研 究

フロセミドに対する血液—内耳関門の
透過性に関する実験的研究

大 村 正 樹

Experimental Research on the Permeability of
the Blood-Cochlea Barrier to Furosemide

Masaki Ohmura

(Kyoto University)

To clarify the characteristics and the control of the blood-cochlea barrier, we measured EP (the endocochlear potential) and the furosemide concentration in the perilymph of guinea pigs. It was recognised that: 1) glycerol increased the toxicity of furosemide against the EP in adults, 2) the toxicity of furosemide against EP was stronger in neonates than in adults, 3) glycerol did not increase furosemide toxicity against EP in neonates, 4) acute hypertension also increased the ototoxicity of furosemide, 5) glycerol increased furosemide concentration in the perilymph.

These findings suggest that glycerol facilitates the permeability of blood-cochlea barrier to furosemide. Therefore, it is assumed that glycerol and acute hypertension can facilitate the access of some drugs used to treat inner ear diseases.

Key words: EP, furosemide, glycerol, hypertension, blood-cochlea barrier

目 次

はじめに

第1章 モルモットに於けるフロセミドのEP障害
性に対するグリセロールの影響

- (1) 目的
- (2) 方法
- (3) 結果
- (4) 考按

第2章 幼若モルモットに於けるフロセミドのEP
障害性とグリセロールの影響

- (1) 目的
- (2) 方法
- (3) 結果
- (4) 考按

第3章 フロセミドのEP障害性に及ぼす血圧の影
響

- (1) 目的
- (2) 方法
- (3) 結果
- (4) 考按

第4章 外リンパのフロセミド濃度とグリセロール
の影響

- (1) 目的
- (2) 方法
- (3) 結果
- (4) 考按

全体のまとめ

総括

参考文献

はじめに

内耳にも血液—脳関門と同様に、血液—内耳関門の存在¹⁾²⁾が想定されている。その性質に就いては未だ解明されていない部分が多いが、内耳への障害物質の進入を阻止しているだろうと考えられる。しかし逆に血液—内耳関門が、内耳疾患の治療に使われている薬剤の内耳到達を阻止している可能性も十分に考えられる。この血液—内耳関門の透過性を自由に制御できれば、内耳毒物の副作用を抑制したり、内耳疾患治療薬の効果を増強させる事も可能である。本論文では血液—内耳関門の性質を調べると共に、透過性を亢進させる因子に就いて実験を行った。現在までのところ内耳疾患治療薬の効果を客観的に判定する事はかなり困難で、定量化は殆ど不可能である。そこで今回は定量化が容易であるという点から、内耳毒として知られるフロセミドを選びその内耳毒性を修飾する因子に就いて実験した。

フロセミド等いわゆるループ利尿剤の副作用の一つに、聴力障害がある事は良く知られている。実験的には、内耳に於ける聴覚のエネルギー源であると言われている蝸牛内直流電位(E_P)を低下³⁾⁴⁾させる事が知られており、これが聴力障害の発生機序と考えられている。これらループ利尿剤の作用部位としてはE_Pを産生している血管条⁵⁾⁶⁾⁷⁾が想定されており、形態学的にはこの部分の浮腫や細胞の膨化⁵⁾が認められている。

この様なフロセミドの内耳障害性を修飾する

因子について、実験的に検討した。特に、フロセミドの内耳への透過性に影響を及ぼすと考えられる因子に就いて実験を行った。フロセミドの内耳への透過性に影響を与える因子を探る事は、血液—内耳関門の性質を探る事にもなり、内耳毒性を持つ物質にしる内耳疾患の治療に使われる薬剤にしる、その内耳への到達を制御する方法を見付ける手掛かりになると考えられる。

第1章では血液—脳関門の透過性を亢進させる⁸⁾⁹⁾と言われているグリセロールを用い、これがフロセミドの内耳障害性を、どの様に修飾するかをE_Pを指標として観察した。第2章では、血液—脳関門が未発達で、その透過性が部分的に亢進している¹⁰⁾と言われている新生仔を用いて、同様にグリセロールの影響を観察した。新生仔における血液—内耳関門の特性と、これに対するグリセロールの影響を検討した。第3章では、血液—脳関門の透過性を亢進させる⁸⁾⁹⁾と言われる、急性の高血圧を引起すアンギオテンシンを用いて、やはりフロセミドの内耳障害性をどの様に修飾するかを観察した。以上の実験からフロセミドの内耳障害性は、種々の方法で修飾される事が明らかとなったが、これが血液—内耳関門の透過性の変化によるものかどうかを探るために、第4章では、外リンパ中のフロセミド濃度を測定し脳脊髄液中の濃度と比較すると共にグリセロールによってこの濃度がどの様になるかを検討した。

第1章 モルモットに於けるフロセミドのE_P障害性に対する グリセロールの影響

目 的

フロセミドが内耳障害性を持つ事は先述した通りであるが、この障害性を増強する因子に就いては報告がない。一方血液—脳関門に就いては、グリセロールによって脳血管内皮細胞間のtight junctionにosmotic openingが起るために、その透過性が亢進⁸⁾⁹⁾するとの報告

があり、血液—内耳関門に於いても同様の作用の見られる可能性がある。そこでグリセロールをフロセミドと併用して、フロセミドの内耳毒性が修飾されるかどうかを検討する目的で、実験を行った。

方 法

体重300~500g、プライエル反射正常のモル

モット37匹を使用した。ネンブタール (20~25 mg/kg) 腹腔内投与後, 気管切開を行い人工呼吸器 (Narishige AR-1) に接続した。動物の厳密な固定の為筋弛緩剤 (ガラミン 1 mg/kg) を静注し, 頭部固定器 (Narishige SG-1) に固定し, 体温は保温ブランケットにより直腸温で37.5℃に保った。左総頸動脈にカテーテルを挿入し, 圧トランスデューサー (COPAL P-1800-401G) にて全身血圧をモニターすると共に, 左内頸静脈にもカテーテルを挿入し薬剤投与に使用した。心電図を四肢より誘導し, モニターした。

右中耳骨胞を腹側より開放し, 蝸牛基底回転骨壁を顕微鏡下にダイヤモンドバーを用いて削り螺旋靱帯を露出させた。3M KCI を満たした先端 2-10 μ のガラス電極をマイクロマニピュレーターで中央階に刺入した。高入出力プリアンプを用いてEPおよびCMを誘導し, 4チャンネルペンレコーダー (Watanabe MC 6601) に記録した (図1)。

EPの0レベルは実験中何度も確め安定して記録できている事を確認した。実験に先立ち人

工呼吸器を約1分間停止してEPが充分低下し人工呼吸の再開に伴って速やかに回復する正常な反応性を蝸牛が持っている事を確認した。

薬剤はカテーテルより2分間かけてゆっくりと静注した。動物を2群にわけフロセミド単独群 (Fur group), グリセロール併用群 (Gly-Fur group) とした。フロセミド単独群にはフロセミド20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kg, 50mg/kgのいずれかを単独で投与した。グリセロール併用群にはグリセロール (50v/v%, 1 ml/kg) 投与15分後にフロセミド20mg/kg, 30mg/kg, 40mg/kgのいずれかを投与した。フロセミド投与後約45分間記録を続けた。

結 果

37匹のモルモットから記録したEPの初期値は, フロセミド単独群で 83.3 ± 9.3 mv ($n=20$), グリセロール併用群で 81.4 ± 8.3 mv ($n=17$) (平均 $\pm$ 標準偏差) と正常な値を示した。フロセミド投与後のEPの経時変化を2群に就いて, 図2にそれぞれ代表例で表示した。

Fur group が, フロセミド単独群を, Gly-Fur group が, グリセロール併用群を示して

図1 EPとCMの測定法

いる。図2に見られる様にEPはフロセミド投与後急速に低下した後、徐々に回復する。EPが最低になった時点で、そこまでの電位低下が初期値の何%であるかを計測しフロセミドの毒性の指標とした。このEP低下率 (Percentile

Decrease of EP) を両群についてすべてプロットしたものが図3である。横軸にフロセミド投与量、縦軸にEP低下率をとっている。○で示したフロセミド単独群に比べて×で示したグリセロール併用群の方が、同じ投与量で大きな

図2 成熟モルモットの両群のEP変化の代表例

図3 成熟モルモットの両群のEP低下率の1次回帰直線

EP低下率を示している事がわかる。全体としてグリセロール併用群のグラフは、フロセミド単独群のグラフを左に平行移動した形になっている。表1に両群のEP低下率をフロセミド投与量ごとに平均と標準偏差で示したが、いずれの投与量でも両群に有意の差を認めた。

つまりグリセロールの併用によって、フロセミドの内耳障害性が増強される事が明らかとなった。

考 按

今回の実験からグリセロールの併用によってフロセミドの内耳毒性が増強される事が明らかとなったが、その増強効果の機序としては

1) グリセロール自体に内耳毒性がある、

2) グリセロールによって全身状態が悪化してフロセミドの内耳毒性を増強する、

3) グリセロールによってフロセミドの排泄障害が起り血中のフロセミド濃度が増加する、

4) グリセロールによってフロセミドの内耳への透過性が亢進する、
等が考えられる。

今回使用した50v/v%グリセロール1 ml/kg単独ではEPに全く変化の見られない事を今回の実験で確認した。従って1)は否定的である。次にグリセロールの全身状態への影響に関しては、問題になるのは循環器への影響である。図4にグリセロール併用群の一例で測定した全身血圧の変化を示す。グリセロールの静注

表1 成熟モルモットの両群におけるEP低下率(%)の比較
(平均±標準偏差)

フロセミド 投 与 量	フロセミド単独群 (Fur group)	グリセロール併用群 (Gly-Fur group)
20mg/kg	13.5± 3.1 (n=5)	23.1± 5.3 (n=5)
30mg/kg	13.6± 1.9 (n=5)	43.9±18.2 (n=5)
40mg/kg	53.7±18.9 (n=7)	103.8± 3.1 (n=5)
50mg/kg	102.7±10.5 (n=5)	—

図4 グリセロールとフロセミドを併用した時の血圧変化の1例

によって血圧はやや低下するが、10%前後で10分程度で回復しており、引続くフロセミド投与による血圧低下もフロセミド単独の場合と大差なかった。またグリセロールの投与によって心電図に変化は見られなかった。この様にグリセロールによる循環器への影響は僅かであり、フロセミドの内耳毒性の増強効果の原因とは考えにくい。従って2)の機序も否定的である。

図3に示したEP低下率とフロセミド濃度のグラフが、フロセミド単独群とグリセロール併用群とで全く同じ形をしており、丁度平行移動したかの様になっている事は、グリセロールの併用によって、フロセミドの投与量を単純に増加させたと同じ効果が得られた事を示している。図3に見られる2本の直線は両群の1次回帰直線であるが、これらがフロセミド投与量(横軸)をX, EP低下率(縦軸)をYとしてそれぞれ $Y=3.9X-94.7$, $Y=3.9X-55.9$ と平行になっている事も、やはりこの事を支持し

ている。先に挙げた機序の内、3), 4)の場合この様な平行移動が起こって当然である。3), 4)のいずれが妥当かは今回の実験結果からは判別できない。これに就いてはいずれ第4章で検討するが第2・第3章での実験は、4)の仮説の上に立って行っていく事とした。

血液—内耳関門ではグリセロールが osmotic opening を引起こす⁸⁾⁹⁾との報告が見られ、同関門の透過性を亢進させるとされている。同様の事が血液—内耳関門で起こされれば4)の機序は充分考えられる事と思われる。また血液—内耳関門の主体は毛細血管内皮細胞を堅く繋ぐ tight junction であるとの報告¹⁾や、グリセロールによって血管条辺縁細胞間の tight junction が開くとの報告¹¹⁾もあり、血液—内耳関門をグリセロールが osmotic opening という形で開く可能性も充分考えられる。

第2章 幼若モルモットに於けるフロセミドのEP障害性とグリセロールの影響

目 的

第1章でグリセロールにはフロセミドの内耳障害性を増強する作用の有る事が示され、これがグリセロールによって引起こされる、血液—内耳関門の透過性亢進に基づく事が想定された。この仮説の妥当性を検討する目的で、モルモットの新生仔を用いて実験を行った。

血液—脳関門が新生仔に於いては幾つかの物質に対して感受性が高い事、つまり透過性が成熟動物より亢進している事は既に報告¹⁰⁾されている。血液—内耳関門に就いては未だ報告がないが、内耳血管が脳底動脈の分枝である事を考えると、同様に亢進している可能性は充分にある。もし新生仔の血液—内耳関門の性質が成熟動物のそれと異なっているなら、フロセミドの内耳毒性も、それに対するグリセロールの影響も、成熟動物の場合とはかなり違って来る筈である。この違いを発見できれば、新生仔の血液—内耳関門の性質が明らかになると同時に、グ

リセロールの影響が引起こされる機序に就いても更に明確にする事ができると考えられた。この違いを探る目的で、今回の実験を行った。

方 法

実験方法は第1章で述べた方法とほぼ同様である。用いた動物は、生後1週間以内のモルモット新生仔36匹で体重は80~120gであった。ガラス電極の先端は、蝸牛が小さい事を考えて1~5 μ と細くした。グリセロール投与量は成熟動物の場合と同じ50v/v%, 1 ml/kgとしたが、フロセミド投与量はEP障害の程度を確認しながら決定したため、10, 20, 30, 40mg/kgと成熟動物の場合に比べて少量となった。

結 果

新生仔から得られたEPの値は、フロセミド単独群で 77.4 ± 6.6 mv (n=19), グリセロール併用群で 78.0 ± 6.6 mv (n=17) (平均±標準偏差)で、第1章で述べた成熟動物のEPの値 83.3 ± 9.3 mv (n=20), および 81.4 ± 8.3 mv

($n=17$) と比較して共に2.5%以下の危険率で有意に小さな値を示した。

第1章と同様に, EPのフロセミドによる電位の最大低下幅を最初のEP電位の%で示したEP低下率 (Percentile Decrease of EP) を, フロセミドの内耳毒性の指標とした. 表2にEP低下率を平均と標準偏差で示し, 図5に各投与量毎にEP低下率をグラフで示した. やはり Fur group はフロセミド単独群を, Gly-Fur group はグリセロール併用群を示している. 表2のいずれの投与量についても, フロセミド単独群とグリセロール併用群との間に有意の差を認めなかった. 新生仔の両群のEP低下率 (表2) を成熟動物のEP低下率 (表

1) と比較すると, 新生仔の方が有意に大きなEP低下率を示した (いずれの投与量でも0.5%以下の危険率).

この様にモルモットの新生仔に於いては, フロセミドの内耳毒性は成熟モルモットに於けるよりも強く, かつこの内耳毒性は成熟動物と異なり, グリセロールによって増強されない事が明らかとなった.

考 按

第1章で述べた様に成熟モルモットでは, グリセロールがフロセミドの内耳毒性を増強する事は確かであり, その機序としては, グリセロールによる血液-内耳関門のフロセミドに対する透過性の亢進が最も考えられる. 今回の新生

表2 幼若モルモットの両群におけるEP低下率 (%) の比較
(平均±標準偏差)

フロセミド 投 与 量	フロセミド単独群 (Fur group)	グリセロール併用群 (Gly-Fur group)
10mg/kg	5.9± 1.2 ($n=5$)	6.5± 1.3 ($n=5$)
20mg/kg	35.0±23.3 ($n=6$)	46.1±19.5 ($n=5$)
30mg/kg	105.3±26.3 ($n=5$)	92.6±16.2 ($n=5$)
40mg/kg	126.0±16.3 ($n=3$)	135.4± 3.8 ($n=2$)

図5 幼若モルモットの両群のEP低下率と1次回帰直線

仔での実験でも、この事が裏づけられた。

新生仔でのフロセミドのEP障害性は成熟動物でのそれよりも強かったが、新生仔の血液一内耳関門がフロセミドに対して成熟動物よりも透過性が高いと考えれば、充分説明できる。成熟動物のEP低下率(Y)とフロセミドの投与量(X)との間に、 $Y=3.9X-94.7$ (フロセミド単独群), $Y=3.9X-55.9$ (グリセロール併用群) という1次回帰直線が得られるのに対し、新生仔でも $Y=4.3X-41.5$ (フロセミド単独), $Y=4.3X-38.1$ (グリセロール併用群) という1次回帰直線が得られ、いずれも殆ど平行な直線をなしている (図6)。つまり新生仔

ではフロセミドの投与量が多くなっているのかの様に見え、この事は新生仔では血液一内耳関門のフロセミドに対する透過性が、成熟動物よりも高い事を示している。この様にフロセミドに対する透過性が高いのであれば、グリセロールによってもこれ以上の透過性亢進は起こらないだろうし、従ってフロセミドの内耳毒性が増強されなくても当然であろう。

新生仔の血液一脳関門は幾つかの物質に対して高い透過性を持つ事¹⁰⁾が知られており、血液一内耳関門でも同様の現象が見られるものと考えられる。

図6 成熟および幼若モルモットのEP低下率の1次回帰直線

第3章 フロセミドのEP障害性に及ぼす血圧の影響

目 的

第1章でグリセロールがフロセミドのEP障害性を増強する事を、モルモットの実験で示し、グリセロールによって血液一内耳関門のフロセミドに対する透過性が、亢進する為であろうと推測した。第2章でもこの仮説に矛盾しない実験結果を得た。そこで今一つの傍証を得る

為、アンギオテンシンを用いて観察を行った。血液一脳関門では、急性高血圧によって透過性が亢進⁸⁾⁹⁾するという報告がある。アンギオテンシンによってフロセミドのEP障害性が増強される様であれば、これが血液一内耳関門に働いて、フロセミドに対する透過性を亢進させていると言う仮説が更に確実になると考えられ

た。この事を確認する目的で実験を行った。

方 法

実験方法は先述の通りである。成熟動物59匹を用い、アンギオテンシンアミドを前投与した。アンギオテンシンは静脈から、マイクロインジェクター（Narishige IM-1）を使って10-60ng/kg/min の速度で注入し、一部の動物では手動で注入した。いずれの場合も全身血圧をモニターして、血圧が最高に達して安定した

時点で、フロセミドを静注した。フロセミド投与量は30mg/kgと40mg/kgとした。

結 果

薬剤投与前のEPの値は正常であった（30mg/kg投与で85.8±9.6mv, 40mg/kg投与で82.1±6.4mv）。フロセミド投与後のEP低下率を表3に示した（平均±標準偏差）。フロセミド投与量30mg/kgでも、40mg/kgでも、アンギオテンシン併用群の方が有意に大きいEP低下率を示

表3 フロセミド単独群（対照群）とアンギオテンシン併用群（高血圧群）とのEP低下率（%）の比較
（平均±標準偏差）

フロセミド投与量	フロセミド単独群（対照群）	アンギオテンシン併用群（高血圧群）
30mg/kg	25.2± 9.0 (n=11)	73.1±30.6 (n=19)
40mg/kg	79.3±27.5 (n=11)	107.0±26.3 (n=18)

図7 急性高血圧下でのフロセミド30mg/kg投与によるEP低下率

図8 急性高血圧下でのフロセミド40mg/kg投与によるEP低下率

した（危険率 0.5%以下及び2.5%以下）。図7にフロセミド投与量 30mg/kg の場合のEP低下率（縦軸）と全身血圧の関係を示したが、やはり○でしめしたアンギオテンシン併用群の方が、●で示したフロセミド単独群より大きなEP低下率を示していることが判る。横軸に示した血圧は、薬剤投与前の血圧を100%とした時のフロセミド投与時の血圧であるが、アンギオテンシンによる血圧上昇が著明な程、EPの低下が大きい傾向が見られる。図8はフロセミド投与量を 40mg/kg とした場合のものであるが、図7とほぼ同様の結果が得られた。

考 按

第1, 2章で高浸透圧剤であるグリセロールの影響を観察し、これがフロセミドの内耳への透過性を亢進させると考えた。そこで本章では、血液—脳関門の透過性を亢進させると言われている急性高血圧を実験的に作り出して、フロセミドの内耳毒性にもたらされる影響を観察した。

第4章 外リンパのフロセミド濃度とグリセロールの影響

目 的

以上の様にグリセロールの前投与やアンギオテンシンによる急性高血圧によって、フロセミドの内耳毒性が増強される事は明らかになった。この機序としては、血液—内耳関門のフロセミドに対する透過性の亢進が最も考えやすいが、フロセミドの排泄障害によっている可能性も否定出来ない。そこで本章では、血液中および外リンパ中のフロセミドの濃度を測定した。排泄障害によるものなら、フロセミドの血中濃度に差が出るであろうし、透過性の亢進によるものであれば、外リンパ中の濃度に差が出るであろう。フロセミド単独群とグリセロール併用群とを比較する事で、この機序を明らかにする目的で今回の実験を行った。

方 法

体重300~500g, プライエル反射正常なハー

今回はアンギオテンシンアミドを用いて急性高血圧を引起したが、この薬剤は体内で直ちにアンギオテンシンIIに変換され、末梢血管の平滑筋を直接収縮させて急激な高血圧を作り出す。脳血管にはあまり働かないので脳血管はむしろ拡張し、内皮細胞間の **tight junction** が開くだろうと考えて、血液—脳関門の透過性を亢進させる⁸⁾⁹⁾ とされている。

今回の実験では、アンギオテンシンは明らかにフロセミドの内耳毒性を増強しており、しかもその増強では血圧が高くなる程強い傾向にあった。アンギオテンシンの投与によって心拍数は増加し、血圧も上昇したが今回の投与量では死亡した動物はなくEPにも変化は見られなかった。濾過圧の上昇の為かあるいは **tight junction** が開いた為と思われるが、いずれにせよ、血液—内耳関門のフロセミドに対する透過性が亢進したと考えるのが、妥当と考えられた。

トレイ系のモルモット38匹を用いた。ネンブタール 25~30mg/kg 腹腔内投与後、局麻下に気管切開を行い人工呼吸器に接続した。第1章で述べた同様の動物固定法・全身状態の保全法を用いた。

動物は2群に分けフロセミド単独群とグリセロール併用群とした。薬剤投与法は第1章と同様にした。つまりフロセミド単独群にはフロセミドを2分間で投与し、グリセロール併用群では50%グリセロール 2 ml/kg 投与15分後にフロセミドを投与した。フロセミド投与量は40mg/kgと100mg/kgとした。

試料は血清・脳脊髄液 (CSF)・外リンパの3種とした。血清は頸動脈内留置カテーテルからヘマトクリット管を用いて、フロセミド投与後5, 15, 30, 45, 60分の5時点で採取し遠心分離後使用した。CSF は手術用顕微鏡下に先

端約 5μ のガラスピペットを用いて、脳槽より同じく 20, 40, 60 分後に約 5μ l 採取した。外リンパは 1 側耳からは 1 度だけの採取とし、左右の耳から同じく 15, 30, 60 分後の 3 時点の内 2 時点で約 5μ l 採取した。但しフロセミド 40 mg/kg 投与の場合に限ってはこの外リンパ・CSF 濃度が測定限界に近い為、最も濃度の高い投与 30 分後の 1 時点のみとした。外リンパは

やはり先端 5μ のガラスピペットで顕微鏡下に正円窓膜を穿刺して採取したが、その際正円窓膜が乾燥している事を確かめてから行った。各試料は測定前に顕微鏡下に調べ、血球の少しでも混入しているものは除外した。

これらの試料のフロセミド濃度を高圧液体クロマトグラフィー法により測定した。図 9 に今回の測定法の概略を、また図 10 に測定条件の詳細

図 9 血清・外リンパ・CSF のフロセミド濃度測定法

HPLC condition for Furosemide

Instrument	: Trirotor III with Uvidec-III (JASCO)
Detection	: 280nm
Column	: Chemcosorb® 5-ODS-H, 4.6φ X 150mm
Guard Column	: LiChrosorb RP-2, 4.6φ X 30mm
Recorder	:
Oven Temp	: 40°C
Mobile Phase	: 10mM Sodium Acetate (pH 7.2) : Methanol = 6:4
Standard	: External Standard
Calibration	: Peak Height
Retention Time	: 3.5~4 min

Assay Procedure

図 10 High Performance Liquid Chromatography 法の今回の測定条件

細を示す。

結 果

表4にフロセミド40mg/kg投与後の血清・外リンパ・CSFのフロセミド濃度を示した。血清濃度に差はなくCSF濃度はグリセロール併用群の方がやや高い傾向を示したが、外リンパ濃度はグリセロール併用群の方がフロセミド単独群より有意に高かった(危険率2.5%以下)。

表5にフロセミド100mg/kg投与後の血清・外リンパ・CSFの濃度を示した。いずれのフロセミド濃度にも5%以下の危険率では有意の差

は認められなかった。しかし、今回測定したフロセミド濃度の全データを、横軸に時間を取り縦軸に濃度をとってグラフで示した図11に見られる通り、○と●で示した血中濃度には両群に全く差をみとめなかったものの、□と■で示した外リンパ中の濃度はグリセロール併用群の方が高い傾向が認められた。CSF中の濃度も同様であった。図12に外リンパとCSF濃度だけを、平均と標準誤差で拡大して図示した。フロセミド投与後40分までは、グリセロール併用群の方が高濃度であった。

表4 成熟モルモットの両群におけるフロセミド40mg/kg投与後の血清・外リンパ・CSFの濃度(μg/ml)(平均±標準誤差)

時間 分	フロセミド単独群			グリセロール併用群		
	血 清	外リンパ	C S F	血 清	外リンパ	C S F
5	259±49.5 (n=3)	—	—	255±32.1 (n=3)	—	—
15	155±1.5 (n=2)	—	—	160±8.6 (n=4)	—	—
30	107±11.7 (n=3)	0.32±0.05* (n=5)	0.25±0.08 (n=3)	100±10.9 (n=3)	0.89±0.21* (n=3)	0.32±0.06 (n=4)
45	103 (n=1)	—	—	98±3.6 (n=2)	—	—

*は両者に有意の差がある事を示す。

表5 成熟モルモットの両群におけるフロセミド100mg/kg投与後の血清・外リンパ・CSFの濃度(μg/ml)(平均±標準誤差)

時間 分	フロセミド単独群			グリセロール併用群		
	血 清	外リンパ	C S F	血 清	外リンパ	C S F
5	412±27 (n=11)	—	—	458±37 (n=15)	—	—
15	388±30 (n=8)	1.64±0.49 (n=6)	—	328±27 (n=13)	6.23±4.15 (n=10)	—
20	—	—	3.49±0.95 (n=10)	—	—	9.97±3.82 (n=14)
30	272±32 (n=11)	2.07±0.33 (n=7)	—	238±32 (n=12)	6.38±2.77 (n=14)	—
40	—	—	2.99±0.83 (n=9)	—	—	12.69±8.46 (n=7)
45	275±26 (n=10)	—	—	225±28 (n=11)	—	—
60	171±26 (n=6)	4.49±1.29 (n=5)	4.26±0.9 (n=8)	192±19 (n=9)	3.69±1.16 (n=6)	3.37±1.27 (n=6)

考 按

これまで述べた様に、グリセロールによるフロセミドの内耳毒性の増強は、グリセロールによってフロセミドの体外への排泄が障害される

か、フロセミドの内耳への透過性が亢進するか、のいずれかによると考えられた。本章の実験では血中のフロセミド濃度には、フロセミド単独群とグリセロール併用群との間に全く差が

図11 血清・外リンパ・CSF のフロセミド濃度の経時変化 (100mg/kg投与時)

図12 外リンパ・CSF のフロセミド濃度の経時変化 (平均±標準誤差, 100mg/kg投与時)

なく、グリセロールがフロセミドの体外への排泄を障害しているとは考えられない。これに対して 40mg/kg 投与の場合にしか有意差は認められなかったものの、外リンパのフロセミド濃度はグリセロールを併用した方が高くなる傾向が認められ、グリセロールがフロセミドの内耳への透過性を亢進させていると考えられる。

はじめに述べた通り内耳には脳と同様血液—内耳関門の存在が考えられている¹⁾。しかし、その制御法に就いてはもとよりその性質に就いても、よく知られていないのが現実である。本論文では主に血液—内耳関門の制御法を探る事を目的として実験を行ったが、その判定の指標として内耳毒であるフロセミドを用いた。これはフロセミドの内耳毒性が、EPと言う内耳特有の電気現象の観察で容易に定量化できるからである。逆に内耳疾患の治療薬として今日用いられている薬剤の殆どが客観的に効果を判定できず、定量化が極めて困難である。

今回の実験からグリセロールはフロセミドの内耳への透過性を亢進させる事で、その内耳毒性を増強していると考えられるが、この様なグリセロールの影響が他の薬剤に対しても同様に見られる可能性もある。また今回の実験結果が、Rapoport ら⁸⁾⁹⁾が血液—脳関門に就いて報告しているのとはほぼ一致する事から、血液—内耳関門の性質は血液—脳関門のそれとかなり類似していると考えられ、これまでの血液—脳関門に就いての知見が、血液—内耳関門にも応用できる可能性も高いものと推測される。

全体のまとめ

はじめに述べた通り内耳には脳と同じ様に、血液—内耳関門の存在¹⁾²⁾が想定されている。この関門は内耳への障害物質の進入を阻止し、内耳を保護する機能を持っていると考えられる。しかし内耳疾患の治療に使用される薬剤の内耳到達をも、阻害している可能性がある。内耳疾患の治療、殊に薬物療法を行うに当たっては、この事に充分留意する必要がある。逆にこの関門の透過性を自由に制御できれば、薬剤の

内耳到達を促進させて良好な治療成績を上げる事も可能である。

今回の実験では定量化が容易であると言う事から、内耳毒であるフロセミドを用いて実験を行った。まず血液—脳関門の透過性を亢進させる⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾とされているグリセロール投与下、新生仔、急性高血圧下の諸条件を設定し、いずれの場合もフロセミドの通常の毒性が増強される事を明らかにした。特にグリセロールに就いては、それ自身に内耳毒性の見られない事、全身作用もさほど強くない事、フロセミド投与量とEP障害性との関係がフロセミド単独投与の場合と変りなく単に平行移動した形になっている(図3)事などから、はじめに予測した様にフロセミドの内耳への透過性を亢進させていると推測できた。

新生仔でのフロセミドの内耳毒性も成熟動物より強い事が今回の実験で確認できたが、この新生仔ではグリセロールの併用は、成熟動物の様にフロセミドの毒性を増強しなかった。この事から新生仔では、はじめに予測した通りフロセミドの内耳への透過性が高いたと考えられると同時に、グリセロールの成熟動物での毒性増強は、やはりフロセミドに対する血液—内耳関門の透過性を亢進させる事によっていると考えられた。

急性高血圧下でのフロセミドの毒性増強も以上の考えを支持する物であるが、グリセロールによるフロセミドの毒性増強が、血液—内耳関門の透過性亢進に基づくものかどうかを、更に確認する意味で外リンパ中のフロセミド濃度の測定を行った。この結果、フロセミドの血中濃度はグリセロールを併用してもしなくても全く変わりのない事、外リンパ中のフロセミド濃度はグリセロールを併用した方がフロセミド単独の場合より高くなる傾向が認められた。この結果から最後に残っていた可能性、つまりグリセロールがフロセミドの排泄を障害する事によって、その内耳毒性を増強しているのではないかと言う可能性が否定された。グリセロールは

はじめに予想した通り、フロセミドに対する血液一内耳関門の透過性を亢進させる事によって、その内耳毒性を増強していると考えられた。

本論文ではフロセミドと言う内耳毒を用い、グリセロールを中心としてその内耳到達を促進する方法に就いて実験した。従ってこれらの方法をそのまま内耳疾患の薬物療法に応用する事はできないが、その可能性はあると考えられる。

総 括

血液一内耳関門の性質とその制御法を探るためフロセミドのEP障害性を指標として実験を行い次の結果を得た。

①グリセロールはフロセミドの内耳毒性を増強する。

②新生仔ではフロセミドの内耳毒性は成熟動物より強く見られ、この毒性はグリセロールの影響を受けない。

③アンギオテンシンによる急性高血圧はフロセミドの内耳毒性を増強する。

④グリセロールの前投与によってフロセミドの血中濃度は影響を受けないが、外リンパ中のフロセミド濃度はCSFの濃度と同様高くなる傾向がある。

以上からグリセロールはフロセミドに対する血液一内耳関門の透過性を亢進させていると考えられた。従って新生仔やアンギオテンシンによる高血圧下でも血液一内耳関門の透過性が亢進している可能性がある。

稿を終わるにあたり、御校閲を賜った京都大学耳鼻咽喉科学教室本庄 巖教授に深謝いたします。また、本研究に御助言、御協力いただいた大阪医科大学牧本一男助教授、京都大学八木伸也助教授、並びに京都大学薬剤部奥村勝彦助教授、神谷 晃助手に感謝致します。

本論文の要旨は、第19回、第21回 Workshop on Inner Ear Biology, 及び第13回、第14回日本基礎耳科学会に於いて口演した。

参考文献

- 1) Jahnke K: The blood-perilymph barrier. Arch Otorhino Laryngol 228: 29~34, 1980.
- 2) Juhn SK and Rybak LP: Labyrinthine barriers and cochlear homeostasis. Acta Otolaryngol 91: 529~534, 1981.
- 3) Brusilow SW: Propranolol antagonism to the effect of furosemide on the composition of endolymph in guinea pigs. Can J Physiol Pharmacol 54: 42~48, 1976.
- 4) Rybak LP, Juhn SK, Morizono T, et al: Elimination kinetics of furosemide in perilymph and serum of the chinchilla (neuropharmacologic correlates). Acta Otolaryngol 88: 382~387, 1979.
- 5) Mathog RH, Thomas G and Hudson WR: Ototoxicity of new and potent diuretics. Arch Otolaryngol 92: 7~13, 1970.
- 6) Kusakari J, Ise I, Thalmann R, et al: Effect of ethacrinic acid, furosemide and ouabain upon the endolymphatic potential and upon high energy phosphates of the stria vascularis. Laryngoscope 88: 12~37, 1978.
- 7) Pike DA and Bosher SK: The time course of the stria changes produced by intravenous furosemide. Hearing Res 3: 79~82, 1980.
- 8) Rapoport SI, Hori M and Klatzo I: Testing of a hypothesis for osmotic opening of the blood barrier. Am J Physiol 223: 323~329, 1972.
- 9) Rapoport SI: The cerebral vessel wall. pp 215~223, Raven Press, New York, 1976.
- 10) Braun LD, Cornford EM and Oldendorf WH: Newborn rabbit blood-brain barrier is selectively permeable and differs substantially from the adult. J Neurochemistry 34: 147~152, 1980.
- 11) Duvall III AJ, Santi PA and Hukee MJ: Cochlear fluid balance-A clinical/research overview. Ann Otol Rhinol Laryngol 89: 335~341, 1980.

（原稿採扱：昭和62年7月31日
別刷請求先：大村正樹
〒606 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学医学部耳鼻咽喉科学教室）