内耳内・外リンパ液の循環代謝動態†

——水素クリアランス法による同時測定——

第1編 内・外リンパ液の循環代謝動態の差及びフロセマイドの影響

木村 正・竹田 泰三・鎮西 邦彦
岸本 誠司・齋藤 春雄*

緒言

内耳内・外リンパ液はおのおの独立した系を持っている。そして、内耳血流による影響やその産生及び吸収の経路すなわち内・外リンパの TURN OVER,あるいは内リンパ液の特異な電解質濃度を維持するための能動輸送などの循環代謝動態については、メニエール病などの内耳病態生理を解明するに重要であるにもかかわらず不明な点が多い。組織循環代謝動態を知るには、従来よりボーラログラフの原理にもとづく水素クリアランス法がある。この方法は、測定電極を比較的細く出来る為、測定する組織に過大な侵襲を加えることなく、内耳の様な小組織でも数カ所の部位に電極を穿刺可能で、異なる部位の循環代謝動態を同時に計測、比較できる利点を持つ。しかし、水素クリアランス法による組織循環の測定は、脳血流や心臓、筋、皮膚等の測定が中心で、内耳循環に関しては、加藤ら¹⁾がモルモットの外リンパを北野²⁾³⁾がモルモットの内リンパ及び一部の外リンパを、Sandor ら⁴⁾が犬及び猫の外リンパを、Maass ら⁵⁾⁶⁾がモルモット及び猫の内リンパを測定した報告があるのみで、内・外リンパ液の循環代謝動態を同時に観察比較した報告はない。また、薬剤負荷の影響も Maass ら⁶⁾や北野³⁾が行っているが、すべて単独の測定系で行っているに過ぎず、内・外リンパ液の循環代謝動態を比較検討した報告はない。このため我々は2チャンネルの水素クリアランス式組織血流計を用いての内・外リンパ液の循環代謝動態の同時測定を行った。同一の測定系を二つ用

いて同時に内・外リンパの水素クリアランスを測定すればより多くの情報を得られるものと思われる。

実験方法

1) 実験動物及び手技 (図1)

実験には体重 245 g—460 g 平均 362 g の白色モルモットを使用した。硫酸アトロピン処置後ネブタール腹腔内及びキシロカイン局所麻酔を用い気管切開を施し、筋弛緩剤で動物を不動化の下に、シナノ製作所製レスピレーターにて、ルームエアー 3.0 cc/回、50回/分で呼吸管理した。なお、右側の頸静脈には薬剤負荷のため、カテーテルを挿入して血管を確保し、また頸部食道には経管栄養のためビニールチューブを留置した。動物を頭部固定器に固定したのち、左側耳介後縁切開より中耳骨胞を開放し、蝸牛全回転を露出した。さらに、顕微鏡下に耳小骨を除去し卵円窓、正円窓を明視下に置くと同時に、蝸牛基底回転中央階骨壁に微小ダイヤモンドバーで小孔を作成した。水素クリアランス測定用の関電極はユニークメディカル社製先端径30ミクロンの特製微小針電極を用い、測定に先立ち予め生理食塩水内で水素ガスへの電極感度を測定し、電極不良による計測値のバラツキを極力避けた。関電極の挿入は、内リンパ腔には蝸牛基底回転中央階骨壁に作成した小孔より、外リンパ腔には

図1 実験のブロックダイアグラム

†Dynamic Metabolism of Endolymphatic and Perilymphatic System in the Inner Ear—Simultaneous Measurement of Hydrogen Clearance—Chapter 1 : Metabolic Difference Between the Endolymphatic and Perilymphatic System, and Effect of FURO-SEMIDE

*Tadashi Kimura, Taizo Takeda, Seiji Kishimoto, Kunihiro Chinzei and Haruo Saito

**高知医科大学耳鼻咽喉科学教室

正円窓より、マイクロマニピュレーターを用いて行なった(図2A, B)。不関電極としてはペーストをつけた銀塩化銀電極を頭頂部皮下筋層内に留置して、共用した。なお、内リンパ腔に電極を挿入時、キクスイ社製ロッキングメーターを用いて内リンパ腔の関電極と不関電極間のDC電位を測定し、電極が内リンパ腔に挿入されていることを確認した。電極を挿入後、リンパ液の漏出を避けるため両電極穿入部位を溶かした寒天で密封し、

更に電極の動きによるアーチファクトを避けるため歯科用セメントで電極をモルモットに固定すると同時に中耳骨胞を密閉し、正円窓経由の水素ガスの拡散を防いだ。挿入・固定が完了した関電極と不関電極は、エム・ティ技研社製2チャンネルの水素クリアランス式組織血流計DHM-3001に接続し、グラフテック社製2チャンネルサーボコーダーで水素クリアランス曲線を記録した。接続する水素クリアランス式組織血流計のチャンネルは、

A. 太矢印は正円窓細矢印は基底回転中央階骨壁に作成した小孔を示す

B. 矢印は挿入した2本の電極を示す

図2 モルモット蝸牛

図3 無負荷時

図4 薬剤負荷時

図5 自家製ソフトによる水素クリアランス曲線の分析

機械差による測定値の偏りを避けるため、適時交換した。水素ガスの負荷は、水素クリアランス式組織血流計のゼロ点が十分安定したところで人工呼吸器より約10%水素ガスを3分前後負荷し、組織水素濃度が水素クリアランス曲線を得るに十分上昇したところで、水素ガスの吸入を停止した。動物は、実験中、携帯用カイロにて保温に務め、食道留置チューブよりは必要に応じて水分の補給をした。また、水素クリアランス曲線の測定中は、全例、心電図をFUKUDA社製心電計で測定し三栄社製ペンオシログラフに出力して心拍数を記録観察した。無負荷の場合は、水素ガス吸入停止後水素クリアランス曲線が十分安定して下降し始めてから10分毎に30分間の水素クリアランス値を求めた(図3)。フロセマイド負荷の場合は同様に下降し始めてから10分後に頸静脈留置

カテーテルよりフロセマイド 50 mg/Kg をテルモ社製シリンジポンプにて2分間で注入し、フロセマイド負荷前10分間の水素クリアランス曲線は、投与前として水素クリアランス曲線分析時に比較対照として用いた。その後の20分間の平均を投与後とした(図4)。

2) 水素クリアランス曲線の分析法

記録したクリアランス曲線は、グラフテック社製デジタルタイザー MITABLET-II で読み込み、日本電気製パーソナルコンピュータ PC9801UV2 上の自家製ソフトでクリアランス曲線の分析を行なった(図5)。この自家製ソフトは N88 日本語 BASIC MS-DOS 版 (ver. 3.10) で作成されており、データ入力部とデータ分析部の2つより成り立っている。データ入力部では、デジタルタイザー上に記録用紙を置いてまずベースラインを両端2カ所をプロットして決めその後クリアランス曲線を任意の間隔でプロットしていくと、ディスプレイ上にそのカーブが描出される。最後にファイル各をつけてデータディスクに保存する。この際ベースラインの補正も可能である。データ分析部では、保存したファイルを読み出し元のクリアランス曲線と、その片対数変換曲線及び片対数変換曲線より最小二乗法で求めた回帰直線がディスプレイ上に表示される。さらに、この回帰直線よりクリアランス曲線の半減期 $T_{1/2}$ (分) と、回帰係数、その 95%信頼区間及び一次回帰項の有意検定用 F_s を算出する。これらのデータはファイル名やプロットしたポイント数などと共にプリンターに出力される。水素クリアラ

NON-TREATED

図6 薬剤処置なしの内耳内・外リンパ液の半減期

フロセマイド 50 mg/kg

図7 薬剤負荷前後の内耳内・外リンパ液の半減期

ンス曲線が monoexponential か polyexponential かの判定は、ディスプレイ上のクリアランス曲線の片対数プロットの形からも予測できるが、一次回帰項の有意検定で行ない得る。

成 績

内リンパ電位 (Ep) は、70 mV 以上を目安とした。

心拍数は180—296平均 228/min 程度で、個体間、術中共に多少の変化はあったが、水素負荷やフロセマイド投与で特に変動するような事はなかった。水素クリアランス曲線の記録は無負荷動物25匹、フロセマイド負荷動物20匹について行なったが、Ep が不良で内リンパ腔にうまく挿入できていないと考えられるものや、心拍数が150/分以下の場合、電極の不良や固定が不完全でクリアランス曲線が安定しなかったものは、実験対象より除外した。

無負荷動物では、実験対象となった10例の、薬剤処置なしの内耳内・外リンパ液の水素クリアランス曲線はすべて monoexponential であり、半減期 $T_{1/2}$ につき比較検討したところ、測定した10分毎の値は内・外リンパ液とも同一のリンパ液間ではほぼ等しく、各々の間で有意差はなかった。そして、内リンパ液の $T_{1/2}$ と外リンパ液の $T_{1/2}$ は、対応する10分毎の値同志ですべて両側1%の危険率で有意差があり、内リンパの方が半減期が長く循環代謝が良好であった(図6)。

薬剤負荷動物でも10例のフロセマイド投与例では、負荷後のクリアランス曲線はすべて monoexponential であり、20分間の平均を投与後の値とした。内・外リンパ液とも投与前後で、片側5%の危険率でも有意差はなかった(図7)。また投与前及び投与後の内・外リンパ液では、処置なしと同じく、両側1%の危険率で有意差があり内リンパの方が良好であった。

考 按

メニエール病の原因と考えられる内リンパ水腫の成因については内耳循環代謝の障害が有力視されている。しかし内耳循環代謝の測定は、内耳が骨迷路に包まれ骨迷路と膜迷路間に血流が無く、それぞれの血管系が異なるという解剖学的制約もあり十分に検討はされていない。又測定方法もまちまちである。現在はマイクロスフェア法、水素クリアランス法、レーザードップラー法等が主流と思われる。マイクロスフェア法は優れた方法であるが経時的観察は無理である。レーザードップラー法はまだプローブが大きく、光の干渉もあり、内・外リンパ液の同時測定は困難である。このため我々は水素クリアランス法を使用した。この方法では、その系が、1) 動脈血と静脈血の血流量が等しくかつ一定であること。2) indicator が組織内で代謝されず組織内濃度と静脈内濃度とが平衡し wash out は静脈血のみによること。3) 組織内の血流分布が一定の事。等の条件を満たす必要がある⁷⁾。我々は、内・外リンパ液の循環代謝を考えているが、これらはおもに内耳血流によっており turn over も脳脊髄液を介して最終的には動静脈によっておりこれらの条件を満たすものと考えた。一つずつ考えて

みると、このうち3)は組織ではないが内・外リンパ液を個別に測定しているため、問題はない。2)は水素ガスでは拡散係数が大かつ血液ガス分配係数が小のため一応問題はない。もちろん wash out は正円窓、ライスネル膜を介してや髄液腔へ拡散すると思われる。正円窓は寒天で密封しておりライスネル膜は介しての拡散は、我々の場合内・外リンパ液の循環代謝の絶対値でなく差を見ているため相殺され一応無視して良いと考えた。又髄液腔への拡散は蝸牛小管を介するため通常は少ない考えた。1)は、循環代謝の差特に薬剤負荷前後を同一系で比較するのには問題となりそうである。しかし一般に組織では大きなジャントでも無い限りこの条件は満たされ、内耳の場合も内耳血流をはじめ内・外リンパ液の turn over や能動輸送などは水腫でもない限りこの条件を満たしていると考えた。又薬剤負荷例も、フロセマイドは効果発現時間が短かく⁸⁾、同一系で処置前後を別々に測定しているがまず問題はない。精度や再現性も問題無いとされている⁹⁾。特に我々の場合は前述の如く絶対値でなく各々の有意差を比較しているためこれらの事が問題になりにくいと考えられる。

クリアランス曲線はすべて monoexponential として計算し、負荷動物では前後を比較した。これは、前述の如くコンピューター処理時の片対数プロットの形が視覚的にも一本の直線で、一次回帰項の有意性の検定でも計算されたFsが、危険率0.1%のF値より十分大きい等が判定できた。さらに無負荷動物10例の10分毎30分間の値はバラツキが少なくすべての間に有意差もなかった。さらにより長時間にわたり検討した無負荷動物及びフロセマイド負荷後のすべてが monoexponential でもあった。文献では臓器によりこれらの比率が異なるとされ、心臓や骨格筋では monoexponential が、脳では biexponential が多いとされている¹⁰⁾。内耳に関しては、加藤¹⁾、Maass⁵⁾⁶⁾ が monoexponential 北野²⁾³⁾ が 5 : 1 で monoexponential が多かったとしている。我々はさらに正円窓を密閉するなどの工夫を凝らした事等よりも、我々の処理は正しかったと考えられる。

さて我々の結果では内リンパの方が半減期が短く循環代謝が良好であった。この事より、内・外リンパ腔の循環代謝系は全く別である事がこの方法からも分かる。外リンパ灌流実験が示す如く内リンパの循環代謝は外リンパによるところが大であるが¹¹⁾、解剖学的に腔が外リンパ腔の1/10と小さい割に血流が豊富な血管条がある内リンパの方が相対的に循環代謝が良く、やはり血流の影響が大きいものと考えられた。フロセマイドはループ利尿剤の1つで、内耳の循環代謝に対し血管条でのNa⁺、K⁺の能動輸送を抑制して内リンパ電位を低下させる影響を

与える⁸⁾。しかし内リンパ電位を低下させるに十分な量のフロセマイドを投与しても、投与前後で内・外リンパ液の半減期の比率が変わらず有意差も同じ事から、フロセマイドは内・外リンパ液の循環代謝動能には影響を与えていないと考えられた。

総 括

2チャンネルの水素クリアランス式組織血流計を用いて内耳内・外リンパ液の同時測定を試みた。内リンパの循環代謝は外リンパに比べ有意に良かった。フロセマイド投与では、これらの関係に変化はなく、内耳の循環代謝には影響を与えないと考えられた。

文 献

- 1) 加藤風志, 他: 水素クリアランス法による蝸牛血流量の測定. Ear Res Jpn 12: 1-3, 1981
- 2) 北野 仁: メニエール病の内耳血流量に関する実験的研究. 耳鼻臨床76: 2761-2794, 1983
- 3) 北野 仁: メニエール病の内耳血流量に関する実験的研究(続)第3編内リンパ嚢開放・薬剤投与による内耳血流量の変化. 耳鼻臨床 78: 1615-1626, 1985
- 4) Sandor P, et al: Cochlear blood flow during stepwise bleeding and CO₂ inhalation in the anaesthetized dog and cat. Acta Physiol Hung 62: 217-224, 1983
- 5) Maass B, Kellner J: Hydrogen Clearance and Cochlear Microcirculation at Different Levels of Blood Pressure. Arch Otorhinolaryngol 240: 295-310, 1984
- 6) Maass B, Ludwig D: Effect of pentoxifylline (Trental) on cochlear blood flow as measured by hydrogen wash-out. Curr Med Res Opin 9: 52-55, 1984
- 7) Aukland K, Bower B F and Berliner R W: Measurement of local blood flow with hydrogen gas. Cir Res 14: 164-187, 1964
- 8) 草刈潤, 神林潤一, 伊勢郁夫, 他: 利尿剤による難聴に関する基礎的研究. Audiology Japan 21: 117-122, 1978
- 9) Young W: H₂ clearance measurement of blood flow: A review of technique and polarographic principles. Stroke 11: 552-564, 1980
- 10) 重松 宏, 堀江良秋, 佐藤正典, 他: 水素ガスクリアランス法. 呼と循28: 993-997, 1980
- 11) Butler R A, Honrubia V, Johnstone B M, et al: Cochlear function under metabolic impairment. Ann Otol Rhinol Laryngol 71: 648-656, 1962

Abstract

H₂ clearance in the endolymphatic and perilymphatic systems of the inner ear was measured simultaneously with a bi-channel hydrogen clearance monitor. Two special hydrogen-sensitive microelectrodes were applied to a small hole made in the stria vascularis and round window. All H₂ clearance curves revealed monoexponential functions. The half life times ($T_{1/2}$) of both endolymphatic and perilymphatic H₂ clearances of 10 guinea pigs were examined in order to study these metabolic differences. The half life time of the endolymph was significantly shorter than that of the perilymph in non-treated animals. The influence of furosemide was also examined. The half life time of

H₂ clearance in 10 guinea pigs was not significantly different before and after the infusion in either the endolymph or the perilymph. A personal computer (NEC PC-9801) and soft ware made by ourselves used to analyze these data.

Key words: Hydrogen Clearance, Endolymph and Perilymph, Furosemide

(原稿到着：昭和63年5月16日
別刷請求先：木村 正
〒781-51 高知県南国市岡豊町小蓮
高知医科大学耳鼻咽喉科学教室)

<