内耳内・外リンパ液の循環代謝動態†

第3編 レーザードップラー法での測定

——浸透圧利尿剤の影響——

木村 正・竹田 泰三・齋藤 春雄

緒 言

第2編¹⁾では、内・外リンパ液の水素クリアランス同時計測法により、浸透圧利尿剤が及ぼす内・外リンパ液の循環代謝動態への影響を検討した。この計測法によりグリセロール負荷では、内・外リンパ液とも水素クリアランスの半減期に短縮がみられ循環代謝動態が亢進するが、その傾向は外リンパ液でより著明であることを明らかにした。又、ウレア負荷でも外リンパ液の半減期が有意に短縮した。水素クリアランスの半減期短縮は一般に組織血流の増大を反映すると考えられ、この場合も浸透圧利尿剤が持つ蝸牛血流の増大が相当部分関与していると推測された。しかし、その体積に比して血管系の乏しい外リンパ液でより水素クリアランスの半減期が短縮するのは、外リンパ液の turn over も一部関与している可能性もある。一方、マンニトールはグリセロールやウレアと同様に浸透圧利尿作用を持つが、内・外リンパ液の水素クリアランスには有意の影響を与えなかった。この事実は、マンニトールもグリセロール、ウレアと同等の蝸牛血流改善効果を持つとする Microsphere 法による成績²⁾と必ずしも一致しない。しかし、Microsphere 法は Microsphere の内耳微細血管での取り込みを指標として間接的に蝸牛血流を評価する方法で、血球量 (Volume)、血流速度 (Velocity) などの個々の情報は得られず、又測定値も実験動物が sacrifice される瞬間での血流量で経時の変化を知ることは出来ない。よって、従来の Microsphere 法で知られている情報を水素クリアランス法で得た成績に直接対比するのは問題が多い。本稿では、蝸牛血流をより直接的に計測できるレーザードップラー法を用いて水素クリアランス計測実験と同一の条件で3種の浸透圧利尿剤が蝸牛血流に及ぼす影響を測

定、分析し、水素クリアランス法で得た半減期の短縮に蝸牛血流変化が如何に関与しているか検討した。

実験方法

実験方法のブロックダイアグラムを図1に示す。実験の大略はレーザードップラー法による蝸牛血流の計測、記録部分と、得られた測定値の分析部分に大別される。以下実際の実験手技とデータ分析法について述べる。

1) 実験手技

実験はブライエル反射正常の体重 275g~500 g 平均

図1 実験のブロックダイアグラム

図2 モルモット蝸牛
太矢印は正門窓、細矢印はプローブを示す。

†Dynamic Metabolism of Endolymphatic and Perilymphatic Systems in the Inner Ear
Chapter 3: Measurement by Laser Doppler Method
—Effects of Hyperosmolar Solutions—
Tadashi Kimura, Taizo Takeda and Haruo Saito
高知医科大学耳鼻咽喉科学教室

355 g の白色モルモット 26 匹を用い、全てネブタール腹腔内注射による全身麻酔下で 0.5 % キシロカインによる局所麻酔を併用の上、人工呼吸器による呼吸管理下で行なった。実験動物には、第 1 編³⁾ 第 2 編¹⁾ に記したように右側頸静脈に薬剤負荷用ポリエチレンカテーテルを、さらに食道内に水分補給用カテーテルを留置した。しかるのち、左側中耳骨胞を型の如く開放し、蝸牛を明視下に置く。本実験ではレーザードップラー測定端子を蝸牛骨胞に密着させて蝸牛血流を測定する必要上、蝸牛基底回転中央階の粘膜を十分除去後血管条骨壁をナイフにて削り平滑化し、かつ菲薄化した骨壁を通して血管条が透見出来るようにした。用いたレーザードップラー血

流計は TSI 社製 Laser-flo BPM 403 レーザードップラー微小循環血流計で、尖端径 0.8 mm のニードルプローブをマニピュレーターにより上述した基底回転中央階の血管条骨壁に密着させた (図 2)。なお、プローブと骨壁間の間隙に血液や滲出液が進入、付着して血流測定に悪影響を与えぬように、術野は十分止血すると同時に光学顕微鏡用エマルジョンオイルを測定端子先端に滴下した。蝸牛血流の記録はレーザードップラー血流計の血流量 (Flow), 血球量 (Volume), 血流速度 (Velocity) の 3 パラメーターの 5 秒間毎の平均値をグラフテック社製 Multicorder MC 6625 に出力して行なった。薬剤負荷は投与前の測定値が十分安定した事を確認後、右側頸

表 1 薬剤投与条件

なお各浸透圧利尿剤間では浸透圧は等価としてある。

TREATMENT	DOSAGE	INFUSION TIME	NUMBER OF ANIMALS
40% GLYCEROL	2.4mL/kg	6min.	6
20% MANNITOL	10.0mL/kg	10min.	6
6.5% UREA	10.0mL/kg	10min.	6
0.9% SALINE	2.4mL/kg	6min.	6

図 3 レーザードップラー曲線 sampling の模式図
薬剤投与前10分間と投与終了 5 分後よりの10分間を比較した。

静脈留置カテーテルよりシリンジポンプにて注入した。投与薬剤は、浸透圧利尿剤としてはグリセロール、マンニトール、ウレアを、コントロールとしては生理食塩水を用い、薬剤投与量、投与時間等の投与条件は第2編¹⁾と同一とした(表1)。なお、蝸牛血流計測中はレーザードップラー血流計への光の影響を避けるため手術顕微鏡の光源は消し、各負荷実験終了後は2分間窒息負荷により anoxia に特徴的な蝸牛血流変化⁴⁾⁵⁾が記録できるのを観察して、レーザードップラー血流計が正常に作動している事を確認した。又、実験中は全例携帯用カイロで実験動物の体温が 37°C 前後になるよう保温すると同時に、心電図もモニターした。

2) 記録データの分析法

データ分析に供された記録データは、水素クリアランス計測実験との対応のため記録されたデータの内投与前として薬剤投与前10分間を、投与後としては薬剤投与終了5分後より10分間とし、この投与前・後の10分間の平均血流量 (Flow), 平均血球量 (Volume), 平均血流速度 (Velocity) を求めて比較検討した(図3)。記録データの分析は、水素クリアランス計測実験と同様ディジタイザーでデータを A/D 変換して読み込み、パーソナルコンピュータ (NEC PC-9801) 上の自家製ソフトによって

図4 自家製ソフトによるレーザードップラー曲線の分析

行なった。即ち、ディジタイザーでまずレーザードップラー血流計の記録データの基線を2ポイント読みとり0点を定め、その後分析する10分間のデータを20秒間隔で30ポイントを入力する。データ入力のつど入力ポイントはディスプレイ上に表示されると同時に、入力された時点までのデータの平均値が平均直線として重ね合わせて表示される(図4)。処理されたデータは、データ数、

図5 各浸透圧利尿剤投与時の蝸牛平均血流量の経時的变化

平均値と共にデータファイルに保存され、随時読みだし可能である。これらのコンピュータ処理は MS-DOS 上でなされているので市販ソフトへのデータの移行が容易で、集計グラフ化には Lotus 1-2-3 (ロータス) を、統計処理には STAX (中山書店) を使用した。

成 績

第1編³⁾、第2編¹⁾と同様に心拍数が 150/min. 以下を示したものの、及びレーザードップラー血流計の計測が安定しなかったものは対象外とした。よって、26匹の実験動物中、グリセロール投与動物 6 匹、マンニトール投与動物 6 匹、ウレア投与動物 6 匹、及び生理食塩水投与動物 6 匹が上記条件を満足した。これら 24 匹の実験動物では、心拍数は薬剤負荷で大きく変動することはなかった。

グリセロール、マンニトール、ウレア投与動物及び生理食塩水投与のコントロール動物、各 6 匹の蝸牛血流量の平均値及び標準偏差の経時変化を図 5 に示す。蝸牛血流量は、これら 3 種の浸透圧利尿剤中グリセロール投与で最も顕著な変化が認められた。即ち、グリセロール投与動物 6 匹の蝸牛血流量の平均値は、グリセロール投与開始より徐々に増大傾向を示し投与終了時に投与前の 134% と最大値を示す。その後漸減するが投与終了 5 分前後より一定化し、投与前の約 120% を 20 分以上維持した (図 5a)。これを投与前後の 10 分間の平均血流量 (F) でみると投与前に比べて 1.06 から 1.63 倍、平均で 1.19 倍となり、危険率 2% で有意に血流量が増加した。平均血流量 (Vo) も、投与前と比較して平均 1.06 倍となるが、統計的には有意差がなかった。一方、平均血流速度 (Ve) はグリセロール投与前に比べ平均で 1.10 倍となり、危険率 2% で有意に血流速度の増大を見た (表 2)。マ

ニトール投与でも、グリセロール投与に次いで蝸牛血流量の増大を見た。6 匹のマンニトール投与動物の蝸牛血流量の経時変化にみるように、血流量の平均値は薬剤投与開始 6 分から 9 分の薬剤投与中に既に薬剤投与前値の 123% に達した。その後、幾分漸減するものの薬剤投与終了 5 分後より 110% 前後の値に落ちつき、経過観察中はほぼこの値が維持された (図 5b)。これを、投与前・後の 10 分間の平均血流量 (F)、平均血流量 (Vo)、平均血流速度 (Ve) でみると、平均血流量は投与前後で 1.01 から 1.22 倍平均 1.09 倍となり、危険率 5% で有意に増大した。同様に、平均血流量も投与前と比べて平均 1.07 倍となり危険率 5% で有意差があったが、平均血流速度は投与前に比べ平均 1.03 倍となり、投与前後で有意差はなかった (表 2)。

一方、ウレア投与では、ウレア投与中に一過性の蝸牛血流量の増大がみられたが、投与終了 5 分後にはすでに投与前の値に戻り、その後著明な変化は示さなかった (図 5c)。平均血流量 (F) でも投与前に比較して 0.97 から 1.04 倍、平均 0.97 倍と、投与前後で有意の変化は認められなかった。又、平均血流量 (Vo)、平均血流速度 (Ve) も投与前後でそれぞれ平均 0.95 倍、1.01 倍で、統計的にも有意差は認められなかった (表 2)。

なお、生理食塩水投与動物でも、生理食塩水投与によると思われる蝸牛血流量の増大が軽度ではあるが見られた (図 5d)。しかし、この血流量増大は投与終了 5 分後には消失し、平均蝸牛血流量 (F)、平均血流量 (Vo)、平均血流速度 (Ve) の投与前・後の比較でもそれぞれ 0.99 倍、1.01 倍、0.99 倍で、有意の差は認められなかった (表 2)。

表 2 各浸透圧利尿剤投与前後の血流量(F)、血流量(Vo)、血流速度 (Ve)の比較

	GLYCEROL	MANNITOL	UREA	SALINE
$\frac{F(AFTER)}{F(BEFORE)}$	1.19** (1.60-1.63)	1.09*** (1.01-1.22)	0.97 (0.92-1.04) (N.S.)	0.99 (0.90-1.04) (N.S.)
$\frac{V_o(AFTER)}{V_o(BEFORE)}$	1.06 (0.98-1.22) (N.S.)	1.07*** (1.01-1.10)	0.95 (0.89-1.05) (N.S.)	1.01 (0.96-1.05) (N.S.)
$\frac{V_e(AFTER)}{V_e(BEFORE)}$	1.10** (1.02-1.34)	1.03 (0.97-1.15) (N.S.)	1.01 (0.92-1.12) (N.S.)	0.99 (0.86-1.04) (N.S.)

** : $p < 0.02$

*** : $p < 0.05$

考 案

レーザードップラー法は、従来から用いられている水素クリアランス法や Microsphere 法などによる血流測定法と異なり、蝸牛に損傷を与えない生理的な条件下で実時間により内耳微小循環血流の経時変化を観察出来る利点があり、内耳関係でもすでに多くの報告がみられる^{4)~15)}。レーザードップラー法による血流測定の原理は、組織に照射されたレーザーの散乱光の一部が赤血球の動きによりドップラー偏位が生じる事を利用して、血流量 (Flow) は、このドップラー偏位量によって得られる情報量である血球量 (Volume) と血球速度 (Velocity) の積で求められる。よって、従来の Microsphere 法や水素クリアランス法によっては得られない血球量や血球速度の情報が得られ、より詳細な血流動態が分かる。しかし、この方法によって求められる値も従来法と同様原理的には相対数で、一般組織で測定する場合は実測値より血流絶対値に換算する方法もあるが、組織構造が大きく異なる内耳ではこの換算法は必ずしも適用できない。このため本編でも一般に行なわれているように、薬剤負荷前を 100 % とした相対的变化によって測定値の分析を行なった。浸透圧利尿剤の蝸牛血流量に及ぼす影響はグリセロールが著明で投与前後で 119 %, 次いでマンニトールが 109 % と共に蝸牛血流量の増大を見た。一方、ウレア投与は、レーザードップラー法で見る限り蝸牛血流量に明確な変化を与えなかった。薬剤の投与方法及び投与量は異なるが、グリセロールやマンニトールが蝸牛血流を一過性に改善させることは既にこのレー

ザードップラー法⁷⁾¹⁴⁾ や Microsphere 法²⁾ でも確認されている。しかし、投与薬剤の浸透圧をほぼ等価にした今回の実験より、蝸牛血流量の改善効果はグリセロール、マンニトール、ウレアの 3 種の浸透圧利尿剤中、グリセロールが最も強いことが分かった。ただ、ウレアで蝸牛血流量の改善が認められなかったのは Microsphere 法による成績と矛盾する。これは、一つに Microsphere 法とレーザードップラー法とでは血流の測定領域の相違があることも関係していると考えられる。又、グリセロール、マンニトール、ウレアで還流中の迷路動脈の平滑筋の筋緊張を計測した in vitro の実験¹⁶⁾ では、迷路動脈の反応はウレアでは少し異なり一過性に弛緩・拡張したのち収縮反応を示すと云う。よって、ウレアの蝸牛血流の増大効果は、レーザードップラー法の成績に見るようにグリセロール、マンニトールと比較すると弱い事が予測される。さらに、蝸牛血流量の増大現象も、グリセロールでは血流速度の増大によってマンニトールでは血球量の増大によって主にもたらされた。この様に同じ浸透圧利尿剤にでも、薬剤間で蝸牛に及ぼす効果は幾分異なる可能性が示唆される。

このレーザードップラー法による成績を以前我々が計測した水素クリアランス法の成績と対比すると (表 3)、水素ガスの wash out の早さを表わす薬剤負荷前後の水素クリアランスの半減期の逆数の比は、概してレーザードップラー法で得た薬剤負荷前後の蝸牛血流量の比より高い傾向を持つ。特に、グリセロール、ウレア負荷での外リンパ液でその傾向が著明であった。レーザードップ

表 3 各浸透圧利尿剤投与前後の血流量と半減期の比較

		GLYCEROL	MANNITOL	UREA	SALINE
レーザードップラー					
$\frac{F(AFTER)}{F(BEFORE)}$	蝸牛血流量 (n=6)	1.19 **	1.09 ***	0.97 (N.S.)	0.99 (N.S.)
水素クリアランス					
$\frac{T_{1/2}(BEFORE)}{T_{1/2}(AFTER)}$	PERILYMPH	2.32 *	1.14 (N.S.)	1.34 **	1.11 (N.S.)
	ENDOLYMPH (n=10)	1.55 *	1.16 (N.S.)	1.17 (N.S.)	1.17 (N.S.)

*: $p < 0.01$

**: $p < 0.02$

***: $p < 0.05$

ラー法は、その原理からして水素クリアランス法より血流変化をより直接的に測定し、その測定領域はプローブ直下のラセン靱帯、血管条の血流以外により深部の血流もある程度含んだ平均的蝸牛血流を反映していると考えられる⁸⁾¹²⁾が、今回の実験結果から考えて、グリセロール、ウレア負荷では外リンパ液の水素ガスは蝸牛血流のみを介して wash out されたとしては説明できず、外リンパ液の産生・吸収を介した wash out もある程度関与したものと思われる。

なお、レーザードップラー法でグリセロールに次いで血流改善効果を示したマンニトールは、水素クリアランス法では外リンパ液に於いても半減期に著明な影響を与えなかった¹⁾。

結 語

レーザードップラー血流計を用いて浸透圧利尿剤であるグリセロール、マンニトール、ウレア投与における蝸牛血流測定を試みた。グリセロール、マンニトールでは蝸牛血流は増加し、ウレアでは増加しなかった。これは以前我々が行なった水素クリアランス法の実験結果¹⁾とは一致しないが、水素クリアランスが蝸牛血流のみでなく内耳リンパ液の turn over を含めた内耳循環代謝動態を反映していると考えれば、2つの実験成績の違いはよく説明できると推論した。

本論文の要旨は第47回日本平衡神経科学会(宇部)において展示口演した。

文 献

- 1) 木村 正, 竹田泰三, 鎮西邦彦, 齋藤春雄: 内耳内・外リンパ液の循環代謝動態(第2編). *Equilibrium Res Suppl* 5: 106-111, 1989
- 2) Larsen HC, Angelborg C, Hultcrantz E: Cochlear blood flow related to hyperosmotic solutions. *Arch Otorhinolaryngol* 234: 145-150, 1982
- 3) 木村 正, 竹田泰三, 鎮西邦彦, 岸本誠司, 齋藤春雄: 内耳内・外リンパ液の循環代謝動態(第1編). *Equilibrium Res* 47: 64-69, 1988
- 4) 竹田泰三, 竹内俊二, 木村 正, 鎮西邦彦, 齋藤春雄: 内耳圧と内耳血流. *Equilibrium Res Suppl* 5: 101-105, 1989
- 5) Kawakami M, Makimoto K, Nakajima T, et al: Observations of cochlear blood flow dynamics using laser doppler flowmeter. *Arch Otorhinolaryngol* 246: 147-150, 1989
- 6) Miller JM, Marks NJ, Goodwin PC: Laser doppler measurement of cochlear blood flow. *Hearing Res* 11: 385-394, 1983
- 7) Goodwin PC, Miller JM, Dengerink HA, et al: The laser doppler: A non-invasive measure of cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 98: 403-412, 1984
- 8) Short SO, Goodwin PC, Kaplan JN, et al: Measuring cochlear blood flow by laser doppler spectroscopy. *Otolaryngol Head Neck Surg* 93: 786-793, 1985
- 9) Ernster JA, Meyers AD: Drug-induced alterations in cochlear blood flow as recorded by the laser doppler flowmeter. *Otolaryngol Head Neck Surg* 95: 223-238, 1986
- 10) Thorne PR, Nuttall AL: Laser doppler measurements of cochlear blood flow during loud sound exposure in the guinea pig. *Hear Res* 27: 1-10, 1987
- 11) Nuttall AL, Hultcrantz E, Larsen HC, et al: Cochlear blood flow increase after systemic hemodilution. *Hear Res* 34: 215-224, 1988
- 12) Laugel GR, Wright JW, Dengerink HA: Angiotensin II and progesterone on laser doppler measurement of cochlear blood flow. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 106: 34-39, 1988
- 13) Sillman JS, LaRouere MJ, Nuttall AL, et al: Recent advances in cochlear blood flow measurements. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 97: 1-8, 1988
- 14) 中島 徹, 牧本一男, 川上理郎, 野井 理, 福瀬信也, 他: グリセロール投与による蝸牛血流の変化. *日耳鼻* 91: 1727-1728, 1988
- 15) 横山和則, 長谷川 誠, 小林憲明, 岡本文理, 田村俊世, 他: Vinpocetine のモルモット蝸牛血流に及ぼす影響. *耳鼻と臨床* 34: 721-724, 1988
- 16) Takeda K, Lowry LD, Liu JJC: Effect of urea, glycerol, and mannitol on basilar and labyrinthine arteries. *Otolaryngol Head Neck Surg* 98: 226-230, 1988

Abstract

Cochlear blood flow was measured with a Laser Doppler flowmeter. The methods and the dose infused were as described in Chapter 2. Recordings from the basal turn of 6 guinea pigs in each group were examined in a study of the effects of hyperosmolar solutions of glycerol, mannitol, and urea. Recordings were made for 10 minutes before infusion and for 10 minutes after glycerol, mannitol, or urea infusion. Cochlear blood flow increased significantly

after the infusion of glycerol. In contrast, in 6 guinea pigs there was no significant increase of cochlear blood flow after infusion of the same volume of physiological saline. Cochlear blood flow increased significantly after the infusion of mannitol, but not after the infusion of urea. A personal computer (NEC PC-9801) and soft ware made by ourselves were used to analyze these data. These results do not

agree with those obtained by the H_2 clearance method.

Key words : Cochlear Blood Flow, Laser Doppler Method, Hyperosmolar Solutions

(原稿到着 : 平成 1 年 8 月 31 日
別刷請求先 : 木村 正
〒606 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学医学部形成外科学教室)