

厚生労働省特定疾患対策研究事業

前庭機能異常に関する調査研究班

(H11－特疾－20)

平成12年度 研究報告書

主任研究者 八 木 聰 明

(発行 平成13年3月)

厚生労働省特定疾患対策研究事業

前庭機能異常に関する調査研究班

目 次

I. 班 員 名 簿	(1)
II. 総合研究報告書	主任研究者 八 木 聰 明..... (3)
III. 分担研究報告書	(7)
IV. 分担研究報告	
1. 感音難聴患者末梢血のリンパ球分画の変化：第2報	(37)
八木聰明、ルビーパワーカー、池園哲郎、愛野威一郎、馬場俊吉 (日本医科大学耳鼻咽喉科)	
2. 2次元電気泳動法による内耳自己抗原の検索	(39)
八木聰明、池園哲郎、齋藤明彦、新藤 晋、ルビーパワーカー、大久保公裕 (日本医科大学耳鼻咽喉科)、大森 彬 (三菱化学生命科学研究所)	
3. 内耳プロテオーム解析によるCOCH遺伝子発現の検討	(42)
八木聰明、池園哲郎、新藤晋、ルビーパワーカー (日本医科大学耳鼻咽喉科)、 渡邊 篤 (日本医科大学第2生化学)、大森 彬 (三菱化学生命科学研究所)	
4. 内耳有毛細胞の分化と再生	(45)
伊藤壽一 (京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学講座耳鼻咽喉科・頭頸部外科学)	
5. 人工内耳術後めまいの年次発生率の解析	(48)
久保 武、山本好一、井脇貴子 (大阪大学大学院耳鼻咽喉科)	
6. メニエール病の遺伝子解析 (第2報)	(53)
久保 武、土井勝美、布施愉香、松代直樹 (大阪大学大学院耳鼻咽喉科)	
7. 鼓室内ゲンタマイシン注入療法の検討	(55)
久保 武、雑賀孝昇、今井あや、福嶋宗久、堀井 新、西村将人 (大阪大学耳鼻咽喉科)	
8. 勤労者3,400名における行動特性、ストレス源ならびに身体症状のアンケート調査結果.....	(57)
大貫純一、高橋正紘 (東海大学医学部耳鼻咽喉科)、山下裕司 (山口大学医学部耳鼻咽喉科)	
9. インターネットを用いたライフスタイルに関するアンケート調査	(61)
—めまいとストレスの関連について— 菅原一真、橋本 誠、奥田 剛、山下裕司 (山口大学医学部耳鼻咽喉科)、 高橋正紘 (東海大学医学部耳鼻咽喉科)	
10. メニエール病の診断基準をめぐって	(64)
高橋正紘 (東海大学医学部耳鼻咽喉科)、竹田泰三 (高知医科大学耳鼻咽喉科)、 鈴木 衛 (東京医科大学耳鼻咽喉科)	
11. 身体平衡に占める視覚と前庭覚	(67)
一氏佳代子、高橋正紘、飯田政弘 (東海大学医学部耳鼻咽喉科)、 池田卓生 (山口大学医学部 耳鼻咽喉科)	
12. 部分的末梢前庭障害動物モデルの前庭機能評価法	(70)
下郡博明、堀池 修、山下裕司 (山口大学医学部耳鼻咽喉科)、 高橋正紘 (東海大学医学部 耳鼻咽喉科)	

13. DAF-2DAを用いた内耳でのNO産生部位の検討 (DAF-2DA histochemistry) (72)
 工田昌也、夜陣紘治 (広島大学医学部耳鼻咽喉科)、
 ポパ ラウル、アンニコ マッティ (ウプサラ大学病院 耳鼻咽喉科頭頸部外科)
14. メニエール病の治療ガイドライン作製の問題点 (75)
 工田昌也、夜陣紘治 (広島大学医学部耳鼻咽喉科)
15. 各種薬剤による内耳障害の予防・治療効果 (78)
 工田昌也、夜陣紘治 (広島大学医学部耳鼻咽喉科)、
 アンニコ マッティ、ポパ ラウル (ウプサラ大学病院耳鼻咽喉科頭頸部外科)
16. 電気刺激による前庭誘発筋電位 (82)
 室伏利久、竹腰英樹、松崎真樹 (東京大学耳鼻咽喉科)
17. 前庭障害症例におけるVEMPとSubjective visual horizontal (85)
 室伏利久、木村美和子、松崎真樹 (東大病院耳鼻咽喉科)、
 中原はるか (東大病院分院 耳鼻咽喉科)
18. 前庭機能障害症例におけるvibration-induced nystagmus (88)
 室伏利久 (東大病院耳鼻咽喉科)、大木雅文 (亀田総合病院耳鼻咽喉科)、
 中原はるか (東大病院分院耳鼻咽喉科)
19. 2000年メニエール病疫学調査報告 (91)
 渡辺行雄、將積日出夫、藤坂実千郎 (富山医科薬科大学耳鼻咽喉科)
20. グリセロール負荷前庭誘発筋電位検査の遅発性内リンパ水腫診断の有用性 (95)
 渡辺行雄、將積日出夫、小林健二 (富山医科薬科大学耳鼻咽喉科)
21. 症状と内リンパ水腫推定検査からみたメニエール病診断基準についての考察 (97)
 渡辺行雄、麻生 伸、木村 寛、將積日出夫 (富山医科薬科大学耳鼻咽喉科)
22. 中耳圧刺激装置 (メニエット) による重症メニエール病の治療経験 (100)
 渡辺行雄、將積日出夫、丸山元祥 (富山医科薬科大学耳鼻咽喉科)
23. 一側前庭機能異常患者の足踏み動作三次元解析について (102)
 渡辺行雄、浅井正嗣、小林健二 (富山医科薬科大学耳鼻咽喉科)
24. 難治性メニエール病に対する内リンパ嚢高濃度ステロイド局所投与による治療 (105)
 北原 紘 (大阪労災病院耳鼻咽喉科)、久保 武、福嶋宗久 (大阪大学大学院耳鼻咽喉科)、
 武田憲昭 (徳島大学医学部耳鼻咽喉科)
25. デキサメタゾン投与によるラット内耳水チャンネルの発現変化 (107)
 北原 紘 (大阪労災病院耳鼻咽喉科)、
 福嶋宗久、久保 武、土井勝美、宇野吉裕、布施愉香 (大阪大学大学院 耳鼻咽喉科)
26. 内耳における水チャンネル (アクアポリン) の発現—第二報— (109)
 竹田泰三、澤田正一、柿木章伸 (高知医科大学耳鼻咽喉科)
27. 遅発性内リンパ水腫の診断基準の検討 (111)
 竹田泰三 (高知医科大学 耳鼻咽喉科)、高橋正紘 (東海大学医学部 耳鼻咽喉科)、
 鈴木 衛 (東京医科大学耳鼻咽喉科)
28. 実験的内リンパ嚢手術—内リンパ嚢瘻孔に対するマイトマイシンCの影響— (113)
 竹田泰三、柿木章伸、澤田正一 (高知医科大学耳鼻咽喉科)
29. 実験的自己免疫性迷路炎—Th1リンパ球の役割— (115)
 富山俊一 (日本医科大学耳鼻咽喉科)
30. 急性前庭障害における視刺激検査所見—その異常所見をどう評価すべきか— (118)
 中村 正、那須 隆 (山形大学医学部耳鼻咽喉科学講座)
31. ヒト内リンパ嚢直流電位 (ESP) (124)
 隈上秀高 (国立嬉野病院 耳鼻咽喉科)、重野浩一郎、小林俊光 (長崎大学 耳鼻咽喉科)

32. メニエール病めまい発作と耳石器機能障害…………… (126)
重野浩一郎、奥 竜太、小林俊光 (長崎大学耳鼻咽喉科)、
隈上秀高 (国立嬉野病院耳鼻咽喉科)
33. 温度変化に応じる半規管電位の発生メカニズムについて…………… (129)
鈴木 衛、北島尚治、佐藤春城、古屋正由、竹之内剛、萩原 晃
(東京医科大学耳鼻咽喉科)
34. 感音難聴症例におけるVEMPの検討…………… (134)
鈴木 衛、鈴木伸弘、清水重敬、北島尚治、市村彰英 (東京医科大学耳鼻咽喉科)
35. ヒストンにたいする免疫応答を背景にした内耳機能障害実験モデル…………… (138)
朴沢孝治、草刈千賀志 (東北大学大学院医学系研究科感覚器病態学講座耳鼻咽喉科学分野)

I. 班 員 名 簿

班員名簿

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	八 木 聰 明	日本医科大学耳鼻咽喉科	教 授
分 担 研 究 者	伊 藤 壽 一 久 保 武 高 橋 正 紘 工 田 昌 也 室 伏 利 久 渡 辺 行 雄 北 原 紘 竹 田 泰 三 富 山 俊 一 中 村 正 重 野 浩 一 郎 鈴 木 衛 朴 沢 孝 治	京都大学医学部耳鼻咽喉科 大阪大学医学部耳鼻咽喉科 東海大学医学部耳鼻咽喉科 広島大学医学部耳鼻咽喉科 東京大学医学部耳鼻咽喉科 富山医科薬科大学耳鼻咽喉科 大阪労災病院耳鼻咽喉科 高知医科大学耳鼻咽喉科 日本医科大学耳鼻咽喉科 山形大学医学部耳鼻咽喉科 長崎大学医学部耳鼻咽喉科 東京医科大学耳鼻咽喉科 東北大学医学部耳鼻咽喉科	教 授 教 授 教 授 講 師 講 師 教 授 医 長 教 授 助 教 授 助 教 授 助 教 授 教 授 講 師
(事務局) 經理事務連絡責任者	池 園 哲 郎	日本医科大学耳鼻咽喉科 〒113-8603 東京都文京区千駄木1-1-5 TEL 03-3822-2131 FAX 03-5685-0830	講 師

Ⅱ. 総 合 研 究 報 告 書

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）総括研究報告書

前庭機能異常に関する調査研究

主任研究者 八木 聡明 日本医科大学教授

研究要旨 本研究の目的は、前庭機能異常を引き起こす疾患の中でもその原因が不明であり難治性疾患でもあるメニエール病及び遅発性内リンパ水腫の病因、診断基準、治療方針、予防法、を明らかにし、患者実態の把握と疫学的解析を合わせて行うことである。

病因解明に関して、液性免疫によるメニエール病モデル動物の完成、2次元電気泳動マッピングによる内耳のプロテオーム解析、患者血清からの内耳自己抗原の同定、メニエール病に関する遺伝子解析の開始が順調に進んだ。

診断基準と治療指針を策定と予防法については、次の点に関して検討され、研究結果が報告された。診断基準と治療指針策定のためのワーキンググループを作り作業を行う。治療及び予防に関して、フリーラジカル抑制に関する動物実験を行いその可能性を検討する。フリーラジカル抑制剤の単一施設、および他施設での治験を行う。内耳機能喪失後の治療に関して、神経再生の面から検討を行う。

疫学的分析も研究2年目に次の点について調査を行い、その結果が報告された。特定地域でのメニエール病と遅発性内リンパ水腫症例の有病率と罹患率（対10万人）の調査を行う。各研究者の施設における患者数やその動態を観察し、過去の特定地域での結果と比較検討する。

これらの結果の詳細については、分担研究者のそれぞれの報告報告に委ね、ここでは、主任研究者の施設で行った個別の研究について述べる。

A. 研究目的

目的その1は自己免疫性内耳疾患の病態解明である。内耳に対する自己免疫反応により難聴が発症する可能性が近年示されてきている。この根拠として、(a) ステロイド治療により難聴が改善すること、(b) 既知の自己免疫疾患に内耳性難聴が合併すること、(c) ウェスタンブロット法により、牛内耳組織と患者血清が高率に反応したこと、(d) 両側進行性難聴患者の剖検例で内耳にリンパ球浸潤が著明にみられたこと、(e) 動物実験レベルでは自己免疫性内耳炎が証明されている、などがあげられる。我々は自己免疫性内耳疾患の病態を免疫病理学的に明らかにするため①患者末梢血リンパ球を用いた研究、②内耳蛋白2次元電気泳動ウェスタンブロット法による内耳抗原の同定、を行う。

目的その2は内耳蛋白のプロテオーム解析である。現在内耳の構成蛋白の解析を進めている。今年度は特に近年注目されている遺伝性難聴、DFNA9の原因遺伝子COCHの発現について遺伝子レベル、蛋白レベルで得られた情報を対応させて、この蛋白の生理的意義、病理学的動態を研究する。

B. 研究方法

その1. ①末梢血の免疫担当細胞の機能的な変化は内耳の免疫担当細胞の変化をもたらすことが予測されることから患者末梢血リンパ球の表現型をフローサイトメーターで解析する。②牛内耳蛋白を2次元電気泳動法で分離、ウェスタンブロットで患者血清との反応をみて、反応陽性の蛋白のアミノ酸配列を解析しこの蛋白を特定する。

その2. 牛内耳から蛋白を抽出、2次元電気泳動をおこない蛋白スポットのアミノ酸配列を解析、データベース検索により蛋白を同定する。更にこのデータベースを集積し内耳蛋白の2次元電気泳動マップを作成し、内耳プロテーム解析を進める。

C. 研究結果

その1. ①昨年度から更に症例を増やし検討した。メニエール病、遅発性内リンパ水腫、突発性難聴患者末梢血のリンパ球分画の解析の結果、CD4/CD8比の低下、メモリーT細胞の増加がみられた。またメニエール病では抑制T細胞の低下、HLA-DR陽性細胞、 $\gamma\delta$ 細胞の増加が認められた。②遅発性内リンパ水腫、メニエール病患者血清が認識した蛋白は、HSP70(6例中2例)、enolase α (6例中3例)、F1-ATP(6例中2例)であった。

その2. 蛋白の分子量、等電点の違いから対象組織の構成蛋白を2次元に展開した。今回の実験の結果、常染色体優性遺伝性難聴の一つである、DFNA9の原因遺伝子、COCHの蛋白産物が内耳の構成蛋白の70%を占めること、COCH遺伝子産物は3つの異なったN末端をもち、等電点も異なる全部で16個の蛋白から構成されているというユニークな事実を明らかにした。

D. 考察

自己抗体の検討では今回検討した6例の自己抗体が認識する抗原としてATP合成に関与する蛋白2種類が同定された。今後症例を増やしていくと、発症の原因となる抗原、内耳炎を増悪させ難聴を進行させるような抗原、内耳炎の結果生じた自己抗体が認識する抗原など、おそらく、数個の蛋白が自己抗原として同定されることが予測される。他の自己免疫疾患と同様に、それぞれの自己抗原に対する陽性率から、疾患との関連性、重要性を検討する。自己抗原の同定が、内耳性難聴の病態解明、発症予防、難聴の治療など多くの問題解決に寄与する事が期待される。一方、内耳の中のリンパ球はその大部分が末梢血から供給される。メニエール病、遅発性内リンパ水腫、突発性難聴患者末梢血のリンパ球分画の明らかな変化が見られた。今回の我々の実験結果は今までの結果を更に裏付けるものであった。この結果は内耳の免疫担当細胞にも同様な変化が生じている可能性を示しており、上記疾患の免疫学的な発症機序を示唆している。

内耳プロテオーム解析では、DFNA9の原因遺伝子、COCHの蛋白産物が内耳の主要な構成蛋白であることを初めて明らかにした。更にこのCOCH遺伝子発現のheterogeneity について詳細に検討した。今後この蛋白の機能解析、内耳の部位別の発現の違い、発生学的変化、疾患モデル動物での動態等を調べていく予定である。

E. 結論

患者末梢血リンパ球の解析と内耳蛋白の2次元電気泳動法により、内耳疾患の診断治療に寄与するような免疫学的な新見解が得られると思われる。また内耳プロテオーム解析は今まで全く知られていないような新たな情報を知るために有用な手段である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Ikezono T, Tomiyama S, Pawankar R, Jinnouchi K, Suzuki Y, Yagi T: Passive transfer of the experimental autoimmune labyrinthitis. *Audiol Neurootol* 2000 5(5):292-9.
- ・ Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T: Identification of the protein product of the Coch gene - hereditary deafness gene - as the major component of bovine inner ear protein. *Biochimica Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* (in press)

2. 学会発表

- ・ Ikezono T, Pawankar R, Yagi T, Omori A, Ichinose S: Proteomic analysis of inner ear proteins by 2-dimensional gel electrophoresis. 21st Barany Society Meeting (2000. 6.4-7, Uppsala, Sweden)
- ・ Ikezono T, Omori A, Ichinose S, Ohkubo K, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T: 2-D gel

electrophoresis to identify the inner ear antigen. AAO-HNSF/ARO Research Forum, 2000 Annual Meeting of the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery Foundation (2000. 9.24-27, Washington DC)

- ・池園哲郎、大森彬、一ノ瀬幸代、大久保公裕、ルビーパワーカー、八木聰明：2次元電気泳動法による内耳自己抗原同定の試み 第101回 日本耳鼻咽喉科学会総会(2000.5.18-20,東京)
- ・池園哲郎、大森彬、ルビーパワーカー、渡邊 篤、八木聰明：遺伝性難聴・めまい疾患 (DFNA9) の原因遺伝子、COCHの蛋白発現について 第59回日本平衡神経科学会総会(2000.11.30-12.1, 東京)

G. 知的所有権の取得状況

なし

Ⅲ. 分 担 研 究 報 告 書

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）総括研究報告書 前庭機能異常に関する調査研究

分担研究者 伊藤 壽一

京都大学大学院医学研究科感覚運動系病態学講座耳鼻咽喉科・頭頸部外科学 教授

研究要旨 哺乳動物の内耳有毛細胞は音響暴露、種々の薬物などで障害を受け、感音性難聴、前庭機能障害の治療は困難である。内耳障害の治療に関し、内耳有毛細胞そのものを再生させられないかという発想もあり、最近脚光を浴びているのが、幹細胞の導入である。本研究では動物（ラット）を用い、幹細胞のうち内耳由来の幹細胞を分離・培養できるかどうか検討した。その結果、内耳由来の幹細胞と思われるものが分離・培養可能であった。この幹細胞を内耳に投与すれば、内耳有毛細胞への分化も理論的には可能であり、さらには治療困難と考えられてきた感音性難聴、前庭機能障害の治療への応用も期待できると思われる。

A. 研究目的

内耳有毛細胞は音響や耳毒性を持つ薬物、加齢により損傷し、一旦脱落してしまうとその後再生しない。そのため、有毛細胞の脱落により聴覚・平衡覚が失われてしまえば、その機能は永久に回復しない。しかし、器官培養系では成熟した哺乳動物においても有毛細胞の再生が起こることが知られており、中枢神経系と同様に生体内では本来持っている再生能力が何らかの機構で抑制されていることが示唆される。そのため、損傷した内耳感覚器に対しても幹細胞や前駆細胞などの未分化な細胞は移植の材料として利用できるのではないかと考えられる。

しかしながら、現在までのところ、内耳感覚上皮の幹細胞や前駆細胞は単離同定されていない。今回我々は、幹細胞や前駆細胞が豊富に存在すると考えられる胎生12日のラット胎仔の耳胞から感覚上皮細胞を選択的に培養する方法を確立した。

B. 研究方法

胎生12日のWistar系ラットの胎仔耳胞細胞を用い初代培養を行った。耳胞周囲の中胚葉組織を可及的に除去した後、耳胞を機械的に分散した。培養液には上皮増殖因子（epidermal growth factor: EGF）を添加した培地を用いた。培養7日目に固定し、細胞がどのような性質を持つのか免疫蛍光抗体法で調べた。

C. 研究結果

EGF培地では、敷石状細胞が上皮様の斑状単層性のコロニーを形成した。これらの細胞は、サイトケラチン及びネスチンに対し免疫反応が陽性であったが、カルビンディン、GFAP、ニューロフィラメントに対しては陰性であった。また、細胞の核にはBrdUの取り込みが認められた。

D. 考察

胎仔期の内耳では、サイトケラチンは感覚上皮細胞で発現し、神経細胞やシュワン細胞、線維芽細胞では発現しない。耳胞を摘出する際に耳胞感覚上皮以外の中胚様組織や神経組織を完全に除去することはできなかったが、EGF培地で上皮様のコロニーを形成した細胞は、サイトケラチンを発現していたが、神経細胞のマーカーであるニューロフィラメントやグリア細胞のマーカーであるGFAPは発現していなかった。EGF培地でコロニーを形成した細胞は、形態的にも免疫細胞学的にも、感覚上皮細胞由来と考えられた。また、EGF培地ではサイトケラチン陰性の線維芽細胞やシュワン細胞の増殖は抑制され、感覚上皮細胞のコロニーを単離する事が可能であった。また、培養された感覚上皮細胞は未分化な状態であることが示唆さ

れた。今後、このような培養細胞を用いて内耳有毛細胞の再生を目指した研究が期待される。

E. 結 論

EGFを添加した無血清培地を用いることにより、胎仔感覚上皮細胞を培養することが可能であった。また、この培養系で単離された感覚上皮細胞は未分化な幹細胞や前駆細胞であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ J Ito, M. Murata, S Kawaguchi. : Regeneration and recovery of hearing function of the central auditory pathway by transplants of embryonic brain tissue in adult rats.
Experimental Neurology (印刷中)
- ・ J Ito, K Kojima, S Kawaguchi. : Survival of neural stem cells in the cochlea.
Acta Otolaryngologica (印刷中)

2. 学会発表

- 1) J Ito, K Kojima, S Kawaguchi. : Survival of neural stem cells in the cochlea.
21th Barany Society Meeting (2000,6,6, Uppsala Sweden)
- 2) J. Ito, S. Kawaguchi, K. Kojima : Survival of adult-derived neural stem cells in the cochlea.
Collegium ORLAS Meeting (2000, 8,30, Washigton DC, USA)

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）総括研究報告書 前庭機能異常に関する調査研究

分担研究者 久保 武 大阪大学大学院 耳鼻咽喉科教授

研究要旨 人工内耳術後めまいの検討およびメニエール病の病因、治療法の検討。

A. 研究目的

人工内耳術後めまいの発生についての検討およびメニエール病の病因としての遺伝子異常、ゲンタマイシンによる治療法の効果を検討する。

B. 研究方法

人工内耳術後めまいの発生について年次推移および病因から解析した。メニエール病の確実例において内耳に発現するK⁺チャンネル遺伝子を対象に調べた。メニエール病に対する治療法では、ゲンタマイシンの中耳腔への投与を二種の方法で行い有用性と問題点を検討した。

C. 研究結果

- 1) 人工内耳術後めまいのうち、術直後型は手術手技の向上により減少傾向にあることが示唆された。他方、遅発型めまいの発生は、失聴原因により差がみられた。
- 2) メニエール病患者の血液からKCNE1,3遺伝子変異をがみられたが、これは健常人のゲノムにもみられることからsingle nucleotide polymorphisms (SNPs) と考えられた。
- 3) 23例の重症メニエール病に対し、ゲンタマイシンを二種の方法で中耳腔へ投与した。初回に1回投与し経過によって追加するshot gun法、最初から3日連続投与するtitrate法のいずれもめまいの抑制には効果があった。本法は、聴力障害の発生も軽度であり、患者さんへの侵襲の度合いも少ないことから極めて有用な治療法と考えられる。

D. 考察

人工内耳術後めまいは、手術手技の向上により減少する可能性のある反面、蝸牛軸密着型人工内耳の普及によっては増加する事も考えられる。人工内耳術後に遅発性におこるめまいは、メニエール病に類似しており内リンパ水内腫の形成が原因として考えられる。メニエール病リンパ水内腫の形成には、いくつかの異なる遺伝子の変異が関与する可能性が高く、今後、メニエール病患者ゲノムの解析数を増やし、その遺伝子変異を慎に解析する必要があると考えられる。重症型メニエール病に対するゲンタマイシン治療法は極めて有用であり、今後侵襲の強い外科治療にとってかわり得る方法と思われる。

E. 結論

人工内耳術後の遅発性めまいは、メニエール病に類似しており内リンパ水内腫の形成が原因として考えられる。メニエール病患者のゲノム中にKCNE1,3変異遺伝子がみつきり、これがメニエール病発症に何らかの遺伝的背景をもつことが示唆された。重症型メニエール病に対する治療法としてゲンタマイシンの中耳腔投与は極有用である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Kubo T, Yamamoto K, Iwaki T, Doi K, Tamura M. Different forms of dizziness occurring after cochlear implant. Eur Arch Otorhinolaryngol (in press).
- ・ 久保武：めまい疾患の概要。脳21 4: 41-44, 2001

2. 学会発表

- ・ 雑賀孝昇、今井あや、福嶋宗久、堀井新、西村将人、久保武：鼓室内ゲンタマイシン注入療法の検討めまいの治療。第回日本めまい平衡医学会。平成12年11月

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）総括研究報告書

前庭機能異常に関する調査研究

分担研究者 高橋 正紘 東海大学医学部 耳鼻咽喉科教授

研究要旨 1) 大企業の勤労者団でライフスタイルをアンケート調査し、メニエール病患者の結果と比較した。勤労者では身体症状の点数が高い程、行動特性やストレス源の点数が高かった。勤労者に比べ、メ病患者は行動特性の点数が有意に高いが、睡眠時間やストレス源では有意の差がなかった。2) アンケートをホームページで公開し結果を集計した。年齢と共にストレス源の点数は増加したが、行動特性の点数は不変であった。めまいの強い人ほど行動特性とストレス源の点数の高い傾向が見られた。3) コリオリ刺激中の受動感覚や揺らぎを裸眼と遮眼で50-150o/sで調べた。低速では裸眼と遮眼で起立に差が見られたが、高速では見られなかった。高速移動では視覚は外界知覚に無力と結論された。4) モルモットの眼球運動を公開ソフトNIH Imageで分析し十分な精度が得られた。5) メニエール病診断の手引きの見直しについてアンケート調査し、現状では改定必要なし意見が多数であることを確認した。

A. 研究目的

1) メニエール病とストレスの関係を調べるため、一般集団でアンケート調査を行いメニエール病患者と比較する。2) アンケートをホームページで公開し、自己評価してもらう。3) 平衡障害の模擬としてコリオリ刺激を与え、視覚が受動感覚や平衡障害に及ぼす影響を調べる。4) 平衡研究の動物実験で、汎用ソフトを用いて小動物の眼球運動を指標とする方法論を確立する。5) メニエール病の診断基準の改定の必要性を検討した。

B. 研究方法

1) 独自のアンケート調査用紙を用いて大企業3,410名とメニエール病患者80名で調査した。2) 同アンケートを各人が自己評価できる形でインターネット上に公開し、解答した6,000余名について調査した。3) 回転起立台を用いて、50-150o/sで健康成人19名を対象に、コリオリ刺激（起立台回転中に頭部前屈）中の起立姿勢（転倒の有無、重心移動記録）を裸眼と遮眼で比較した。4) 正常モルモット14匹を用いて180o/sの回転停止後の眼球運動をCCDビデオカメラで記録し、NIH Imageで眼球運動を解析した。7匹に一側外側半規管を切断し3日後に記録分析した。5) 班員、研究協力者14名にe-mailでアンケートを送り、結果を集計すると共に、報告会で出席者の意見を求めた。

（倫理面への配慮）

不特定多数のアンケート調査は匿名で行い、個人を特定できない形で収集、分析した。動物実験は学内の倫理委員会の審議を経て認可されたものである。

C. 研究結果

1) 勤労者では身体症状の点数が高い程、行動特性やストレス源の点数が高かった。勤労者に比べメ病患者は行動特性の点数が有意に高いが、睡眠時間、ストレス源、気分転換手段も点数では有意の差がなかった。2) ホームページにアクセスし解答した6,065名の結果を集計した。女性が男性を上回り、20代、10代、30代の順であった。年齢と共にストレス源の点数は増加したが、行動特性の点数は不変であった。めまいの強い人ほど行動特性とストレス源の点数が有為が高く、ストレス緩和因子の点数は有為に低かった。3) コリオリ刺激（回転中の頭部傾斜）中の起立成功率（成功例数/総数、%）は50o/sでは裸眼の値が遮眼を上回ったが（89.5%対57.9%）、70-150o/sでは差が見られなかった。4) 無処置モルモット（N=14）の両方向回転の28記録中26記録の解析では、最大緩徐相速度の平均は 37.29 ± 9.42 、7匹の一側外側半規管

切断後の術側回転後の平均は 9.79 ± 2.76 であった。公開ソフトNIH Imageで実験動物に利用可能な精度が得られた。5) 14名中9名が応答した。78%が耳閉塞感を基準に含めるべきと答えたが、基準見直しに賛成は45%に過ぎなかった。報告会出席者の多数は基準の改定に反対意見であった。

D. 考察

1) メニエール病の発症にストレスが係わることは以前から指摘されているが、どう係わるかは不明な点が多い。今回の一般集団の調査から、消化器症状、めまい、dry eye、動悸など自律神経失調的な身体症状は、ストレスを生みやすい性格傾向(行動特性)やイライラの程度(ストレス源)と関係するが、睡眠時間や気分転換手段の多寡とは無関係であった。睡眠不足や過労など表面的なストレスよりも、行動特性(性格の一部)に由来する内的ストレスが身体症状により関係することを示唆している。2) インターネットのホームページは不特定多数がアクセスし秘匿性が高く、アンケートに適する。同時に関心の有無や年齢、性で偏りが起こり情報の適正さに不安がある。今回の結果を企業調査と比べると、行動特性の点数が加齢に影響されない、加齢と共にストレス源の点数が増加する、めまいの程度が強い程行動特性やストレス源の点数が増加する、は共通であった。しかし全ての項目で複数の企業調査の結果よりも点数が高く、対象者に偏りある可能性を否定できない。3) 身体平衡は視覚、前庭覚、固有覚の統合で維持されている。コリオリ刺激中の揺らぎに対し、視覚は低速では有効であったが高速では無効であった。これより、移動中の動作制御に占める視覚の役割は極めて限られたものと言える。4) 我々は過去にヒトとマーモセットでNIH Imageにより眼球運動を解析した。今回は眼球の小さなモルモットで回転後眼振を解析した。mean \pm SDの結果、無処置群と術施行群の値の違いから、小動物においても本法が十分実用になることが証明された。5) 診断の手引きは使いやすい、特別な検査なしに診断できる、と現在でも好評であった。しかし、作成から4半世紀経過し、高齢者、非典型例や早期例の増加しており、基準が環境に追いつかない面も出てきている。これらに対応するためには、今後、ストレスや行動特性と発症との関係をより明快に客観化してゆく必要がある。

E. 結論

1) 企業の3410名、メニエール病80名にライフスタイルのアンケート調査を実施した。企業調査では、自律神経失調的な身体症状はタイプA、自己抑制、逃避などの行動特性傾向の強い人、イライラの程度の強い人でより著しかった。一般集団と比べ、メ病患者は行動特性の点数が有意に高いことから、メ病の発症要因として考慮する必要がある。2) ホームページにライフスタイルのアンケートを公開し、自己診断の試みを行った。対象は若年、女性に偏ったが、加齢でイライラの程度は増大し、行動特性の点数は影響されなかった。めまいの程度は行動特性やイライラの点数の高い人ほど強い傾向があった。これらの傾向は企業調査に一致していた。3) 視覚がコリオリ刺激中の受動感覚、揺らぎに及ぼす影響を健康被験者19名で調べた。高速では裸眼と遮眼で差がなく、外界知覚が動作を支配する仮説を裏付けていた。4) 公開ソフトNIH imageでモルモットの眼球運動を解析し、十分な精度が得られた。5) ニエール病診断の手引きの見直しについてアンケート調査し、現状では改定必要なし意見が多数であることを確認した。

F. 研究発表

1.論文発表

- 1) Watanuki K, Takahashi M, Ikeda T: Perception of surrounding space controls posture, gaze, and sensation during Coriolis stimulation. *Aviat Space Environ Med* 71:381-387,2000.
- 2) Shimogori H, Yamashita: Effectiveness and utility of chemical labyrinthectomy. *ORL* 62:60-62,2000.
- 3) Shimogori H, Yamashita H: Efficacy of intracochlear administration of betamethasone on peripheral vestibular disorder in the guinea pig. *Neuroscience letters* 294:21-24,2000.

- 4) 下郡博明、菅原一真、池田卓生、山下裕司：浸透圧ポンプ留置モデルの前庭機能評価法. *Equilibrium Res* 59:306-310,2000.
- 5) 池田卓生、綿貫浩一、菅原一真、山下裕司：赤外線CCDカメラとパソコンを用いた簡易眼球運動画像解析法. *Equilibrium Res* 59:298-305,2000.
- 6) 菅原一真、山下裕司、下郡博明、池田卓生、奥田剛、高橋正紘：ストレス増強に伴いめまいが出現した蝸牛型メニエール病例. *Equilibrium Res* 59:556-562,2000.
- 7) 石田克紀、飯田政弘、高橋正紘、山下裕司：メニエール病と行動特性. *耳鼻臨床* 94:11-15,2001.
- 8) 高橋正紘：メニエール病の生活指導. 武田憲昭（編）EBMに基づくめまいの診断と治療、文光堂、印刷中.
- 9) Takahashi M, Ishida K, Iida M, Yamashita H, Sugawara K: Analysis of lifestyle and behavioral characteristics in Meniere's patients and a control population. *Acta Otolaryngol*, in press.

2.学会発表

- 1) 一氏佳代子、飯田政弘、浜野巨秀、高橋正紘：コリオリ刺激が重心動揺に及ぼす影響（3Dヒストグラムによる解析）. *日耳鼻* 103:429,2000.
- 2) 下郡博明、菅原一真、山下裕司：浸透圧ポンプによる内耳へのステロイド直接投与が一過性前庭機能障害に与える影響. *日耳鼻* 103:391,2000.
- 3) 竹本剛、池田卓生、綿貫浩一、奥田剛、山下裕司：NIH Imageを用いた眼球回転軸解析について *日耳鼻* 103:392,2000.
- 4) 菅原一真、下郡博明、奥田剛、山下裕司：内耳への薬剤直接注入法施行後の動物モデルの聴力. *日耳鼻* 103:406,2000.
- 5) 池田卓生、綿貫浩一、下郡博明、山下裕司：空間識検査法の開発と臨床終応用. *日耳鼻* 103:430,2000.
- 6) 下郡博明、菅原一真、池田卓生、山下裕司：実験的末梢前庭障害に対するステロイド内耳投与の効果. *Otology Japan* 10:296, 2000.
- 7) 山下裕司、下郡博明、池田卓生、菅原一真：Round Window E-CatchTMの使用経験－メニエール病に対するゲンタマイシン療法－ *Otology Japan* 10:247, 2000.
- 8) 一氏佳代子、大貫純一、飯田政弘、高橋正紘：トレーニングがコリオリ刺激中の起立に及ぼす影響. *Equilibrium Res* 59:483, 2000.
- 9) 橋本誠、池田卓生、堀池修、山下裕司：NIH Image を用いた簡易眼球運動画像解析法（第2報）－当科めまい外来での利用法について－. *Equilibrium Res* 59:487,2000.
- 10) 堀池修、池田卓生、下郡博明、菅原一真、橋本誠、奥田剛、山下裕司：モルモット用眼球運動画像解析法の開発. *Equilibrium Res* 59:488,2000.
- 11) 山下裕司、下郡博明、池田卓生、菅原一真、橋本誠、堀池修、奥田剛：正円窓カテーテル法と鼓室内投与の比較検討－メニエール病に対するアミノグリコシド系抗生剤投与－. *Equilibrium Res* 59:492, 2000.
- 12) 菅原一真、下郡博明、池田卓生、橋本誠、堀池修、奥田剛、山下裕司：ストレス源の解消により症状が著明に改善したメニエール病症例. *Equilibrium Res* 59:505, 2000.
- 13) 大貫純一、高橋正紘、飯田政弘、石田克紀、一氏佳代子、山下裕司、菅原一真：企業及びメニエール病患者におけるライフスタイルに関するアンケート調査. *Equilibrium Res* 59:505, 2000.

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生省科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）総括研究報告書

前庭機能異常に関する調査研究

分担研究者 工田 昌也 広島大学講師医学部附属病院 耳鼻咽喉科

研究要旨 メニエール病の新しい治療法の開発を目的として、内耳でのNO産生部位の検出のための新しい組織化学的方法を開発した。さらに内耳障害が障害発生後でも早期であれば薬剤により治療可能であり、NOS阻害剤とニューロトロフィンとの併用により治療効果が増強することが明かとなった。さらに、メニエール病の治療ガイドライン作製の上での問題点を検討し、次年度にガイドラインを作製する資料とした。

A. 研究目的

メニエール病の治療を目的に、基礎的には内耳でのNOの産生部位の検討、各種内耳障害モデルを利用して、各種薬剤の内耳障害の予防効果、投与時期、併用効果についての検討を行った。また、臨床的にはメニエール病の治療ガイドライン作製の上での問題点を検討した。

B. 研究方法

基礎的研究としてモルモット内耳でのNOの産生部位をDAF-2DAとアルデヒド固定を併用した新手法を用いて直接的に解析した。また、薬剤による治療効果を薬剤投与の時期の面からラット細菌外毒素内耳炎モデルを用いてABRを指標に検討し、薬剤の併用効果を*in vitro*でLIVE/DEAD systemを用いて、L-NAME、BDNFによるGMの内耳感覚細胞障害の軽減作用を中心に検討した。

臨床的にはメニエール病の薬物療法、特に慢性期の薬物療法についてMedlineを使用して過去の論文のレビューを行いメニエール病の治療ガイドライン作製の上での問題点を検討した。

倫理面の配慮に関しては、動物実験に際しては広島大学医学部動物実験規定を遵守した。

C. 研究結果

1) 内耳でのNO産生部位の検討

グルタルアルデヒド固定、水溶性レジンにて脱水、包埋後にもDAF-2DAによる蛍光はよく保存され、前庭器では蛍光はI型、II型感覚細胞、神経、血管壁、暗細胞に認められ、支持細胞、神経杯では陰性であった。蝸牛では蛍光は感覚細胞下部の神経終末に認められ、感覚細胞細胞質ではまばらな蛍光を認めた。コルチ器支持細胞や神経でも蛍光は認められ、血管条、ラセン靭帯、ラセン神経節細胞でも蛍光は陽性であった。これらの蛍光の存在部位は免疫学的なNOSの存在部位とよく一致していた。

2) 薬剤による治療効果

薬剤投与時期に関して、PaExoAを経鼓膜的に中耳腔内に投与したすべての動物で投与72時間後、2ヶ月後にABR閾値の上昇が認められた。PaExoAと1mg/20 μ l L-NAMEの同時投与を行ったものでは投与24時間、2ヶ月後でもすべての周波数で聴力障害が予防された。PaExoAを投与し1時間後に1mg/20 μ l L-NAMEを投与したものでは投与72時間後には低周波数での、投与2ヶ月後には3/4匹でABR閾値のほぼ完全な回復が認められた。PaExoAを投与し24時間後に1mg/20 μ l L-NAMEを投与したものでは72時間後、2ヶ月後にすべての周波数で閾値上昇が認められた。最初に1mg/10 μ l L-NAMEを投与し1時間後に1 μ g/10 μ l PaExoAを投与したものでは1/3匹で聴力障害の予防効果が認められた。

薬剤の併用効果に関して、今回LIVE/DEAD systemを使用することで感覚細胞の生存率を容易に検討することが可能となった。HBSSのみでは感覚細胞は8時間まではほぼ90%以上の生存が認められた。GMを添加したものでは感覚細胞の生存率は4時間後で18.5 \pm 22.9%と有意に減少していた(p<0.01)。このGMによ

る障害はL-NAMEで $55.7\pm 12.0\%$ 、BDNFで $62.6\pm 20.4\%$ と有意に軽減された($p<0.01$)。さらにL-NAMEとBDNFを併用したものでは $91.6\pm 4.1\%$ とほぼ完全に予防され、L-NAME、BDNF単独群と比較しても有意に優れた結果であった。

3) メニエール病治療ガイドライン作製上の問題点

過去20年間にメニエール病の薬物療法に関する論文はMedline上で183編存在し、その内訳は総説37、動物実験11、臨床研究111、臨床研究の中でEBMを有するもの24編であり、同時期の邦文検索では総説14、動物実験7、臨床研究61、臨床研究(EBM)1の計83編であった。これらの中からEBMの存在するものについて薬物療法と手術療法に分けて検討を行ったところ、薬剤ではベータヒスチン、利尿剤などに有効性が認められた。またアミノ配糖体はめまいには有効であるが聴力障害も3~25%に認められ、手術療法に関しては内リンパ嚢手術には有効と無効の両者が存在し、前庭神経切断術については有効とのEBMは認められなかった。

D. 考察

内耳でのNOの直接的検出に今回使用したDAF-2DAは新しいNOの検出試薬でNOと反応して緑色の蛍光を発生し、特異性、検出感度ともに優れている。我々はすでにこの試薬を用いてin vitroで内耳で実際にNOが産生されることを証明した。しかし欠点として隣接細胞でのNO産生の判別が困難なことがあった。今回、我々はグルタルアルデヒド固定の後水溶性レジンにて包埋、光顕用切片を作製し蛍光顕微鏡で観察することに成功し、内耳でのNO産生部位の詳細な検討が可能となった。この方法は内耳のみならず広く他の組織にも応用可能でありNOの機能を解明する上で大きな手助けになるものと考えられた。

内耳障害の予防・治療効果に関する従来の研究は実験的な障害の作製と同時に薬剤を投与してその効果を検討したものが殆どであり多くの報告で障害の予防効果を認めている。しかし、障害後の治療効果を検討した報告は少ない。今回、治療薬としてNOS阻害剤であるL-NAMEを障害発生後に投与した検討から少なくとも障害の発生後早期に治療を行うことにより永続的な内耳障害の予防が可能であることが明かとなった。さらに薬剤の併用効果について、今回、フリーラジカル(NO)の制御とneurotrophinという全く異なった作用機序を有する薬剤の併用効果を検討した結果、それぞれ単独で使用するよりも高い効果を得ることができた。このことは実際の臨床応用を考える段階での薬剤の選択に大きな助けになるものと考えられた。

慢性期におけるメニエール病の薬物療法に関して、EBMの点から見れば主にベータヒスチンと利尿剤に有効性が認められた。しかしながらこのような薬剤によってめまいはコントロール出来るもののメニエール病の自然経過、すなわち難聴の進行や両側メニエール病への進行をくい止めることは出来ていない。アミノ配糖体も明らかにめまいのコントロールには有効であるが同様に難聴の進行を予防できるわけではないし、両側例の場合には副作用の面から使用が困難である。さらにどのような治療法でも重要なプラシボ効果の存在が治療の評価をよりいっそう困難にしている。これらのことから治療指針作製に関して問題点として薬物療法に関しては i) EBMの存在する薬剤が少ない。 ii) 100%有効な治療法はなく、有効率は60~80%である。 iii) めまいには有効であるが聴力に関して明らかに有効なものは認められない。アミノ配糖体の使用に関しては適応がはっきりしていないこと、副作用としての聴力低下の問題があげられ、手術療法に関してはEBMが有効と無効の両方存在すること、適応がはっきりしていないことがあげられる。これまですでに厚生省特定疾患前庭機能異常調査研究班で平成7年度にメニエール病の治療指針の手引きを提唱しているが、これに加えて、慢性期の治療については十分な保存的療法、すなわち少なくとも3ヶ月の保存的療法を行い著効(症状の完全消失)の場合は薬剤の投与中止、有効ならさらに3ヶ月の投与継続、無効の場合には薬剤の変更による治療を繰り返す、が必要であり、その上で、アミノ配糖体の投与、あるいは手術療法の適応を考えるべきであると思われる。また今後の課題として、アミノ配糖体の投与、手術療法の適応基準をより厳密に決定できるようなコントロールスタディを行う必要性を感じた。また、メニエール病の発症要因、悪化要因に様々な種類のストレスが関与していることは現在では共通の認識になっており、保存的治療の項目にストレスに対する心理療法の追加が大きな柱として加えられるべきであると思われる。