP2 システムの亢進が関与していると考えられた。一方、全身投与では低容量では全身的な影響はみられないが、高容量では血漿浸透圧の上昇に伴う血漿 VP 値の上昇が全身的な影響としておこり、内耳における水代謝亢進による二次性の内リンパ水腫形成に至ると考えられた。トルバプタンをモルモットに使用した報告はほとんどなく、今後、投与量について基礎データが蓄積され、メニエール病治療における経口 V2R 拮抗的阻害薬の臨床応用を目指した十分な検討が追加されることが期待される。

第6章 結 論及び今後の展望

内リンパ囊(管)閉塞術による古典的な内リンパ水腫モデル動物に抗利尿ホルモンであるVPのV2作動薬であるデスマプレシンによるV2効果を急性に相加させることでめまい発作をきたす新しい内リンパ水腫モデル動物を作成した。形態学的には高度の内リンパ水腫を蝸牛及び球形囊に認め、機能的には自発眼振及び体平衡障害を一過性に認めた。慢性の内リンパ吸収障害とV2効果による急激な内耳水代謝の亢進が相加的に作用したものと考えられ、メニエール病の内リンパ水腫形成及び発症病態には内リンパ囊の機能不全或いはVPによる水代謝機構がそれぞれ単独で関与しているわけではなく、両者が相加的に作用介在しているものと推測された。また免疫組織学的にも蝸牛血管条にAQP2及びV2Rが局在していることが確認され、分子生物学的にも内耳においてVPが内耳水代謝に関与する可能性があることがわかった。しかしながら腎臓で解明されているようなVP刺激によるAQP2の細胞膜への細胞内移動による腎臓集合管での水再吸収機構であるVP-AQP2システムが内耳水代謝機構にも介在していることを解明するためには、今後、蝸牛血管条における電子顕微鏡レベルでのAQP2の細胞内局在に関する検討やVP刺激によるAQP2の蛋白量の変化等の分子細胞生物学的な詳細な検討が必要である。最後に、VP-AQP2システムの阻害薬であるトルバプタンを低容量全身投与或いは局所投与することで内リンパ水腫が軽減したことより、内リンパ水腫形成に至る病態に内耳におけるVP-AQP2システムの亢進が

関与していると考えられた。しかしながら高容量全身投与に関しては血漿浸透圧の上昇に伴う血漿 VP 値の上昇が全身的な影響としておこり、内耳における水代謝亢進による二次性の内リンパ水腫形成に至ると考えられた。したがって今後、投与量について基礎データが蓄積され、メニエール病治療における経口 V2R 拮抗的阻害薬の臨床応用に関して十分な検討が追加されることが期待される。トルバプタンの局所投与に関して本研究では内リンパ水腫軽減効果を認め、血漿 VP 値及び血漿浸透圧値に影響を及ぼさなかったことより臨床応用の可能性が最も高いと考えられるが、本研究では手術により中耳骨胞を開放し、正円窓に薬液を含有したゼラチンスポンジを留置する手法を取っており、実臨床で広く行われているような鼓膜穿刺による鼓室内注入でも同様の効果が得られるかなど、投与形態についても今後、さらに検証する必要がある。また本研究で開発した新しいモデル動物でもトルバプタンを使用し、形態学的な内リンパ水腫軽減及び機能的な自発眼振及び体平衡障害の出現が抑制されることが証明できればメニエール病の内リンパ水腫形成及び発症病態に関与すると考えられた内耳における VP-AQP2 システムの関与を裏付けることになる。今後、V2R 拮抗的阻害薬を用いた基礎研究がさらに蓄積され、メニエール病の新しい治療戦略の一つとして臨床応用されることが期待される。

第7章 謝 辞

本研究の機会を与え、ご指導を賜りました東京大学医学部耳鼻咽喉科学教室・山嵜達也教授に心より感謝申し上げます。また本研究において具体的に研究の計画、手技、手順を直接、ご指導頂きました神戸大学医学部耳鼻咽喉科学教室・柿木章伸特命教授に深謝申し上げます。また本研究にご助力いただいた高知大学医学部耳鼻咽喉科学教室の内田綾さんに御礼申し上げます。最後に、本研究にご助言を賜りました高知大学医学部耳鼻咽喉科学教室・竹田泰三名誉教授に御礼を申し上げます。

第 8 章 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 27:343-354, 1965

[2] Meniere P. Memoire sur lesions de l'oreille interne donnant lieu a des symptomes de congestion cerebrale apoplectiforme Gaz Med Paris 16: 597-601, 1861

[3] Politzer A. Uber Lasion des Labyrinthes. Arch Ohrenheilk 2: 88-99, 1867

[4] メニエール病診療ガイドライン 2011 年版 厚生労働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班 (2008~2010 年度) /編 金原出版:8-10, 2011

[5] Committee on Hearing and Equilibrium guidelines for the diagnosis and evaluation of therapy in Menière's disease. American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Foundation, Inc. Otolaryngol Head and Neck Surg 113:181-185, 1995

[6] メニエール病診療ガイドライン 2011 年版 厚生労働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班 (2008~2010 年度) /編 金原出版:70-75, 2011

- [7] 日本心身医学会教育研修委員会, 編: 心身医学の新しい診療指針. 心身医学 31: 537-576. 1991
- [8] 將積日出夫、渡辺行雄、小林美幸、他 2009年内リンパ水腫疾患疫学調査結果 厚生労働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 平成 21年度総括・分担報告書:14-17, 2009
- [9] Andersson G, Hägnebo C, Yardley L. Stress and symptoms of Meniere's disease: a time-series analysis. J Psychosom Res 43:595-603, 1997
- [10] Söderman AC, Möller J, Bagger-Sjöbäck D, Bergenius J, Hallqvist J. Stress as a trigger of attacks in Ménière's disease. A case-crossover study. Laryngoscope 114:1843-1848, 2004
- [11] Takahashi M, Odagiri K, Sato R, Wada R, Onuki J. Personal factors involved in onset or progression of Ménière's disease and low-tone sensorineural hearing loss. ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 67:300-304, 2005
- [12] 切替 一郎、野村 恭也編 新耳鼻咽喉科学 改訂10版 南山堂:19, 2004.
- [13] Lundquist PG: Aspects on endolymphatic sac morphology and function. Arch Otorhinolaryngol 212:231—240, 1976
- [14] Yamakawa K. Über die pathologische Veränderung bei einem

Meniere-Kranken. J Otorhinolaryngol Soc Jpn 44:2310-2312, 1938

[15] Hallpike CS, Cairns H. Observations on the pathology of Meniere's syndrome. J Laryngol Otol 53:625-655, 11938

[16] Merchant SN, Adams JC, Nadol JB Jr : Pathophysiology of Meniere's Syndrome: Are Symptoms Caused by Endolymphatic Hydrops? Otology Neurotol 26:74-81, 2005

[17] Foster CA, Breeze RE: Endolymphatic hydrops in Ménière's disease: cause, consequence, or epiphenomenon? Otol Neurotol 34: 1210-4, 2013

[18] Jackson M. Evaluating the Role of Hans Selye in the Modern History of Stress. Stress, Shock, and Adaptation in the Twentieth Century. Rochester (NY): University of Rochester Press. Chapter 1, 2014

[19] 出村 博. 編 : ストレスとホルモンー内分泌系からみる生体のストレス反応ー. メジカルビュー社, 1993

[20] 田中 喜秀, 脇田 慎一 : ストレスと疲労のバイオマーカー. 日薬理誌. 137:185-188, 2011

[21] Lightman SL, Young WS 3rd. Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. J

Physiol 403:511-23, 1988

[22] Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ. Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 16:348-55, 2004

[23] Whitnall MH, Mezey E, Gainer H. Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. *Nature* 317:248-50, 1985

[24] Peroutka SJ. Chronic fatigue disorders: an inappropriate response to arginine vasopressin? *Med Hypotheses* 50:521-3, 1998

[25] Dugué B, Leppänen EA, Teppo AM, Fyhrquist F, Gräsbeck R. Effects of psychological stress on plasma interleukins-1 beta and 6, C-reactive protein, tumour necrosis factor alpha, anti-diuretic hormone and serum cortisol. *Scand J Clin Lab Invest* 53:555-61, 1993

[26] Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Annu Rev Physiol* 67:259-84, 2005

[27] Harbuz MS, Rees RG, Eckland D, Jessop DS, Brewerton D, Lightman SL. Paradoxical responses of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) messenger ribonucleic acid (mRNA) and CRF-41 peptide and

adenohypophysial proopiomelanocortin mRNA during chronic inflammatory stress. *Endocrinology* 130:1394-400, 1992

[28] Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* 299:355-7, 1982

[29] Chowdrey HS, Larsen PJ, Harbuz MS, Jessop DS, Aguilera G, Eckland DJ, Lightman SL. Evidence for arginine vasopressin as the primary activator of the HPA axis during adjuvant-induced arthritis. *Br J Pharmacol* 116:2417-24, 1995

[30] Lightman SL : The neuroendocrinology of stress: a never ending story. *J Neuroendocrinol* 20:880-884, 2008

[31] Egami T, Sando I, Black FO. Hypoplasia of the vestibular aqueduct and endolymphatic sac in endolymphatic hydrops. *ORL* 86:327-339, 1978

[32] Sando I, Ikeda M. The vestibular aqueduct in patients with Meniere's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 97:558-570, 1984

[33] Takeda T, Sawada S, Kakigi A, Saito H. Computed radiographic measurement of the dimensions of the vestibular aqueduct in Meniere's disease. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 528 (Suppl):80-84, 1997

[34] Aran JM, Rarey KE, Hawkins JE Jr. Functional and morphological changes

in experimental endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol* 97:547-57, 1984

[35] Kusakari J, Kobayashi T, Arakawa E, Rokugo M, Ohyama K. Time-related changes in cochlear potentials in guinea pigs with experimentally induced endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol Suppl* 435:27-32, 1987

[36] Kimura RS. Animal models of endolymphatic hydrops. *Am J Otolaryngol* 3:447-451, 1982

[37] Andrews JC, Honrubia V. Vestibular function in experimental endolymphatic hydrops. *Laryngoscope* 98:479-485, 1988

[38] Takeda T, takeda S, Kitano H, Okada S, Kakigi A. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hearing Research* 140:1-6, 2000

[39] Nishimura M, Kakigi A, Takeda T, Okada T, Doi K. Time course changes of vasopressin-induced enlargement of the rat intrastrial space and the effects of a vasopressin type 2 antagonist. *Acta Oto-Laryngologica* 129:709-715, 2009

[40] Takeda T, Kakigi A, Saito H. Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol* 519:219-222, 1995

[41] Kakigi A, Takeda T : Antidiuretic hormone and osmolality in patients with Ménière's disease. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 71:11-3, 2009

- [42] Lee KS, Kimura RS. Ischemia of the endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 112:658–666, 1992
- [43] Takeda T, Kakigi A, Saito H. Epidural electrocauterization of endolymphatic sac. *Equilibrium Res* 9 (Suppl):139–143, 1993
- [44] Okuno T, Sando I. Localization, frequency and severity of endolymphatic hydrops and the pathology of the labyrinthine membrane in Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 96:438-445, 1987
- [45] Shambaugh GE, Clemis JD, Arenberg IK. Endolymphatic duct and sac in Meniere's disease. Surgical and histopathologic observations. *Arch Otolaryngol* 89:816-825, 1969
- [46] Salt AN, Plontke S. Endolymphatic Hydrops: Pathophysiology and Experimental Models. *Otolaryngol Clin N Am* 43:971-983, 2010
- [47] Dunnebier EA, Segenhout JM, Wit HP, Albers FW. Two-phase endolymphatic hydrops: a new dynamic guinea pig model. *Acta Otolaryngol* 117:13-19, 1997
- [48] Takumida M, Akagi N, Anniko M. A new animal model for Ménière's disease. *Acta Otolaryngol* 128:263-271, 2008

- [49] Agre P, Sasaki S, Chrispeels MJ. Aquaporins: a family of water channel proteins. *Am J Physiology Renal Physiology* 265:F461, 1993
- [50] Frøkiaer J, Marples D, Knepper MA, Nielsen S. Pathophysiology of aquaporin-2 in water balance disorders. *Am J Med Sci* 316:291-9, 1998
- [51] Marples D, Frøkiaer J, Nielsen S. Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* 276:F331-9, 1999
- [52] Nielsen S, Fronkiare J, Marples D, Kwon TH, Agre P, Knepper MA. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiol Rev* 82: 205-244, 2002
- [53] Takata K, Tajika Y, Matsuzaki T, Aoki T, Suzuki T, Abduxukur A, Hagiwara H. Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: water channel aquaporin-2 of kidney collecting duct cells. *J Pharmacol Sci* 96:255-9, 2004
- [54] Beitz E, Kumagami H, Krippeit-Drews P, Ruppertsberg JP, Schultz JE. 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. *Hearing Research* 132:76-84, 1999

- [55] Nishimura M, Kakigi A, Takeda T, Takeda S, Doi K. Expression of aquaporins, vasopressin type 2 receptor, and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters in the rat endolymphatic sac. *Acta Otolaryngol* 129:812-8, 2009
- [56] Takeda T, Taguchi D. Aquaporins as potential drug targets for Meniere's disease and its related diseases. *Handb Exp Pharmacol* 190:171-84, 2009
- [57] Eckhard A, Gleiser C, Arnold H, Rask-Andersen H, Kumagami H, Müller M, Hirt B, Löwenheim H. Water channel proteins in the inner ear and their link to hearing impairment and deafness. *Mol Aspects Med* 33:612-37, 2012
- [58] Kumagami H, Löwenheim H, Beitz E, Wild K, Schwartz H, Yamashita K, Schultz J, Paysan J, Zennes HP, Ruppertsberg JP. The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Pflugers Archiv* 436:970-975, 1998
- [59] Nishioka R, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Takebayashi S, Taguchi D, Nishimura M, Hyodo M. Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea. *Hearing Research* 260:11-19, 2010
- [60] Takumida M, Kakigi A, Egami N, Nishioka R, Anniko M. Localization of aquaporins 1, 2, and 3 and vasopressin type 2 receptor in the mouse inner ear.

Acta Otolaryngol 132:807-813, 2012

[61] Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, Yazawa Y, Kitajima K, Isono T, Takeda T, Kimura H, Tooyama I. Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. Neuroreport 10:1205–1207, 1999

[62] Sawada S, Takeda T, Kitano H, Takeuchi S, Kakigi A, Azuma M. Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. Neuroreport 13:1127–1129, 2002

[63] 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 Research 21:89–97, 2003

[64] Fukushima K, Takeda T, Kakigi A, Takeda S, Sawada S, Nishioka R, Azuma H, Taguchi T. Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops. ORL 67:282-288, 2005

[65] Kitano H, Takeda T, Takeda S, Suzuki M, Kitanishi T, Kitajima K, Kimura H, Tooyama I. Endolymphatic hydrops by administration of vasopressin in the rat. Acta Histochemica Cytochemica 34:229–233, 2001

[66] Bichet DG, Szatalowicz V, Chalmovitz C, Schrier RW. Role of vasopressin in abnormal water excretion in cirrhotic patients. Annals of Internal Medicine 96:

413–417, 1982

[67] Cas LD, Metra M, Leier CV. Electrolyte disturbances in chronic heart failure: metabolic and clinical aspects. *Clinical Cardiology* 18:370–376, 1995

[68] Decaux G, Soupart A, Vassart G. Non-peptide arginine-vasopressin antagonists: the vaptans. *Lancet* 371:1624–1632, 2008

[69] Robertson GL. Vaptans for the treatment of hyponatremia. *Nat Rev Endocrinol* 7:151-61, 2011

[70] Yamamura Y, Ogawa H, Yamashita H, Chihara T, Miyamoto H, Nakamura S, Onogawa T, Yamashita T, Hosokawa T, Mori T, Tominaga M, Yabuuchi Y. Characterization of a novel aquaretic agent, OPC-31260, as an orally effective, nonpeptide vasopressin V₂ receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology* 105:787–791, 1992

[71] Yamamura Y, Nakamura S, Itoh S, Hirano T, Onogawa T, Yamashita T, Yamada Y, Tsujimae K, Aoyama M, Kotosai K, Ogawa H, Yamashita H, Kondo K, Tominaga M, Tsujimoto G, Mori T. OPC-41061, a highly potent human vasopressin V₂-receptor antagonist: pharmacological profile and aquaretic effect by single and multiple oral dosing in rats. *Journal of Pharmacology and*

Experimental Therapeutics 287:860–867, 1998

[72] Marples D, Christensen BM, Frokiaer J, Knepper MA, Nielsen S. Dehydration reverses vasopressin antagonist-induced diuresis and aquaporin-2 downregulation in rats. *American Journal Physiology* 275:F400–409, 1998.

[73] Christensen BM, Zelenina M, Aperia A, Nielsen S. Localization and regulation of PKA-phosphorylated AQP2 in response to V(2)-receptor agonist/antagonist treatment. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 278:F29–42, 2000

[74] Serradeil-Le Gal C, Lacour C, Valette G, Garcia G, Foulon L, Galindo G, Bankir L, Pouzet B, Guillon G, Barberis C, Chicot D, Jard S, Vilain P, Garcia C, Marty E, Raufaste D, Brossard G, Nisato D, Maffrand JP, Le Fur G. Characterization of SR 121463A, a highly potent and selective, orally active vasopressin V2 receptor antagonist. *Journal of Clinical Investigation* 98 : 2729–2738, 1996

[75] Gheorghide M, Konstam MA, Burnett JC Jr, Grinfeld L, Maggioni AP, Swedberg K, Udelson JE, Zannad F, Cook T, Ouyang J, Zimmer C, Orlandi C.

Efficacy of Vasopressin Antagonism in Heart Failure Outcome Study With Tolvaptan (EVEREST) Investigators. Short-term clinical effects of EVEREST Clinical Status Trials. JAMA 297:1332–1343, 2007

[76] Kakigi A, Takeda T, Sawada S, Taguchi D. Antidiuretic hormone and osmolality in isosorbide therapy and glycerol test.

ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec 6:279-82, 2006

[77] Takeda T, Takeda S, Kakigi A, Okada T, Nishioka R, Taguchi D. A comparison of dehydration effects of V2-antagonist (OPC-31260) on the inner ear between systemic and round window applications. Hearing Research 21 : 89–97, 2006

[78] Oi A, Morishita K, Awogi T, Ozaki A, Umezato M, Fujita S, Hosoki E, Morimoto H, Ishiharada N, Ishiyama H, Uesugi T, Miyatake M, Senba T, Shiragiku T, Nakagiri N, Ito N. Nonclinical Safety Profile of Tolvaptan. Cardiovasc Drugs Ther 25:S91-9, 2011

[79] Robertson GL, Mahr EA, Athar S, Sinha T. Development and clinical application of a new method for the radioimmunoassay of arginine vasopressin in human plasma. Journal of Clinical Investigation 52:2340–2352, 1973

[80] Marples D, Christensen BM, Frokiaer J, Knepper MA, Nielsen S.

Dehydration reverses vasopressin antagonist-induced diuresis and aquaporin-2 downregulation in rats. *American Journal Physiology* 275 : F400–409, 1998

[81] Fleeman LM, Irwin PJ, Phillips PA, West J. Effects of an oral vasopressin receptor antagonist (OPC-31260) in a dog with syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone. *Australian Veterinary Journal* 78:825–830, 2000

[82] Aoyagi T, Koshimizu TA, Tanoue A. Vasopressin regulation of blood pressure and volume: findings from V1a receptor-deficient mice. *Kidney Int* 76:1035-9, 2009

[83] Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A. Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813-64, 2012

[84] Furuta H, Luo L, Ryan AF, Mori N. Expression of mRNA encoding vasopressin V1a, vasopressin V2, and ANP-B receptors in the rat cochlea. *Hear Res* 117:140-8, 1998