

厚生科学研究研究費補助金

特定疾患対策研究事業

前庭機能異常に関する調査研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 八 木 聰 明

平成14 (2002) 年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
前庭機能異常に関する調査研究.....	1
八木 聰明	
II. 分担研究報告	
1. 八木 聰明.....	5
2. 伊藤 壽一.....	7
3. 久保 武.....	9
4. 高橋 正紘.....	11
5. 工田 昌也.....	14
6. 室伏 利久.....	17
7. 渡辺 行雄.....	19
8. 北原 糺.....	21
9. 重野浩一郎.....	24
10. 鈴木 衛.....	26
11. 竹田 泰三.....	28
12. 富山 俊一.....	30
13. 中村 正.....	32
14. 朴沢 孝治.....	33
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	35

I. 総括研究報告書

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、ワーキンググループが作られ作業が行われた。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が検討された。フリーラジカル抑制剤の単一施設が行われた結果、その有用性が認められ今後の発展が期待された。内耳機能喪失後の治療に関して、神経再生の面からの検討が始められた。

疫学的分析も、順調に行われた。また、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）の調査が行われたが、今後さらに調査範囲を広げることになった。

A. 研究目的

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、その診断基準、治療方針、予防法、を明らかにし、これらを評価すると共に、患者実態の把握と疫学的解析を合わせて行うことを本研究の目的としている。

B. 研究方法

病因解明に関しては、いくつかの面からアプローチを行う。その一つとして、これら疾患に内耳の免疫機構が関与している可能性を追求する。そのためにメニエール病動物モデルを用いた実験や、リンパ球移入動物実験をさらに進展させこれらを明確にする。また、臨床的には遅発性内リンパ水腫患者血清の自己抗体の蛋白同定をすすめる。内リンパ水腫発生に関与して、内耳水チャンネルの遺伝子レベルでの検討も行う。また、内耳プロテオーム解析を行い、COCH遺伝子とこれら疾患の関係を明らかにする。

メニエール病の診断基準はすでに存在するが、本研究班ではその見直しを行う。また、明瞭な診断基準のない遅発性内リンパ水腫の診断基準の確立を計る。これら両疾患の治療は困難な点が多いのが現実であるが基礎的研究を通して一部明らかになった分子レベルでの結果を生かし、それぞれの研究者の施設で新しい治療法を行い、従来のもものと比較する。

また、それが発作反復の予防につながるか否かについて検討する。これら治療、予防効果について評価をする。

過去に行ってきた、メニエール病の疫学的調査（定点観測）を継続し、有病率、罹患率の推移について解析する。遅発性内リンパ水腫について、全国的レベルでの疫学調査を行う。遅発性内リンパ水腫については、信頼できる資料がないのが現状である。本研究班で作成したメニエール病の重症度分類について検討を進め、これを確立し、疫学調査等に利用できるようにする。

（倫理面への配慮）

所属施設内に動物管理施設の倫理委員会、或いはそれに類似した委員会等が置かれているところでは、その承認の下に実験を行う。また、倫理委員会等が設置されていない施設では、実験に際し動物に十分な麻酔を行う等、動物に苦痛のないように配慮する。人における臨床的研究（血液を用いた研究に関して同様に）については、それぞれの施設の規則に則り、十分な説明と同意のうえ行う。

C. 研究結果

病因解明として液性免疫によるモデル動物の作成が順調に進捗した。内耳蛋白のプロテオーム解析が2次元電気泳動マッピングによって進行し、新しい内耳蛋白の特徴が見いだされた。遺伝子レベルの動物実験に引き続き、新しい展開としてメニエール病

患者に対する遺伝子解析に手がつけられた。

診断基準と治療指針の策定に関して構成したワーキンググループの作業が軌道にのった。今後基準の新しい面からの構築を行い、実際にこれを用いて診断や治療を行う。また、基礎実験で内耳自己抗体の特定がすすんでいるが、これが特定されれば、診断基準に内耳自己抗体の証明の項を入れることにより確定診断が可能になる。治療に関しては、予防（免疫抑制剤やフリーラジカル抑制剤の使用）に関する単一施設での治験により、一定の結論が引き出されている。動物実験で予防に関するデータが蓄積されており、今後メニエール病患者の発作予防に関する治験が進められることになった。疫学分析に関しては、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）の調査を引き続き行い、過去の同地域での結果との比較を行った。各研究者の施設における患者数やその動態を観察し、多地域、多施設の結果として特定地域での結果と比較が行われたが更に対象の患者数を増加させる必要がある。

D. 考察

病因解明については、内耳免疫、内耳プロテオーム解析、遺伝子解析等から、その本質にかなり近づいたものと評価できる。しかし、これらの研究も更に、最終段階の詰めが必要である。また、病因の解明は、その予防や治療に直結する必要があるが、これらに関しては継続的研究が必要である。

治療法・予防法に関しては、本研究班が最も大切にしているテーマの一つである。今までに行われなかった、内耳病態に対する新しい治療概念やその基礎的・臨床的裏付けとなる研究が行われたことは大いに評価できる。特に、内耳病態に関係する活性酸素の消去等に関する研究は注目に値する。生活環境（ストレス）との関係を含めた予防法の確立のためにも、今後更に追求すべき課題である。

本研究班で行われた重症度分類作成は、本疾患の予後等を考える上で重要である。学会でもこの分類が検討され、研究班でも改訂を進める予定である。この分類は、予防や治療を考える上に極めて大切である。

疫学調査には地道な努力が必要であるが、幸い本研究班では長期に亘り蓄積された疫学の財産がある。これを、土台にしつつ3年間に新たなデータを追加できたことは、今後の調査研究にとって高く評価できる。また、遅発性内リンパ水腫の疫学は、今

後データの蓄積が必要である。

E. 結論

メニエール病と遅発性内リンパ水腫の原因、特にメニエール病の原因に関しては国内外で多くの研究があるが、依然として不明である。しかし、その原因として内耳の免疫応答が関与している可能性が高く、この点について過去3年間に亘り研究を行い成果が現れてきた。今後、動物実験による検討をさらに進めると同時に患者血清から自己抗体の蛋白を同定する。

一方、内リンパ水腫が発生する原因として患者の水代謝異常が考えられ、内耳に存在する水チャンネルの遺伝子レベルでの解析を行ったが、新しい面からのアプローチとして期待できる。原因究明は極めて重要であるが、同時に診断を明確にするために診断基準を見直し、治療法や予防法の開発に役立てなければ意味がない。特に予防法に関しては基礎的資料もないのが現状である。そこで、基礎的研究から得られた情報を参考にしながら治療法と予防法について一定のものを策定し、これを各研究者の施設で臨床で用いて、その結果を評価しつつ改訂する作業を行いつつある。

疫学的調査、特にメニエール病については北欧を中心とした調査がある。しかし、これらは人種、文化の違い等のため、あくまでも参考にしかならず、本邦での根気強い調査が必要である。本研究班でも長期に渡る調査結果が蓄積されているが、今後もこれを継続する必要がある。これらの調査結果がより明確になることによって、病態の予防等に貢献できるものと思われる。一方、遅発性内リンパ水腫については世界的にも資料がなく、本研究班での結果がより重要になる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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* 1535 : 258-265,2001
- Ito J, Murata M, Kawaguchi S. Regeneration and recovery of the hearing function of the central auditory pathway by transplants of embryonic brain tissue in adult rats. *Exp Neurol* 169 : 30-35,2001
- Kubo T, Yamamoto K, Iwaki T, Doi K, Tamura M. Different forms of dizziness occurring after cochlear implant. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 258 : 9-21,2001
- 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* 121 : 254-256, 2001.
- Takumida M, Anniko M, Popa R, Zhang DM : Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 121 : 342-345,2001
- Murofushi T, Shimizu K, Takegoshi H, Cheng PW : Diagnostic value of prolonged latencies in the vestibular evoked myogenic potentials. *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg* 127 : 1069-1072, 2001.
- Mizukoshi K, Shojaku H, Aso S, Asai M, Watanabe Y : Meniere's disease and delayed endolymphatic hydrops in children. *Acta Otolaryngol (Stockh) Suppl* 545 : 6-9,2001
- Kitahara T, Takeda N, Mishiro Y, Saika T, Fukushima M, Okumura S, Kubo T : Effects of exposing the opened endolymphatic sac to large doses of steroids to treat intractable Meniere's disease. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110 : 109-112, 2001
- Shigeno K, Kumagami H, Kobayashi T : Intratympanic streptomycin for Meniere's disease. Long-term follow-up. *Meniere's Disease 1999 Update.* (Sterkers O, Ferrary E, Dauman R, Sauvage JP, Tran Ba Huy P eds) pp669-676, Kugler Publications, 1999
- Suzuki M : Functional physiology of the semicircular canal ampulla. *Biological Sciences in Space.* (in press)
- Takeda T, Takeda S, Kitano H, Okada S, Kakigi A : Endolymphatic hydrops induced by chronic administration of vasopressin. *Hearing Res* 140 : 1-6, 2000
- Tomiyama S: Th1 mediator lymphocytes of experimental autoimmune labyrinthitis. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 121 : 673-8,2001
- Xia A, Kikuchi T, Hozawa H, Katori Y : Expression of connexin 26 and Na, K-ATPase in the developing mouse cochlear lateral wall : functional implication. *Brain Res* 846 : 106-111,1999

2. 学会発表

- Ikezono T, Omori T, Ichinose S, Shindo S, Pawankar R, Watanabe A, Yagi T : Proteomic analysis of the inner ear identified the COCH protein as the major component of inner ear protein. *Molecular Biology of Hearing and Deafness 2001, USA*
- Ito J, Kawaguchi S, Kojima K : Survival of neural stem cells in the inner ear. 21th Barany Society Meeting 2000, Sweden
- Kubo T, Yamamoto K, Mamoto Y, Iwaki T. Significance of vestibular function in cochlear implant patients. *The Second Congress of Asia Pacific Symposium on Cochlear Implant and Related Sciences 1999, Korea*
- Takumida M, Yajin K, Anniko M, Popa R: Nitric oxide and inner ear disorders. 37th Workshop on Inner Ear Biology 2000, Sweden
- Murofushi T, Shimizu K, Takegoshi H, Matsuzaki M, Ohki M : Galvanically evoked myogenic potentials on the neck muscle. *The 20th Barany Society Meeting 2000, Sweden*
- Watanabe Y, Zhang RL, Shojaku H : Distribution of afferent fibers projections within the vestibular nucleus, which responds to intense sound. 21st Barany

- Society Meeting 2000, Sweden
- Kitahara T, Fukushima M, Takeda N, Saika T, Uno A, Moriwaki K, Okumura S, Kubo T : Role of cholinergic mossy fibers in vestibular compensation. 24th Annual ARO Midwinter Meeting 2000, USA
 - Shigeno K, Kumagami H, Kobayashi T : Intratympanic Streptomycin therapy for Meniere's disease-Long follow-up. 4th International Symposium on Meniere's Disease. 1999, France
 - Suzuki M : Physiology of the vestibular system-Experimental study using isolated semicircular canals. 4th European Congress of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery 2000, Germany
 - Takeda T, Sawada S, Takeuchi S, Kitano H, Kakigi A. Expression of aquaporin-2 and its regulation by vasopressin in the inner ear. 38th Workshop on Inner Ear Biology. 2001, Italy
 - Tomiyama S : Assessment of organ specific autoantigen in experimental autoimmune labyrinthitis by mini whole gel eluter. 38th Workshop on inner ear biology. 2001, Italy
 - Hozawa K : Glycobiology in tectorial membrane International Otopathology Meeting 2000, USA

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
なし

II. 分 担 研 究 報 告

研究要旨 2次元電気泳動を用いたプロテオーム解析は内耳の生理、病理を探る上で非常に有用な手法である。我々は内耳プロテオーム解析に着手し様々な新知見を得た。DFNA9の原因遺伝子、COCHの蛋白産物Cochlinは、内耳の構成蛋白の70%を占めること、Cochlinは3つの異なったN末端を持ち、分子量がそれぞれ63kDa、44kDa、40kDaの3種類のアイソフォームp63、p44、p40に分類されること、ヒトDFNA9患者にみられる突然変異部位は全てp63にのみ含まれており、その他のアイソフォームには含まれていないことが判明した。さらにこの突然変異部位はCOCH遺伝子のLCCL領域のみにみられており、このLCCL領域がCOCH遺伝子の機能に重要な部分であることを明らかにした。Cochlin蛋白に対する抗体を作成し、免疫組織学的な検討を行ったところ、アイソフォーム特異的な組織内発現パターンを示した。今後、COCH遺伝子発現の制御機構を解明していく予定である。

A. 研究目的

現在内耳の構成蛋白の解析を進めており2次元電気泳動上の約140個のスポットの内、30%の解析を終了した。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した。さらに、抗COCH蛋白抗体を用いて免疫組織学的な検討を行い、2次元電気泳動で得られた結果と組織学的な所見とを対比させた。

B. 研究方法

1. 内耳組織の2次元電気泳動

（内耳組織を採取する際に蝸牛、耳石、半規管それぞれ別々に採取したものも検討に加えた。また、過去に報告されている内耳の電気泳動パターンとも比較検討した。）

2. 各スポットのアミノ酸配列を解説

3. 結果を遺伝子・蛋白データベースをもちいて解析

4. タンパクの内部構造の解析

5. 抗COCH蛋白抗体を2種類作成しアイソフォームごとの発現を免疫組織学的に検討

（倫理面への配慮）

倫理委員会の承認の下に実験を行った。

C. 研究結果

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Cochlinについて以下のことを明らかにした。

1. 内耳の構成蛋白の70%を占める。

2. Cochlinは3つの異なったN末端を持ち、分子量がそれぞれ63kDa、44kDa、40kDaの3種類のアイソフォームp63、p44、p40に分類される。

3. それらのアイソフォームはさらに等電点が異なる合計で16個の蛋白から構成されている。

4. ヒトDFNA9患者にみられる突然変異部位は全てp63にのみ含まれておりp44、p40には含まれていない。

5. さらに、この突然変異部位はCOCH遺伝子のLCCL領域のみにみられており、このLCCL領域がCOCH遺伝子の機能に重要な部分であることが予測される。

6. 抗LCCL配列抗体、抗Cochlin抗体を用いて免疫染色を行った。ラセン板縁、ラセン靭帯は両抗体で強く染色された。蝸牛軸の神経周囲は、抗LCCL配列抗体のみで染色された。

7. 過去の内耳2次元電気泳動結果との比較を行ったところ、特に蛋白抽出条件が重要であった。

8. 内耳部位別2次元電気泳動を行い、部位特異的な蛋白を検出した。

D. 考察

常染色体優性遺伝性難聴を呈するDFNA9の内耳病理所見がKhetrapalにより1991年に報告された。原因遺伝子はRobertsonらによって1998年にCOCHであると報告された。この遺伝子が作る蛋白はCochlin（COCH蛋白）と命名されている。DFNA9はヒト病理所見、原因遺伝子、臨床所見が報告されている数少ない遺伝性難聴である。しかし

ながら、COCH遺伝子の機能はいまだ明らかにされていない。一般に分子生物学ではそのアミノ酸配列のモチーフ解析から機能を推測するという手法がとられている。COCH遺伝子には3つのモチーフが存在する。

1. Signal Sequence

2. LCCL module

2000年にハンガリーのグループにより命名された新しいモチーフである。機能はまだ不明である。下記の3つの遺伝子に含まれている事からこの名前がつけられた。

・Limulus factor C：自然免疫能に関与 血液凝固

・COCH：聴覚・平衡

・LGL1：ラットの肺の発生に関与

3. vWF (フォンビルブランド因子) typeA

domain：下記に示すような多様な蛋白にみられるモチーフである。

・分泌性蛋白 (可溶性、非可溶性)：止血系 (vWF)、補体系 (C2、factorB)、免疫系 (LFA-1, MAC-1etc) など。

extracellular matrix (CMP, Collagen 6.7.12.

14) fibrillar collagens, glycoproteins, proteoglycans への結合作用があることが知られている。

このモチーフ解析の結果からC末端の vWF type A domain がコラーゲンに結合し、N末端部分の LCCL module がなんらかの重要な機能を担っているのではないかと我々は推測している。

我々の研究の結果、COCH遺伝子発現の異質性が確認された。この異質性をもたらす原因として

・遺伝子の転写レベルでの調節 alternative splicing, exon skipping,

・翻訳後の修飾P63-p40変換酵素の存在、化学的修飾 (リン酸化 糖鎖の付加など) などの可能性を考え検討を加えている。

また組織学的な検討の結果から、COCH遺伝子は内耳の支持組織に特異的に発現していることが判明した。さらにそのアイソフォームはそれぞれ特有のメカニズムで転写制御されていることが示された。この転写制御はCOCH遺伝子プロモーター、エンハンサー領域に起因すると考えられる。現在、難聴の新たな治療法として内耳遺伝子治療が注目されている。実際にこの治療法が施行されるためには、内耳特異的な発現調節が求められる。COCH遺伝子の発現制御の研究およびプロモーターのクローニングは内耳の遺伝子治療に新たな道を開く重要なアプロー

チと考えられる。

E. 結論

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。我々はこのテクニックを応用し、以下のテーマで実験を計画している。

・COCH以外の難聴、めまいにかかわる遺伝子の解析

・正常内耳と病的内耳の比較

・微小重力、過大重力下の蛋白発現の比較

・発生過程における蛋白発現の動態

・外リンパの解析

・内耳自己免疫疾患の自己抗原の同定

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・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 1535 : 258-265,2001

2. 学会発表

・池園哲郎、大森彬、齋藤明彦、新藤晋、大久保公裕、ルビーパワンカール、八木聡明：内耳自己抗原の同定。第19回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 2001 大阪

H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む。)

なし

研究要旨 本研究の目的は動物を用い、幹細胞を内耳に移植して内耳有毛細胞を再生させ、平衡障害と高度感音難聴の治療という将来の臨床応用を目指すものである。本研究では神経幹細胞を内耳に移植し、その一部が内耳有毛細胞に分化することを確かめた。さらに内耳由来の幹細胞をクローン化することにも成功した。

A. 研究目的

目的その1は神経幹細胞を内耳（特に薬物その他で内耳の有毛細胞に障害を与えた動物の内耳）に移植し、神経幹細胞が内耳の環境で生存し続けるか、また内耳有毛細胞に分化するかどうかを検討することである。

目的その2は内耳由来の幹細胞（内耳有毛細胞になりうる前駆細胞）を取り出し、クローン化することが出来るかどうかを検討することである。

B. 研究方法

その1. 内耳に移植する幹細胞としてラットの海馬由来神経幹細胞を用いた。この細胞にレトロウイルスベクターを用いてβガラクトシダーゼ蛋白が発現するべく操作を加えると、移植した先でドナー細胞を同定できることが可能である。海馬由来神経幹細胞を新生ラット（生後2～3日）の内耳内に投与した。投与2～4週間後、動物を還流固定し、内耳を摘出、連続切片を作って抗βガラクトシダーゼ抗体、内耳有毛細胞の特異抗体であるファロイジンなどで反応させた。

その2. ラット胎仔（受精後11日目）の耳胞より細胞群を取り出し、分散培養系で限界希釈法を用いて内耳幹細胞のクローン化を試みた。

C. 研究結果

その1. 内耳に神経幹細胞を投与して2～4週間後、前庭・蝸牛の内部に海馬由来神経幹細胞が一塊となって見出され、神経幹細胞が移植後数週間経っても生着し続けることが分かった。ある動物では神経幹細胞が有毛細胞上に生着し、場合により一部有毛細胞に置き換わっているのではないかという所見も見られた。

その2. 胎仔の耳胞から内耳幹細胞を取り出すことができた。さらにそれらの幹細胞は3種類の cell

lineのものが同定された。

D. 考察

近年幹細胞を移植のドナーとして使用しようとする試みは数多くなされており、哺乳動物でも種々の部位から幹細胞が抽出されている。海馬由来神経幹細胞は、動物実験の段階では中枢神経系の様々な部位に移植されている。障害を与えた内耳に神経幹細胞を移植した際に、神経幹細胞の一部が形態学的には内耳有毛細胞と類似の細胞に分化した。また、内耳由来の幹細胞を抽出、培養、さらにクローン化できたので、内耳幹細胞は神経幹細胞よりも内耳に対する移植の可能性は高まると考えられる。

E. 結論

海馬由来神経幹細胞が内耳有毛細胞に対する移植・再生のドナーの候補となりうることを意味する。さらに効率のよい移植のドナー候補として内耳由来幹細胞が使用できる可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・Ito J., Kojima K. Takahashi M. and Kawaguchi S.: Survival of neural stem cells in the inner ear. Acta Otolaryngol (Stockh) 121:140-142, 2001
- ・Ito J., Murata M. and Kawaguchi S.: Regeneration and recovery of the hearing function of central auditory pathway by transplants of embryonic brain tissue in adult rats. Exp. Neurology 169 : 30-35, 2001
- ・伊藤壽一：聴覚系の再生 耳鼻臨床 94,17, 2001

2. 学会発表

- ・伊藤壽一：内耳感覚細胞再生による平衡障害の改善 第60回日本めまい平衡医学会総会
(2001.11.30-12.1,東京)

H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）

なし

研究要旨 末梢性めまいの原因、病態、治療について研究した。末梢性めまいとして、人工内耳術後におこるめまいおよびメニエール病を対象とし、前者の年次別発生頻度、失聴原因別頻度について検討し、近年の傾向を報告した。メニエール病については、3種の遺伝子について異常の有無を解析し、KCNE1ではsingle nucleotide polymorphisms (SNPs) を有する事を報告した。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、その有用性を検討した。

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

人工内耳術後のめまいについて解析をした。また、メニエール病の確実例における遺伝子異常を調べ、新しい治療法としてのゲンタマイシン中耳腔投与の有用性と問題点とを検討した。

C. 研究結果

- 1) 人工内耳術後におこるめまいは、近年減少してきており小児例の増加と逆の相関を示していた。また、失聴原因により発生頻度に差がみられ、術前の前庭機能に最も影響されることが示唆された。
- 2) メニエール病患者の血液から、3種類の遺伝子(GJB2, COCH, KCNE1)異常を調べた。その結果、前2者の遺伝子の異常はみつからなかったが、KCNE1遺伝子変異が20例にみられた。しかし、この異常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) 29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、うち経過を追うことのできた25例でその有用性を検討した。治療後めまい発作が消失した例は15例で、有効率は60%であった。

D. 考察

人工内耳術後のめまいは、小児例の増加に伴い減少してきている。今後、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。メニエール

病確実例の発症には、いくつかの異なった遺伝子の変異が関与する可能性があるが、今回の検討では責任遺伝子を明らかにすることはできなかった。重症型メニエール病に対するゲンタマイシン治療法は、長期的にも50%以上の有効性をもち、副作用としての聴力障害の発生も軽度であった。

E. 結論

人工内耳術後のめまいは近年減少傾向にある。メニエール病確実例に特有の遺伝子異常は今回の検索ではみつからなかった。ゲンタマイシン治療法は、めまいに有効で聴力障害の発生も少なく極めて有用な治療法である。

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 (2001) 258 : 9-12.
- 久保武. めまい疾患の概要. 脳21 2001 4: 41-44
- 久保武. メニエール病の外科的治療. 耳鼻咽喉科プラクティス (文光堂) 2001 140-143
- 布施愉香, 土井勝美, 松代直樹, 川島 貴之, 澤田亜也子, 日比野浩, 久保武: 非症候性感音難聴における遺伝子解析-GJB2遺伝子スクリーニング法の開発 - 耳鼻臨床 2001 94 : 649-656.
- Matsushiro N, Doi K, Fuse Y, Nagai K, Yamamoto K, Iwaki T, Kawashima T, Sawada A, Hibino H, Kubo T : Successful cochlear implnatation in prelingual profound deafness resulting from the common 233delC mutation of the GJB2 gene in the Japanese. Laryngoscope 2002 112 : 255-261

2. 学会発表

- ・土井勝美：難聴・メニエール病患者ゲノムの遺伝子解析 第71回社団法人大阪府耳鼻咽喉科医会研修会（2001.10.27）
- ・土井勝美、布施愉香、松代直樹、西池季隆、堀井新、宇野敦彦、久保武、西村将人、雑賀孝昇：メニエール病の遺伝子解析（第1報） 第276回日本耳鼻咽喉科学会大阪地方連合会（2001.3.10）

G. 知的所有権の取得状況

なし

研究要旨 1) モルモットで一側前庭障害モデルを作成し、浸透圧ポンプで蝸牛基底回転鼓室階からベタメタゾンを1週間連続微量注入した。本群は回転後眼振数やVORゲインで、生食のコントロール群に比べ回復が有意に早くかつ安定していた。2) 内リンパ水腫128例で病態進行の規則性を調べた。早期の低音障害は改善しやすいが再発しやすく（確率40%前後）、この過程で4%が高音障害に移行し、この13%が全音域障害に進行することが判明した。3) 内リンパ水腫例に症状の苦痛度、発症誘因、発症と増悪へのストレスの関わりをアンケート調査した。苦痛度は罹病期間と共に増悪し、多忙、睡眠不足、職場対人関係、家庭トラブルが発症誘因の77%を占めた。ストレスの関わりを高率に自覚していた。4) 平成12年度に実施した大企業のアンケート調査をさらに詳細に分析し、内リンパ水腫患者群と比較した。5) コリオリ刺激下の起立トレーニングを20名で9日間行った。半数以上が200度/秒で起立可能となり、視覚の影響は少なく、揺らぎではなく回転空間に適應していた。

A. 研究目的

- 1) ステロイドやATP製剤の内耳血直接投与が末梢前庭機能に与える影響を解明する。
- 2) メニエール病や急性低音障害型感音難聴の病態進行における規則性を明らかにする。
- 3) 内リンパ水腫患者の自覚的な苦痛度を評価し、罹病期間や病態進行度との関係を明らかにする。同時に発症や症状増悪へのストレスの関わりを調査する。
- 4) 内リンパ水腫の発症や増悪に占めるライフスタイルや行動特性の役割をさらに明らかにするために、調査項目別に患者群と一般群を比較する。
- 5) 健康者にコリオリ刺激トレーニングを課し、回転空間における適応および獲得能力の性質を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) モルモットに一側前庭障害モデルを作成し、浸透圧ポンプによるステロイドの持続微量投与が回復過程に与える影響を、回転後眼振を指標としてコントロールと比較した。
- 2) オーディオグラムを元に病態進行度を4段階に分類し、内リンパ水腫128例407件の経時的な進行度の変化を調べた。
- 3) 症状の苦痛度と日常活動の制限、気分転換手段の効果、発症や増悪へのストレスの関わりを、それぞれ4段階に分類し、郵送アンケートで内リンパ水腫患者91名で調査した。同時に自覚的な発症誘因を調べた。

- 4) 大企業の勤労者3410名と内リンパ水腫患者127名でアンケート調査表のライフスタイル、行動特性、気分転換手段を比較した。
- 5) 健康被験者20名でコリオリ刺激下の20分の起立トレーニングを、50度/秒から連日20度/秒ずつ速度を上げて9日間実施した。裸眼群10名と閉眼群10名でトレーニング曲線と獲得能力を比較した。

C. 研究結果

- 1) 障害後急性期にステロイド、ATPを内耳に直接投与することで、ともに回転刺激に対する反応性が向上した。前庭機能評価のシステムの改良で、動物モデルの前庭眼反射の利得の解析が可能となった。本法を利用して、ステロイド投与後、長期的には前庭眼反射の利得の改善が認められた。
- 2) 低音障害160件のうち40.6%は正常に改善し、55%が不変、4.4%が高音障害に悪化した。正常102件のうち62.7%は正常を維持し、37.3%が悪化した。高音障害84件のうち81%は不変、13%がさらに悪化し、6%が改善した。全音域障害61件の大多数（95.1%）は不変であった。
- 3) 耳圧迫感、めまい、耳鳴、難聴いずれもしばしば苦痛、常に苦痛の割合は罹病期間と共に増加し、10年を超える群で最も高かった。発症1年以内は苦痛改善の割合が高いが、1年を超えると何らかの苦痛の持続する傾向があった。現時点の日常活動制限は1年以内ではゼロ、これを超えると10-15%であった。発症や増悪へのストレスの

関わりや、気分転換による症状の改善を多数が自覚していた。誘因は睡眠不足、多忙、職場対人関係、家庭内トラブルが上位を占め、これらで全体の77%を占めた。

- 4) 患者群は一般勤労者群に比べ、行動特性、ストレス源、身体症状の点数が有意に高かった。睡眠時間は両群に差がないが、睡眠不足の自覚は患者群で有意に高かった。行動特性や気分転換手段の細項目の中に、患者群や勤労者の身体症状と関係の深い項目と薄い項目のあることが判明した。
- 5) 裸眼と閉眼を問わずトレーニング9日目には、半数以上が200度/秒のコリオリ刺激下で起立可能となった。トレーニング終了後に回転方向を逆転すると、開始前の状態に悪化した。トレーニング中と異なる頭部側方傾斜でも起立能力は向上していた。

D. 考察

- 1) ステロイドやATPは末梢前庭機能の回復を促進し、左右の前庭機能のバランスがよりとれた状態へと導いた。また、我々が開発した眼球運動画像解析システムの有効性が証明された。
- 2) 低音障害の改善と改善後の再発はほぼ同率の40%であった。改善と再発を反復する過程で少数が高音障害に進み、一旦ここに進むと大多数が不変となり、年余のうちに全音域障害に進む。早期の再発予防が治療の要であることが裏付けられた。
- 3) 症状の苦痛度は過去最重症時と現在を問わず、罹病期間や病態進行度とほぼ平行関係にあった。1年を超えると少なくとも1症状の苦痛が続き、3年を超えると不可逆病変の割合が急増し、早期治療の重要性が示唆された。患者多数がストレスを誘因と感じ、罹病期間が10年を超えると92%に達すること、ストレス対策が有効なことは、今後の治療の指針を示している。
- 4) 行動特性、ストレス源、身体症状の点数全てで患者群が勤労者群を有意に上回り、環境と資質(性格)が疾患背景にあることが裏付けられた。細項目では感情や時間にゆとりのない行動特性や良い子行動、汗を流す機会がない、相談できる上司や同僚がいる、の項目がリスクファクターであった。まとめると、環境や他人の評価に依存し過ぎる傾向と、肉体的活動の不足が発症や増悪要因と言える。
- 5) トレーニング曲線からコリオリ刺激下の起立上限速度は200度/秒をはるかに超えること、適応

に視覚は不要なこと、適応は特定の揺らぎではなく回転空間に対して生じることが判明した。これらの空間識の解明に貴重な示唆を与える。

E. 結論

- 1) 急性めまい例に対するステロイドやATP製剤の投与は、急性期のめまい感を軽減し、長期的には動揺視の減弱効果に結びつく可能性が示唆された。我々が開発した前庭機能評価法で、種々の薬剤の効果判定が可能となった。
- 2) 病態進行度という新しい概念の導入は、内リンパ水腫のいわば履歴書を明らかにした。可逆的病態の早期に、再発予防を逸すると病態が進行する実体が判明した。
- 3) 各症状の苦痛度を4段階に評価する試みは、オージオグラムやカルテ記載よりも基準が統一され、客観性があることが判明した。また早期のストレス対策の治療効果が裏付けられた。
- 4) 発症や増悪に性格的要因や環境要因の関わることを、かなり具体的に明らかになった。心身症としてのメニエール病やストレス対策の重要性が裏付けられた。
- 5) トレーニング過程で脳内に台と同方向の回転ベクトルを仮定すると、慣性入力が無力化され、コリオリ刺激に対する短期間の適応を説明できる。宇宙空間の適応にも基本的に共通の原理が働くことと推測される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ・菅原一真, 山下裕司, 下郡博明, 池田卓生, 橋本誠, 奥田剛, 高橋正紘: 職場にストレス源をもつメニエール病例. *Equilibrium Res* 2001; 60: 211-6.
- ・Takahashi M et al: Analysis of lifestyle and behavioral characteristics in Meniere's patients and a control population. *Acta Otolaryngol* 2001; 21:254-6.
- ・高橋正紘: めまいの診断—診断の変遷、診断基準の見直し—. *医薬ジャーナル* 37:115-119, 2001.
- ・高橋正紘ほか: メニエール病の生活指導. *耳鼻咽喉科診療プラクティス*. EBMに基づくめまいの診断と治療. 文光堂、東京、2001; p134-8.
- ・高橋正紘: メニエール病の謎. *耳鼻臨床* 2002; 95: 210-1.

2. 学会発表

- ・高橋正紘：メニエール病の重症度分類と治療. 第60回日本めまい平衡医学会総会 (2001. 11. 30-12. 1, 東京)
- ・小田桐恭子、高橋正紘、大貫純一、飯田政弘、石田克紀、山下裕司、菅原一真：内リンパ水腫患者における行動特性とストレス源の分析. 第60回日本めまい平衡医学会総会 (2001. 11. 30-12. 1, 東京)
- ・大貫純一、高橋正紘、大貫純一、飯田政弘、小田桐恭子、石田克紀、山下裕司、菅原一真：内リンパ水腫発症要因とライフスタイル. 第60回日本めまい平衡医学会総会 (2001. 11. 30-12. 1, 東京)
- ・大谷 恵、石橋和也、石井秀明、小林 修、高橋正紘、飯田政弘：トレーニング条件と獲得機能. 第60回日本めまい平衡医学会総会 (2001. 11. 30-12. 1, 東京)
- ・石橋和也、大谷 恵、石井秀明、小林 修、高橋正紘、飯田政弘：空間識適応における視覚の役割. 第60回日本めまい平衡医学会

G. 知的所有権の取得状況

なし

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、内耳障害を軽減する薬剤の新しいスクリーニング法を開発し、それを用いて薬剤の効果とその併用方法を検討した。その結果、フリーラジカル阻害剤とニューロトロフィンあるいはカルパイン阻害剤との併用により治療効果が増強することが明らかとなった。これらの結果をもとにメニエール病の治療に活性酸素消去剤を応用した結果、良好な治療成績を挙げることができ、今後の治療への応用が期待された。

A. 研究目的

メニエール病の治療法の開発を目的に、基礎的には内耳障害を軽減させる薬剤のスクリーニング法を開発し、それを利用して、各種薬剤の内耳障害の予防効果の比較、効果的な併用方法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に抗酸化剤を応用し、その効果を検討した。

B. 研究方法

基礎的研究としてモルモット内耳でのNO、ROSの産生をDAF-2DAとDHTMRosを併用した新手法を用いて直接的に解析し、*in vitro*でLIVE/DEAD systemを用いてゲンタマイシン（GM）による内耳感覚細胞障害のL-NAME、D-methionine、BDNF、leupeptinによる軽減作用、併用効果を中心に検討した。

臨床的にはコントロール不良のメニエール病患者17例を対象とし、レバミピド（300mg/日）、ビタミンC（600mg/日）、グルタチオン（300mg/日）などの抗酸化剤を8週間以上投与し、その効果を検討した。

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、臨床では十分なインフォームドコンセントを行い同意の得られた患者を対象とした。

C. 研究結果

1) 薬剤の選択・スクリーニング

今回、末梢前庭器でのNO、ROSの産生と各種薬剤による影響を*in vitro*の系で検討した結果、末梢前庭器ではGM刺激により感覚細胞、血管でNOの、感覚細胞でROSの産生が認められた。

GM刺激によるNO、ROSの産生はL-NAMEの投与では、NOの産生はほぼ完全に阻害された

が、ROSの産生には変化は認められなかった。これに対して、D-methionineやBDNFは、ROSの産生を半分程度に抑制したが、NOの産生は有意に ($p<0.01$) 増加した。また、leupeptinの投与ではNO、ROSいずれの産生にも変化は認められなかった。

2) 薬剤の併用効果

今回 LIVE/DEAD system を使用し、GMによる感覚細胞の生存率の低下に及ぼす各種薬剤の影響をGM投与4時間後の時点で比較した結果、GMで $19\pm 22.9\%$ に低下した感覚細胞生存率が、L-NAMEを添加することで $56\pm 12.0\%$ 、D-methionineで $56\pm 24.6\%$ 、BDNFで $63\pm 20.4\%$ 、leupeptinで $61\pm 9.9\%$ と有意に軽減された($p<0.01$) が、各種薬剤の間で生存率に有意差は認められなかった。薬剤の併用効果についての検討ではL-NAMEとBDNFを同時に併用したものでは感覚細胞の生存率は $92\pm 4.1\%$ 、L-NAME+leupeptinで $80\pm 18.5\%$ 、D-methionine+BDNFでは $80\pm 11.1\%$ と相乗効果が認められ単独投与群と比較しても有意に優れた結果 ($p<0.01$) であった。これに対して L-NAME +D-methionine では $53\pm 25.4\%$ 、BDNF+leupeptinで $61\pm 14.9\%$ と単独投与群と比較して有意差はなく相乗効果は認められなかった。

3) 抗酸化剤によるメニエール病の治療

今回の抗酸化剤によるメニエール病の治療効果はめまいに対しては著明改善：10/17、改善：4/17、軽度改善：0/17、不変：3/17、悪化0/17であり、聴力は改善：8/19、不変：10/19、悪化1/19、耳鳴は改善：11/19、不変：8/19、悪化：0/19、能力低下は改善：12/17、不変：5/17、悪化：0/17であった。また、治療効果の発現時期に関しては抗酸化剤投与開始後4週とい

う比較的早い時期で効果が認められた。さらに聴力に対する効果の周波数別の検討では125、250、500Hzでは危険率1%以下、1kHzでは危険率5%以下で有意に聴力が改善していたが、2、4、8kHzでは聴力の有意な改善は認められなかった。また、今回重症度分類を行い治療効果を検討したが、stage別での治療効果に大きな差は認められなかった。

D. 考察

内耳障害の原因には感染、老化、耳毒性薬剤など様々なものが考えられるが、近年の研究により、内耳障害をきたす場合には、その原因のいかに問わず共通した障害機構が存在することが明らかになっており、なかでもNOや活性酸素をはじめとするフリーラジカルが大きな役割を果たしている。これらの事実をもとに、実際に臨床的に内耳障害を予防・治療することを考えると、使用薬剤の選択や組み合わせ、薬剤の投与時期など、いくつかの検討項目が挙げられる。これまで内耳障害を軽減させると考えられている薬剤にはフリーラジカルの制御薬やニューロトロフィンなどがあるが、すべての薬剤を*in vivo*の系で動物に投与してその効果を検討することは現実的ではなく、なんらかのスクリーニングの方法が必要になる。この点を解決するために最初にフリーラジカルの産生に注目して薬剤のスクリーニングを行った。

今回、DAF-2DAに加えてDHTMRosと一緒に用いた結果、NOとROSの両者を同時に検出することが可能となった。この系を用いて、GM刺激によるNOとROSの発生と、すでに*in vivo*の実験で内耳障害予防効果が認められているNOS阻害剤(L-NAME)、radical scavenger(D-methionine)、ニューロトロフィン(BDNF)、calpain inhibitor(leupeptin)の効果をもとに、*in vitro*で検討した結果、leupeptin以外の薬剤はフリーラジカルの産生を抑制することが明らかとなった。これによりBDNFの内耳障害軽減作用の一部はフリーラジカルの抑制によるものであることが確認された。また、leupeptinに関してはフリーラジカルの産生に影響を与えなかったことより、フリーラジカルを介さない系でアポトーシスの抑制に関わっていると考えられた。

薬剤の併用効果については、今回、NOS阻害薬、radical scavenger、ニューロトロフィン、calpain inhibitorの併用効果を検討した結果、NOS阻害薬

とradical scavengerあるいはニューロトロフィンとcalpain inhibitorという作用機序の類似する薬剤の組み合わせでは併用効果は認められなかったが、NOS阻害剤あるいはradical scavenger+ニューロトロフィンあるいはcalpain inhibitorという異なった作用機序を有する薬剤の組み合わせでは、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。L-NAME、D-methionine、BDNF、leupeptinはそれぞれ単独で内耳障害に対する障害の軽減効果を認められているが、今回、相乗効果を上げることができる併用方法を確認できた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思われた。

これらの結果を基に、今回、メニエール病患者にレバミピドを中心とした活性酸素消去剤を投与しその効果を検討した結果、従来の治療でコントロール不良であった症例に少なからず効果をあげることができた。特に聴力に関していえば19例中8例で聴力の改善が認められた。この聴力改善効果は低音域でより著しく高音域になると効果が低下した。むしろ聴力の改善した症例のすべてが抗酸化剤の効果と考えることはできないものの今回の対象が従来の方法でコントロール不良であったことを考えると何らかの効果があつたと考えられる。今後はさらに症例を増やして検討すると共に、初回治療より抗酸化剤を加えた場合などについても検討していきたい。

E. 結論

内耳障害の治療にはフリーラジカルの制御やニューロトロフィンの投与などの薬物療法が有効であると考えられ、各種薬剤の併用投与方法の改良などによって新しいメニエール病の治療に抗酸化剤が有効となる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Anniko M, Takumida M: Functional morphology of the normal peripheral vestibular system. In Jahn AF, Santos-Sacchi J eds. Physiology of the Ear, Singular Thomson Learning, Canada, pp481-514, 2001.
- 工田昌矢: 前庭星野知之 編、CLIENT 21内耳・内耳道、中山書店、東京、pp30-40,2001
- Takumida M, Anniko M: Nitric oxide in guinea pig vestibular sensory cells following

- gentamicin exposure in vitro. Acta Otolaryngol 121 : 346-350, 2001.
- Takumida M, Anniko M, Popa R, Zhang DM: Pharmacological models for inner ear therapy with emphasis on nitric oxide. Acta Otolaryngol 121 : 16-20, 2001.
 - Takumida M, Anniko M : Direct evidence of nitric oxide production in the guinea pig organ of Corti. Acta Otolaryngol 121:342-345,2001.
 - Takumida M, Anniko M : Detection of nitric oxide in guinea pig inner ear, using a combination of aldehyde fixative and DAF-2DA. Acta Otolaryngol 121 : 460-464, 2001.
 - Takumida M, Anniko M : Brain-derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase Inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity. Acta Otolaryngol (Stockh) 121 : in press
 - Takumida M, Anniko M : Simultaneous detection of both nitric oxide and reactive oxygen species in the guinea pig vestibular sensory cells. ORL : in press

2. 学会発表

- 工田昌也、夜陣紘治：ゲンタミシンによる前庭感覚細胞障害のL-NAMEとBDNFによる予防効果。第11回日本耳科学会。平成13年10月11日、神戸。
- 工田昌也：前庭器障害とNO.シンポジウム「分子生物学的研究とめまい平衡医学」第60回日本めまい平衡医学会。平成13年11月30日、東京。
- 工田昌也：内耳病態とフリーラジカル、NO.ミニシンポジウム「内耳病態へのアプローチ」第20回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会。平成14年3月9日、松江。

G. 知的所有権の取得状況

なし