

外リンパ瘻とメニエール病の臨床像について

池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑, 小泉康雄, Charuk Hanprasertpong, 齋藤明彦, 八木聰明
(日本医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

客観的な診断マーカーが確立していないため、外リンパ瘻の確定診断はしばしば困難である。生理学的所見、病歴には外リンパ瘻特有のものではなく、他の難聴・平衡障害をきたす疾患との鑑別が常に問題となる。

現在、日本では厚生省研究班で作成した診断基準(1)が外リンパ瘻の診断に広く用いられている。一方北米ではそのような基準が存在せず、研究者によって診断基準が異なっている(2)。また、メニエール病(3-7)や、小児進行性感音難聴(8-11)との鑑別診断を強調している報告もある。外リンパ瘻について文献的に検討し日本と北米の報告の差異を考察した。

【結果】

1. ほとんどの報告では、手術中の外リンパ漏出の確認をもって外リンパ瘻の確定診断としている。北米の一部の報告では、手術によって聴力改善が得られることを外リンパ瘻診断の根拠としていた(6)。

2. 北米の報告では外リンパ瘻のなかでも Non-classical type についての記載が多い。

classical type の聴覚症状は突発性難聴様、緩徐形成型突発性難聴(いわゆる slow type SD)様の発症である。外リンパ瘻の症例が蓄積されるに従い Non-classical type の聴覚症状、すなわち変動する感音難聴を呈する場合も多いことが判明してきた(2,12,13)。

平衡障害はもっとも頻繁に見られる症状である。難聴に episodic vertigo を伴う場合にはメニエール病との鑑別が大きな問題となる(3,4,5,6,7)。

3. 北米の報告では外リンパ瘻手術症例の罹病期間が長い。

北米のいわゆる「エクスペリアンスシリーズ」では表1のように平均罹病期間が3-4年、その範囲は1日から数十年にわたっている。日本の報告と比較して、罹病期間が非常に長い印象をうける。

4. 外リンパ瘻発症の契機となったエピソード

北米の報告では、初期の報告ではアブミ骨手術後の症例が多く(3)、その後は頭部外傷(direct head trauma)が最も頻度の高い発症契機となっている。この変化は多くの報告に共通しており外リンパ瘻自体の疾患概念の変遷に伴うものと思われる(4,5,15)。

日本で広く用いられている診断基準は特発性外リンパ瘻(いわゆる spontaneous)を対象としているため(16)、診断基準に「頭部外傷」や「耳科手術」を示唆する言葉は無い(表2)。突発性難聴との鑑別に重点が置かれており、急性発症型(classical type)を対象にしている。診断基準作成以後の日本における報告では、頭部外傷性外リンパ瘻を含めない傾向がみられた(17)。

5. 小児例について

Arenberg らは2年間典型的なメニエール病症状を呈した10才の女兒が手術の結果、外リンパ瘻であった症例を報告した(7)。さらに、北米の報告では小児の進行性難聴、突発性難聴の原因として外リンパ瘻を重視している報告がみられた(8-11,14)。

【考察】

外リンパ瘻の術前診断はもっぱらその病歴に基づいて行われている。このため、外リンパ瘻の取り扱いを担当医師の経験、医学的知識、考え方によって大きく左右されているのが現状である(18)。

報告により外リンパ瘻の定義に差が見られる北米の報告(2)にたいして、日本においては厚生省研究班が定めた「外リンパ瘻診断基準」がひろく普及している。このため本邦では疾患概念のばらつきが少なかった。

「外リンパ瘻診断基準」は特発性外リンパ瘻を対象としているため、日本の報告では頭部外傷後の発症症例の報告が少ない傾向がみられた。急性発症型で classical type の外リンパ瘻は突発性難聴との鑑別が問題となる。これに対して、non-classical type の外リンパ瘻、つまり慢性に経過する症例ではメニエール病との鑑別が必要となる。北米の報告でメニエール病と外リンパ瘻の鑑別が特に強調されているのは、慢性外リンパ瘻症例を念頭に置いているためと思われる。このことは、手術症例の罹病期間が長いことに顕著に表れており、日本ではほとんど発症一ヶ月以内に手術を行っているのに対して、北米では罹病期間の平均値が3-4年と長期である。

メニエール病の日常臨床において、

- ・頭部外傷の既往の有無
 - ・特発性外リンパ瘻の誘因となるようなエピソードの後に発症していないか
 - ・中耳圧、脳脊髄圧の変動を来すような行動をとった場合に症状が増悪するか否か
- 等についても注意深く問診することが必要と思われた(19)。

表1

	全症例	漏出有り	Hit rate%	罹病期間平均	罹病期間範囲
1986 Iowa(3)	214	121	57	—	1日から23年
1988 Stanford(4)	78	33	51	平均4年	1日から28年
1991 House(14)	86	35	41	平均3年	—
1991 Portland(15)	90	79	88	平均3.7年	1日から34年
1997 WashingtonDC(5)*	197	55	28	中央値3.1年	1日から40年

*「10dB以上改善をPLFと定義」すると86%が該当

表2

外リンパ瘻の診断基準 平成2年度(案)

1, 確実例

手術(鼓室開放術), 内視鏡等により前庭窓, 蝸牛窓のいずれかまたは両者より外リンパあるいは髄液の漏出を確認できた例, 又は瘻孔の確認できた例

2, 疑い例

髄液圧, 鼓室圧の急激な変動を起こすような誘因の後に, 耳閉塞感, 難聴, 耳鳴, めまい, 平衡障害などが生じた例

註1: 力み, 重い物を持ち上げた, 鼻かみ, 怒責, 潜水, 飛行機旅行などが誘因となる。

註2: 症状は全部そろわなくてもよい。いずれか一つのこともある。

註3: 再発する症例もある。

註4: 次のような症状を伴うことがある。

- 1) パチッという音(pop音)が聞こえた
- 2) 感音性難聴が, 数時間あるいは数日かけて生じた。ときに変動する。
- 3) 急性発症の難聴があつて, 「水の流れるような耳鳴り」あるいは「水の流れる感じ」がある。
- 4) 外耳, 中耳の加圧, 減圧などでめまいを訴える。
- 5) 動揺感が持続し, 患側下で頭位眼振がみられる

【参考文献】

- 1) Kanzaki J. Diagnostic criteria for acute profound deafness. *Acta Otolaryngol* 1994;Suppl 514:7-8 (厚生省特定疾患 急性高度難聴調査研究班 平成2年度研究業績報告書 pp.20)
- 2) Friedland DR, Wackym PA. A critical appraisal of spontaneous perilymphatic fistulas of the inner ear. *Am J Otol* 1999;20:261-279.
- 3) Seltzer S, McCabe BF. Perilymph fistula: the Iowa experience. *Laryngoscope* 1986;96:37-49.
- 4) Shelton C, Simmons FB. Perilymph fistula: the Stanford experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1988; 97:105-8.
- 5) Fitzgerald DC, Getson P, Brasseur CO. Perilymphatic fistula: a Washington DC, experience. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1997; 106:830-7.
- 6) Fitzgerald DC. Perilymphatic fistula and Meniere's disease. Clinical series and literature review. *Ann.Otol.Rhinol.Laryngol* 2001;110:430-436.
- 7) Arenberg IK, May M, Stroud MH. Perilymphatic fistula: an unusual cause of of Meniere's syndrome in a prepubertal child. *Laryngoscope* 1974; 84:243-6.
- 8) Supance JS, Bluestone CD. Perilymph fistulas in infants and children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1983;91:663-71.
- 9) Weissman JL, Weber PC, Bluestone CD. Congenital perilymphatic fistula: computed tomography appearance of middle ear and inner ear anomalies. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:243-9.
- 10) Bluestone CD. Implications of beta-2 transferrin assay as a marker for perilymphatic versus cerebrospinal fluid labyrinthine fistula. *Am J Otol* 1999;20:701.
- 11) Weber PC, Bluestone CD, Perez B. Outcome of hearing and vertigo after surgery for congenital perilymphatic fistula in children. *Am J Otolaryngol* 2003;24:138-42.
- 12) Kohut RI. Perilymph fistulas. Clinical criteria. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 118: 687-92.
- 13) 深谷 卓,野村恭也. 外リンパ瘻;メニエール病との鑑別診断. *日耳鼻* 1990;93:2009-2013.
- 14) Rizer FM, House JW. Perilymph fistulas: the House Ear Clinic experience. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1991;104:239-43.
- 15) Black FO, Pesznecker S, Norton T, Fowler L, Lilly DJ, Shupert C, Hemenway WG, Peterka RJ, Jacobson ES. Surgical management of perilymphatic fistulas: a Portland experience. *Am J Otol* 1992;13:254-62.
- 16) 厚生省特定疾患 急性高度難聴調査研究班 平成2年度研究業績報告書 1991,pp.3.
- 17) 浅野容子. 外リンパ瘻の診断について 確実例と疑い例の比較. *耳鼻咽喉科展望* 1991;34: 411-425.
- 18) Hughes GB, Sismanis A, House JW. Is there consensus in perilymph fistula management? *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990;102:111-7.
- 19) 福留真二, 清水謙祐, 君付 隆, 小宗静男. 事故から 15 年の経過で発症した外リンパ瘻の 1 例. *Equilibrium Res* 2003;62:5, 440.
(19 の要約 事故から15年の経過で発症した外リンパ瘻の1症例. 15年前に交通事故 頭部打撲 左難聴耳鳴めまいを発症. その後めまいは無かったが難聴は徐々に進行した. 頻発するめまいで受診した. 受診時48dBの左難聴. メニエール病として治療開始したが, めまいが治らなかった. 頭部打撲が発症のきっかけであることから左PLFを疑い手術RWからの漏出を認めた)

外リンパ瘻の新たな生化学的確定診断法

池園哲郎, 新藤 晋, 李 麗淑, 小泉康雄, Charuk Hanprasertpong

齋藤明彦, 八木聡明(日本医科大学耳鼻咽喉科)

小林俊光(東北大学医学部耳鼻咽喉科), 大塚喜彦(三菱化学ビーシーエル研究開発部)

【はじめに】

本研究は難聴・平衡障害(急性感音難聴, 進行性感音難聴, めまい・平衡障害等)の原因疾患である「外リンパ瘻」(1,2)の新たな確定診断法の開発により, これを早期に的確に診断・治療し治癒率の向上をもたらすことにある。

外リンパ瘻は内耳組織に存在する外リンパが内耳窓から鼓室内(中耳)に漏出して聴覚・平衡感覚の障害を生じる疾患である。正確に診断し, 早期に手術すれば改善, 治癒する症例も多い。しかし外リンパ瘻の診断は, いままで生理学的所見, 症状, 病歴等を総合的に検証する診断基準により行われているために不確定な場合があり, 治療開始の遅れをもたらしてきた。確定診断法の鼓室開放術は患者への侵襲度が問題となっており, 手術を行っても外リンパの漏出が確認できず, 確定診断がなされないケースも多数存在している。また, 従来突発性難聴, メニエール病と診断されている症例の中にも外リンパ瘻が含まれていることは以前より指摘されている。外リンパ瘻は, 手術により聴覚・平衡覚障害の改善が期待できる数少ない疾患である上, 迅速な治療が治癒率を左右することから, 簡便, 確実で, かつ患者への侵襲度の低い診断方法の開発が, 国内外の研究者, 臨床医から強く望まれている。

我々は, 外リンパ特異的蛋白CTP(Cochlin-tomoprotein)(3)に着目している。実際の臨床例の検討からCTPが外リンパ瘻の確定診断に有用であるかどうか検討した。

【対象と方法】

＜抗CTP抗体(抗 Cochlin-N 末端LCCL抗体)の作成＞

抗体は本報告書別項「Cochlin 発現の分子生物学的解析 ―ヒト内耳組織および外リンパを用いて―」に記載してある anti-LCCL-N, anti-LCCL-C 抗体を用いた。

＜ウェスタンブロッティング, 一次, 二次抗体反応, 検出反応＞

上記試料と抗体との反応性をウェスタンブロッティングで検査した。さらに 15%ポリアクリラマイドゲル(レディゲル J; 縦 73mm × 幅 80mm × 厚さ 1mm)に各試料溶液をアプライし, 泳動を行った。泳動は 60 分, 27mA で行った。このゲルを, 100V で 90 分間, ニトロセルロース膜(0.45 μ m)に転写した。転写装置としてはウェット式プロッターを用いた。

転写後, ニトロセルロース膜をポンゾー染色液に 5 分間浸した後, MilliQ 水で脱色し, 各試料溶液中の蛋白質が染色された様子を確認した。確認後, 蒸留水中で 5 分間振動させながら脱色した。

次に, 化学発光法による検出及び解析を行った。転写後のニトロセルロース膜を, 非特異的反応をブロックするために blocking buffer 中に 4°C で一晩浸した。これを washing buffer で 5 分間, 3 回洗浄し, 1 次抗体と反応させた。1 次抗体には, 抗 LCCL 抗体を antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈して, ニトロセルロース膜に添加した。反応は, 振動させながら 2 時間行った。2 次抗体には, ヤギ由来 anti rabbit IgG antibody (HRP 標識)を, 前記 antibody dilution buffer で 1000 倍に希釈したのを用い, 振動させながら 1 時間反応させた。これを前記 wash buffer で 15 分間, 3 回洗浄した。その後, 化学発光キット(ECL plus)を用いて化学発光させ, 発生したシグナルをフィルム(Kodak Scientific Imaging Film)に感光させた。フィルムへの露光時間は 1 時間とした。

＜検討対象となる試料＞

ヒトの中耳に存在し得る外リンパ以外の体液として, CSF, 血清, 唾液を用いた。ヒト外リンパは, アブミ骨手術,

ならびに人工内耳の電極を挿入する際に漏出した外リンパを回収した。CSF は、髄膜炎及び脳炎の疑いで検査が行われ、結果が正常であった患者の CSF の一部を用いた。血清は、健常者の静脈血を用いた。唾液は健常者から採取したものをを用いた。試料提供者に対して研究目的の使用について十分な説明を行い、同意を得られた場合に用いた。

<外リンパ瘻症例のサンプル採取方法>

1. 従来の診断基準に則り、外リンパ瘻と診断された8症例の術中サンプルを検査した。
2. 試験的鼓室開放手術中、中耳腔にはいっただけなく血液が混入しないようにして、生理食塩水を用いて中耳を3-4回洗浄する。
3. 洗浄用生理食塩水の量は0.3mlとした。0.1ml回収できればそれを検体として用いる。0.1ml回収できないときは、さらに0.1mlを入れて洗浄し最低量でも0.1ml回収するようにした。洗浄液の回収率は症例により様々でおそらく中耳腔の大きさの個人差によるものと思われる。
4. 回収した洗浄生食液をエッペンドルフチューブに入れて、エッペンドルフ用遠心器で6000回転15秒間遠心沈殿、赤血球を除去して上清を-70度で凍結保存した。

【結果】

陽性コントロールであるウシ内耳蛋白溶解液では、約63kDaの位置にバンドが見られ、アイソフォーム p63 を特異的に認識していることが確認された。

ヒト外リンパでは、約16kDaに明瞭な細目のバンドが検出され、これはその分子量と抗体との反応性からCTP(Cochlin-N末端フラグメント蛋白)と考えられた。ウシ外リンパではやや幅の広い18kDaのバンドが検出された。一方、ヒトCSF、ヒト血清、ヒト唾液には、この抗体で検出される蛋白は認められなかった。

ヒト外リンパ(人工内耳、アブミ骨手術、半規管瘻孔の術中に得られたサンプル)では11例検査したところ全症例明らかに陽性だった。アブミ骨開窓術直前の中耳洗浄液、慢性中耳炎、滲出性中耳炎合計8症例は全例陰性であった。

特発性外リンパ瘻8例中5例に陽性反応が認められた。

【考案・結論】

外リンパ瘻の生化学的確定診断マーカーについて様々な物質が報告されている。GM1(4)、Prostaglandin D synthase(5)をマーカーとした報告があるが、これらの物質は血液中にも存在することから外リンパ瘻の診断には適していなかった。内耳特異的蛋白 OCP1,2 が報告されたが(6)その後、外リンパ瘻の診断に応用された報告は無い。蛍光色素を静脈注入して外リンパ瘻の指標にする方法も試されたが、色素が血液中、中耳滲出液にも移行するため、臨床上外リンパ瘻の診断はできなかった(7)。

髄液瘻の診断蛋白としてすでに確立し普及している β 2Transferrin は、血清中には含まれないことから外リンパ瘻の診断にも応用できるのではないかと期待され、最も論文報告が多い物質である(8-13)。しかし、最近人工内耳埋め込み術、アブミ骨手術、聴神経腫瘍手術で採取された外リンパそのものに β 2Transferrinが含まれるかを検査した結果が報告され、Levensonら(14)は1996年に13検体中11例が陰性、Buchmanら(15)は1999年に20検体中19検体が陰性であったと報告した。さらに、Rauch(16)は2000年に、より精度の高い検査法で20検体の外リンパを検査したところ、陽性は1例も無かったと報告した。現在 β 2Transferrinの有無で外リンパ瘻診断を行うことは出来ないことが判明している。以上のように現在のところ確立した外リンパ瘻の生化学的診断マーカーは存在しない。

現在我々が着目しているCTP(3)は、今までのところ検査した外リンパ11例中全症例明らかな陽性だった。アブミ骨開窓術直前の中耳洗浄液、慢性中耳炎、滲出性中耳炎合計8症例は全例陰性だった。外リンパ特異性が高く、しかも正常外リンパでの検出率も100%であることから、CTPは外リンパ瘻診断マーカーとして有用である可能性が非常に高いと思われる。

いわゆる特発性外リンパ瘻(外傷, 手術の既往のない, 鼻かみ後などの発症)の存在自体を疑問視する声も少なからずある(17,18)。しかしながら、今回の我々の検査結果は特発性外リンパ瘻が明らかに疾患として存在していることを証明する結果となった。

【参考文献】

- 1) 吉岡邦英. 突発感音難聴における内耳窓膜破綻に関する臨床的並びに実験的研究. 耳展 1983;26: 補 6, 517-539.
- 2) Nomura Y. Perilymph fistula: concept, diagnosis and management. *Acta Otolaryngol* 1994; Suppl 514:52-4.
- 3) Ikezono T, Shindo S, Li L, Omori A, Ichinose S, Watanabe A, Kobayashi T, Pawankar R, Yagi T. Identification of a novel Cochlin isoform in the perilymph: insights to Cochlin function and the pathogenesis of DFNA9. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 6:314:440-6.
- 4) 神崎 仁, 井上康宏, 小川 郁ら. GM1 を用いた外リンパ瘻診断の試み. 厚生労働省特定疾患対策研究事業・急性高度感音難聴に関する調査研究班・平成11年度報告書 2000,pp.41-43.
- 5) Bachmann G, Nekić M, Michel O. Traces of perilymph detected in epipharyngeal fluid: perilymphatic fistula as a cause of sudden hearing loss diagnosed with beta-trace protein (prostaglandin D synthase) immunoelectrophoresis. *J Laryngol Otol* 2001;115:132-5.
- 6) Thalmann I, Kohut RI, Ryu J, Comegys TH, Senarita M, Thalmann R. Protein profile of human perilymph: in search of markers for the diagnosis of perilymph fistula and other inner ear disease. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111:273-80.
- 7) Gehrking E, Wisst F, Remmert S, Sommer K. Intraoperative assessment of perilymphatic fistulas with intrathecal administration of fluorescein. *The Laryngoscope* 2002;112:1614-1618.
- 8) Arrer E, Oberascher G, Gibitz HJ. Protein distribution in the human perilymph: a comparative study between perilymph (post mortem), CSF and blood serum. *Acta Otolaryngol* 1988;106: 117-123.
- 9) Bassiouny M, Hirsch BE, Kelly RH, Kamerer DB, Cass SP. Beta 2 transferrin application in otology. *Am J Otol* 1992;13:552-555.
- 10) Skedros DG, Cass SP, Hirsch BE, Kelly RH. Sources of error in use of beta-2 transferrin analysis for diagnosing perilymphatic and cerebral spinal fluid leaks. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993;109:861-864.
- 11) Weber PC, Kelly RH, Bluestone CD, Bassiouny M. Beta 2-transferrin confirms perilymphatic fistula in children. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;110:381-386.
- 12) Weber PC, Bluestone CD, Kenna MA, Kelley RH. Correlation of beta-2 transferrin and middle ear abnormalities in congenital perilymphatic fistula. *Am J Otol* 1995;16:277-282.
- 13) Arrer E, Gibitz HJ. Detection of 2-transferrin with agarose gel electrophoresis, immunofixation and silver staining in cerebrospinal fluid, secretions and other body fluids. *J Clin Chem Clin Biochem* 1987;25:113-116.
- 14) Levenson MJ, Desloge RB, Parisier SC. Beta-2 transferrin: limitations of use as a clinical marker for perilymph. *Laryngoscope* 1996;106:159-161.
- 15) Buchman CA, Luxford WM, Hirsch BE, Fucci MJ, Kelly RH. Beta-2 transferrin assay in the identification of perilymph. *Am J Otol* 1999;20:174-178.
- 16) Rauch SD :Transferrin microheterogeneity in human perilymph. *Laryngoscope* 2000;110: 545-52.
- 17) Shea JJ. The myth of spontaneous perilymph fistula. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 107:

613-6.

- 18) Friedland DR, Wackym PA. A critical appraisal of spontaneous perilymphatic fistulas of the inner ear. *Am J Otol* 1999;20:261-279.

前庭疾患の診断と治療に関する臨床的研究

分担研究者 石川 和夫 秋田大学教授

研究要旨 聴神経腫瘍患者は、腫瘍の大きさにもよるが、色々な程度の歩行異常を示すと同時に異常な体重心の動揺を示すが、これら動的歩行運動と静的起立時の体重心動揺との間の相関性について検討した。また、基礎的研究の一環として、単離有毛細胞に対して、パッチクランプ法により、II型前庭細胞と外有毛細胞の過分極下に活性化するKチャンネルの電気生理学的特性について検討した。前者においては、暗所下においてのみ、動揺面積と歩行位相関連パラメータとの間に相関が得られ、動揺面積と足圧中心移動軌跡の動揺面積間には、弱い相関を認めた。後者においては、蝸牛 gK_n は“wash out”現象に強く、膜電位の安定性に重要な役割を果たしている。一方、前庭 gK_L は高いインプットコンダクタンスを有しており、更に Cs^+ の透過性を示すなど両者間には、生物物理学的な違いのあることを明らかにした。

A. 研究目的

1) 聴神経腫瘍患者を対象として、静的重心動揺の程度と、動的歩行運動の間に、何らかの相関があるか否か、また、あるとすれば、どのようなパラメータにおいてそれが認められるかを明らかにすることである。

2) KCNQ4に関わる前庭ないし蝸牛有毛細胞の K^+ コンダクタンスの生物生理学的性質を明らかにすること。

B. 研究方法

1) 聴神経腫瘍新鮮例56症例を対象に明所又は暗所下に重心動揺検査と、タクトイルセンサーを用いた歩行検査を行い、前者においては、重心移動軌跡距離と動揺面積を、後者においては、立脚時間、遊脚時間、両脚支持時間の変動係数、並びに、足圧中心移動軌跡の長さやその相対的動揺面積比をとって比較検討した。

2) 生後 14~17 日目のラットから、外有毛細胞、並びに、卵形囊 typeII 前庭有毛細胞を単離し、前者においては、全細胞パッチクランプ法、後者においては、膜穿孔パッチクランプ法にて、それぞれ、活性化電流曲線、活性化・脱活性化電気動態及び Cs^+ の透過性を比較検討した。

C. 研究結果

1) 開眼下ではいずれのパラメータにおいても有意の相関を認めなかったが、閉眼下においては DS と重心動揺距離に、立脚時間又は遊脚時間と動揺面積との間に、有意の相関を認め、動揺面

積と area ratio との間に弱い相関を認めた。

2) HC の gK_n は、VHC の gK_L より低過分極であった。また、長時間の全細胞パッチにも拘わらず OHC の活性化電流に著変は認めなかった。 gK_n は、 gK_L と違い、シグモイダル オンセットの活性化曲線を示した。前者は長時間にわたって wash out 現象に強く、後者は、 Cs^+ の透過性が良好であった。

D. 考察

1) 視覚条件下では、前庭系の異常が様々な程度に補償されて、重心動揺と歩行動揺の相関は出にくくなるが、暗所下では、特に動揺面積と、歩行位相関連の時間因子の変動係数のおおきさとの間に相関が出現する。

2) OHC と VHC 間での gK_n , gK_L では、 Cs^+ の透過性において違いがあり、また、膜電位の安定性は、前者がより優れていることがわかった。これらの性格の違いが、病態を修飾する可能性がある。

E. 結論

1) 姿勢制御機構と動的姿勢制御機構とは、おのずと違いはあるが、閉眼下の重心動揺の程度を検討することで、閉眼下の歩行の不安定さをある程度予測することは可能と思われる。

2) 上記に示した電気生理学的な性格の違いが KCNQ4 の異常のため出現する病態を修飾する可能性がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石川和夫. 温度刺激検査, 耳鼻咽喉科・頭頸部外科の機能検査—何がどこまでわかるか—増刊号 耳鼻咽喉科・頭頸部外科. 医学書院 2003;75:137-144.
- 2) 石川和夫. 耳鳴り, 難聴, 反復するめまい—メニエール病と決めつけてはいけない—治療 2003;85:743-745.
- 3) Wang Y, 殷 敏, 柴田 豊, 板坂芳明, Wong W H, 石川和夫. 足圧分布曲線と足圧移動軌跡距離からみた前庭系疾患の歩行異常について. *Equilibrium Res* 2003;62: 205-211
- 4) 板坂芳明, Wang Y, 柴田 豊, Wong WH, 石川和夫. 聴神経腫瘍に対する前庭誘発筋電位検査. *Akita J Med* 2003;30: 161-167.
- 5) 石川和夫. 特集:プライマリーケア医のための

耳・鼻・口腔・咽頭・喉頭・頸部の症状の診かた ;めまい 治療 2004;86 :229~233.

- 6) Ishikawa K, Wang Y, Wong WH, Shibata Y, Itasaka Y. Gait Instability in Patients with Acoustic Neuroma. *Acta Otolaryngol(Stockh)* 2004, in press.
- 7) Wong WH, Eatock RA, Ishikawa K, The negatively activating potassium conductance of cochlear hair cells. *Akita Medical J* 2004, in press.

2. 学会発表

- 1) Ishikawa K, Wang Y, Wong WH, Shibata Y, Itasaka Y. Pathological gait in patients with acoustic neuroma ISPGR XVIth conference, Sydney, 2003.
- 2) Ishikawa K, Wang Y, Wong WH, Shibata Y, Itasaka Y. Gait instability in patients with acoustic neuroma. CORLAS Helsinki, 2003.

聴神経腫瘍患者の体重心の動揺と歩行運動の安定性の相関について

石川和夫, Wang Yan, 柴田 豊, 板坂芳明, Wong Weng Hoe
(秋田大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

聴神経腫瘍をはじめとする、一側性前庭障害は、様々な程度の前庭脊髄路系の障害をもたらし、体重心の動揺の増大、歩行運動時の不安定化として表出される。その程度は、腫瘍の大きさと性質、個人の代償機能の良否に修飾されることになる。体重心の動揺は、静的姿勢制御機構に関連し、歩行運動は、動的な姿勢制御機構の関わった全身の運動であり、その制御機構において同一のものではない。しかし、歩行運動は起立姿勢を前提とした運動でもあり、それぞれに相関する因子の存在が想定される。この研究の目的は、聴神経腫瘍患者新鮮例56例を対象に、それぞれの分析結果から、相関する因子(パラメータ)を見だし、一方の検査成績から他方の成績を演繹することの可能性を探ることにある。

【対象と方法】

1998年から2003年4月まで当科めまい外来を受診し、重心動揺検査と歩行検査を施行した新鮮聴神経腫瘍患者56例。男性26例、女性30例、年齢は、15歳から83歳まで、平均年齢は54歳。重心動揺検査は、Sanei Signal Processor 7T17 を用い、閉足で開眼又は閉眼下に眼前1mの指標を見せ、解析時間60秒間の条件を行った。今回の検討対象パラメータは、重心動揺移動距離と動揺面積である。

歩行検査は、タクトイル センサー(Nitta Ltd)を用いた、当科で開発した歩行解析システム(室内を約8メートル前進歩行させ、サンプリング時間は、概ね11msec、分解能は5mm)により、開眼又は、閉眼下に自由歩行をさせた。

検討対象パラメータは、立脚時間、遊脚時間、両脚支持時間のそれぞれの変動係数、足圧中心移動軌跡の足の長さに対する相対長、足圧中心移動軌跡の動揺度の接床面積に対する相対値(Area Ratio)である。

【結果・考察】

表1に示すように、明所の条件では、それぞれに有意の相関を認めることができなかった。しかし、暗所(視覚入力を排除した)の条件下では、立脚時間、遊脚時間の変動係数と重心動揺面積との間に、また両脚支持時間の変動係数と重心移動距離との間に有意の相関がみられた。また、Area Ratioとの間には弱い相関を認めた。

		Stance	Swing	DS	MeanRatio	AreaRatio	
Open	距離	p	0.2739	0.2618	0.1752	0.7143	0.6797
		r	0.158	0.162	0.203	0.053	0.060
	面積	p	0.8259	0.2473	0.5677	0.4494	0.2374
		r	0.032	0.167	0.083	0.110	0.171
Close	距離	p	0.1638	0.2413	0.0362	0.2866	0.2172
		r	0.200	0.179	0.296	0.154	0.178
	面積	p	0.0452	0.0269	0.9292	0.1177	0.059
		r	0.284	0.312	0.013	0.224	0.269
		有意	有意	有意			

表 1

このように、重心動揺と歩行運動間の相関は、明所下では得られない。これは、視覚入力が入った状態では、個々人の前庭代償や、歩行運動に関わる視覚入力への依存度が異なることを反映しているものと考えられ、その条件を取り除いて初めて、ある程度の相関がでてきたものと考えられる。それでは、どうして、重心移動距離と立脚時間又は遊脚時間、両脚支持時間と動揺面積との間に相関が得られないかについては、固有知覚系入力による修飾が考えられるが、確かなことは現段階では明らかでない。

【参考文献】

- 1) Ishikawa K, Cao ZW, Wang Y, Wong WH, Tanaka T, Miyazaki S, Toyoshima I. Dynamic locomotor function in normals and patients with vertigo. *Acta Otolaryngol* 2001;121: 241-244.
- 2) Ishikawa K, Wang Y, Wong WH, Itasaka Y. Gait instability in patients with acoustic neuroma. *Acta Otolaryngol (Stockh)*2004, in press.

哺乳類の蝸牛と前庭有毛細胞における過分極状態で活性化する K⁺コンダクタンスの比較

Weng Hoe Wong^{1, 2}, Karen M. Hurley², Ruth Anne Eatock², 石川和夫¹

(秋田大学医学部耳鼻咽喉科¹, ベイラー医科大学耳鼻咽喉科²)

【はじめに】

齧歯類の蝸牛外有毛細胞(OHC)と前庭タイプI有毛細胞(VHC)にそれぞれ過分極状態で活性化する K⁺コンダクタンス(gK,n, gK,L)が存在しており, 細胞の膜電位とインプット・コンダクタンスに重要な役割を果たしている. これらの K⁺チャンネルには KCNQ ファミリーに属している KCNQ4 が関与していると言われていたが, gK,n と gK,L とも生物生理学的要素が一致しているかについて依然と不明なため, 生物物理学的要素について検討した.

【研究方法】

聴力機能が開始する生後 14-17 日目のラットの OHC (n=43) を対象として全細胞パッチクランプ法(pClamp 8.1 ソフトウェア制御による EPC-7 増幅器を利用, ピペット抵抗値 $4.0 \pm 0.5 \dots$, 維持電位 -64.2 mV, シリーズ抵抗補正 50-60%の上, 残存シリーズ抵抗値 $8.3 \pm 2.7 \dots$)を用い, gK,L の発現が開始する生後 16-24 日目の卵形囊 VHC (n=18) を対象として膜穿孔性パッチクランプ法(膜穿孔用に $240 \mu\text{g/ml}$ アンフォテリシン B を使用, Axopatch200A を利用, ピペット抵抗値 $2.2 \pm 1.8 \dots$, 維持電位 -69.0 mV, シリーズ抵抗補正 70%の上, 残存シリーズ抵抗値 $11.0 \pm 0.6 \dots$)を用いて活動電流を測定した. gK,n と gK,L それぞれの活性化電流曲線, 活性化・脱活性化電気動態(kinetics)及び Cs⁺に対する透過性を比較した. 3-s 及び 300-ms 繰返電位ステッププロトコールのオフセット(-34mV)におけるテール電流による活性化曲線を Origin software で分析し, Boltzmann function で表した.

【結果】

OHC に対して VHC を全細胞電位クランプによってそれぞれの活性電流を得た. 平均静電容量は OHC: $16 \pm 0.4\text{pF}$, VHC: $4 \pm 0.2\text{pF}$ であった. OHC の活性電流, gK,n は $V_{1/2} = -91.2 \pm 1.06\text{mV}$, S-value = $-12.6 \pm 0.46\text{mV}$ に対して VHC, gK,L はより低過分極の $V_{1/2} = -80.4 \pm 1.90\text{mV}$ と幅細い S-value = $-6.0 \pm 0.56\text{mV}$ であった. 平均 17.5 分間(10-32 分間)の全細胞パッチにもかかわらず, OHC の活性化電位曲線に著名な変化を認められなかった(n=8, それぞれの前後平均 $V_{1/2} = -91.2 \pm 2.35$ と $-91.8 \pm 2.64\text{mV}$ であった). 活性化動態において, gK,n は -80mV の電位値で gK,L より 10 倍早い時定数(τ_{fast} , τ_{slow})を有している. 一方, 脱活性化動態において, gK,L はダブルエクスポネンシアル曲線で脱活性化するタイムコースを取るのに対して, gK,n はシングモイダルオンセットの曲線を取ることを認めた. 細胞内・外 Cs⁺液のもとでの実験では, 全て OHC の活性電流は阻害されたが, VHC は内向きの活性電流のみ阻害された.

【考察】

生後二週目に過分極状態で活性化する K⁺コンダクタンスは前庭I型有毛細胞と蝸牛外有毛細胞において発現する. 特に gK,L の過分極下での活性化電流が大きく観察された. 一方, 蝸牛においては, gK,n は基底回転の外有毛細胞が最も大きく認められた. 有毛細胞のインプット・レジスタンスを低くすることによって両者の過分極下で活性化するコンダクタンスはリセプター電位を安定させ, 膜時定数, τ_m を減少することができる.

報告によれば, gK,n と gK,L は KCNQ4 のサブユニットを有しているが, 他のサブユニットを混在してチャンネルを構成している可能性もある. その根拠として, 生理学的研究結果においても mRNA による免疫染色反応においても KCNQ4 サブユニットの空間的または構造的な相関性があったからである. しかし, 本研究の結果では, 両者が生物物理学的に明らかに使うところが分かった. その相違点は, 1) 蝸牛は前庭より $V_{1/2}$ のオペレーティング・レ

ンジが広いこと, 2)活性化及び脱活性化において両者が定性的にも, 定量的にも一致しないこと, 3)Cs⁺に対する透過性の違い点, 4)gK_nはlinopirdineによってブロックされるが, gK_Lは4-aminopyridineによって阻害されることである。故に, もしも両者のコンダクタンス(gK_nとgK_L)にKCNQ4サブユニットが関与していれば, それぞれ蝸牛と前庭に置かれている環境によって違った機能を果たされると考えられた。

【結論】

gK_nはgK_Lより比較的に大幅のS-valueとより過分極状態で活性化する活動電位を持っている。そして, 早い活性化の時定数を有している。しかし, gK_Lは倍数のエクスポネンシアルに脱活性化するのに対して, gK_nはシグモイダルなタイムコースを取って脱活性化する。gK_Lは細胞内・外Cs⁺液のもとでの実験において, 多少Cs⁺に対する透過性を示すがgK_nは示さないことが分かった。一方, 長時間に渡って全細胞電位クランプにおいてもgK_nが“wash out”現象に強いと言う性質を持っていることが判明し, 安定した過分極状態で活性化するK⁺コンダクタンスは膜電位の安定性に重要な役割を果たしていると考えられた。

【参考文献】

- 1) Art JJ, Fettiplace R. Variation of membrane properties in hair cells isolated from the turtle cochlea. *J Physiol* 1987;385: 207-242.
- 2) Barry PH. JPCalc, a software package for calculating liquid junction potential corrections in patch-clamp, intracellular, epithelial and bilayer measurements and for correcting junction potential measurements. *J Neurosci Methods* 1994;51:107-116.
- 3) Beisel KW, Nelson NC, Delimont DC, Fritzscht B. Longitudinal gradients of KCNQ4 expression in spiral ganglion and cochlear hair cells correlate with progressive hearing loss in DFNA2. *Brain Res Mol Brain Res* 2000;82:137-149.
- 4) Biervert C, Schroeder BC, Kubisch C, Berkovic SF, Propping P, Jentsch TJ, Steinlein OK. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy. *Sci* 1998; 279: 403-406.
- 5) Brichta AM, Aubert A, Eatock RA, Goldberg JM. Regional analysis of whole cell currents from hair cells of the turtle posterior crista. *J Neurophysiol* 2002;88:3259-3278.
- 6) Chen JWY, Eatock RA. Major potassium conductance in type I hair cells from rat semicircular canals: Characterization and modulation by nitric oxide. *J Neurophysiol* 2000;84: 139-151.
- 7) Eatock RA, Chen WY, Saeki M. Potassium currents in mammalian vestibular hair cells. *Sensory Systems* 1994;8: 21-28.
- 8) Eatock RA, Hurley KM. Functional development of hair cells. In: *Development of the Auditory and Vestibular Systems 3: Molecular Development of the Inner Ear* (Romand R, Varela-Nieto I, eds), San Diego: Academic Press 2003, pp.389-448.
- 9) Fuchs PA, Nagai T, Evans MG. Electrical tuning in hair cells isolated from the chick cochlea. *J Neurosci* 1988;8: 2460-2467.
- 10) Goldberg JM. A theoretical analysis of intercellular communication between the vestibular type I hair cell and its calyx ending. *J Neurophysiol* 1996;76: 1942-1957.
- 11) Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981;391: 85-100.
- 12) Housley GD, Ashmore JF. Ionic currents of outer hair cells isolated from the guinea-pig cochlea. *J Physiol* 1992;448: 73-98.
- 13) Kharkovets T, Hardelin J-P, Safieddine S, Schweizer M, El-Amraoui A, Petit C, Jentsch TJ.

- KCNQ4, a K⁺ channel mutated in a form of dominant deafness, is expressed in the inner ear and the central auditory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97: 4333-4338.
- 14) Kubisch C, Schroeder BC, Friedrich T, Lütjohann B, El-Amraoui A, Marlin S, Petit C, Jentsch TJ. KCNQ4, a novel potassium channel expressed in sensory outer hair cells, is mutated in dominant deafness. *Cell* 1999;96: 437-446.
 - 15) Mammano F, Kros CJ, Ashmore JF. Patch clamped responses from outer hair cells in the intact adult organ of Corti. *Pflugers Arch* 1995;430: 745-750.
 - 16) Marcotti W, Geleoc GS, Lennan GW, Kros CJ. Transient expression of an inwardly rectifying potassium conductance in developing inner and outer hair cells along the mouse cochlea. *Pflugers Arch* 1999;439: 113-122.
 - 17) Marcotti W, Johnson SL, Holley MC, Kros CJ. Developmental changes in the expression of potassium currents of embryonic, neonatal and mature mouse inner hair cells. *J Physiol* 2003;548: 383-400.
 - 18) Marcotti W, Kros CJ. Developmental expression of the potassium current I_{K,n} contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* 1999;520: 653-660.
 - 19) Marcotti W, Kros CJ. Developmental expression of the potassium current I_{K,n} contributes to maturation of mouse outer hair cells. *J Physiol* 1999;520 Pt 3: 653-660.
 - 20) Wang HS, Pan Z, Shi W, Brown BS, Wymore RS, Cohen IS, Dixon JE, McKinnon D. KCNQ2 and KCNQ3 potassium channel subunits: molecular correlates of the M-channel. *Sci* 1998; 282: 1890-1893.

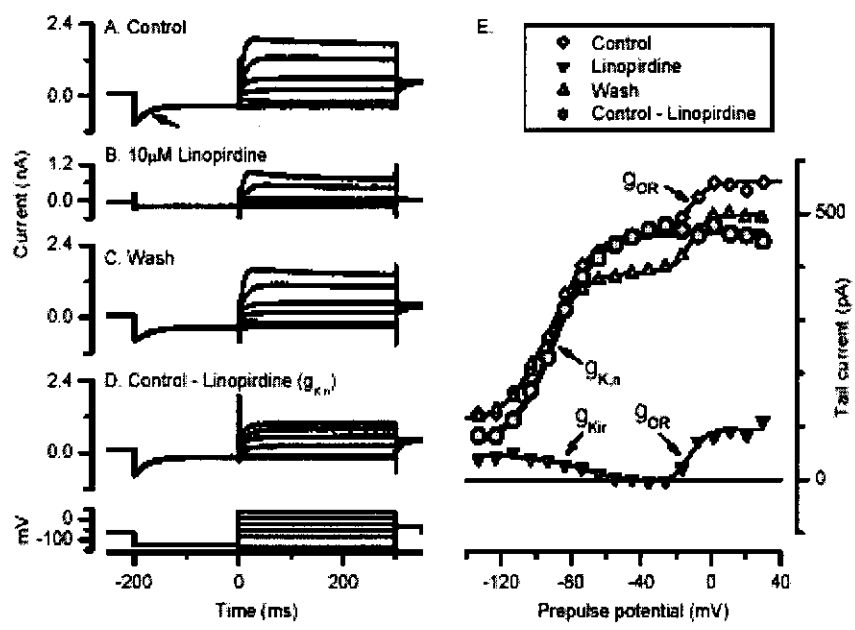


Fig1

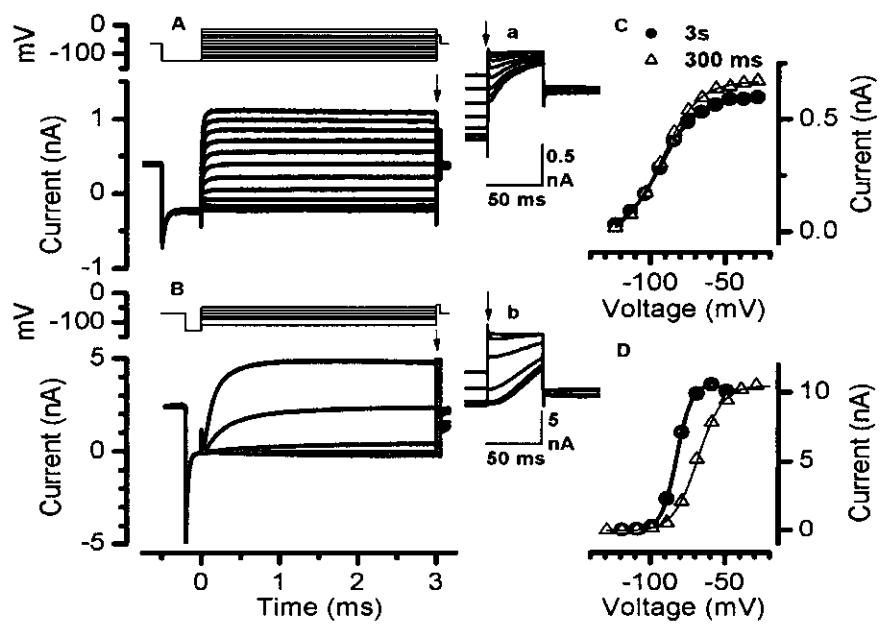


Fig2

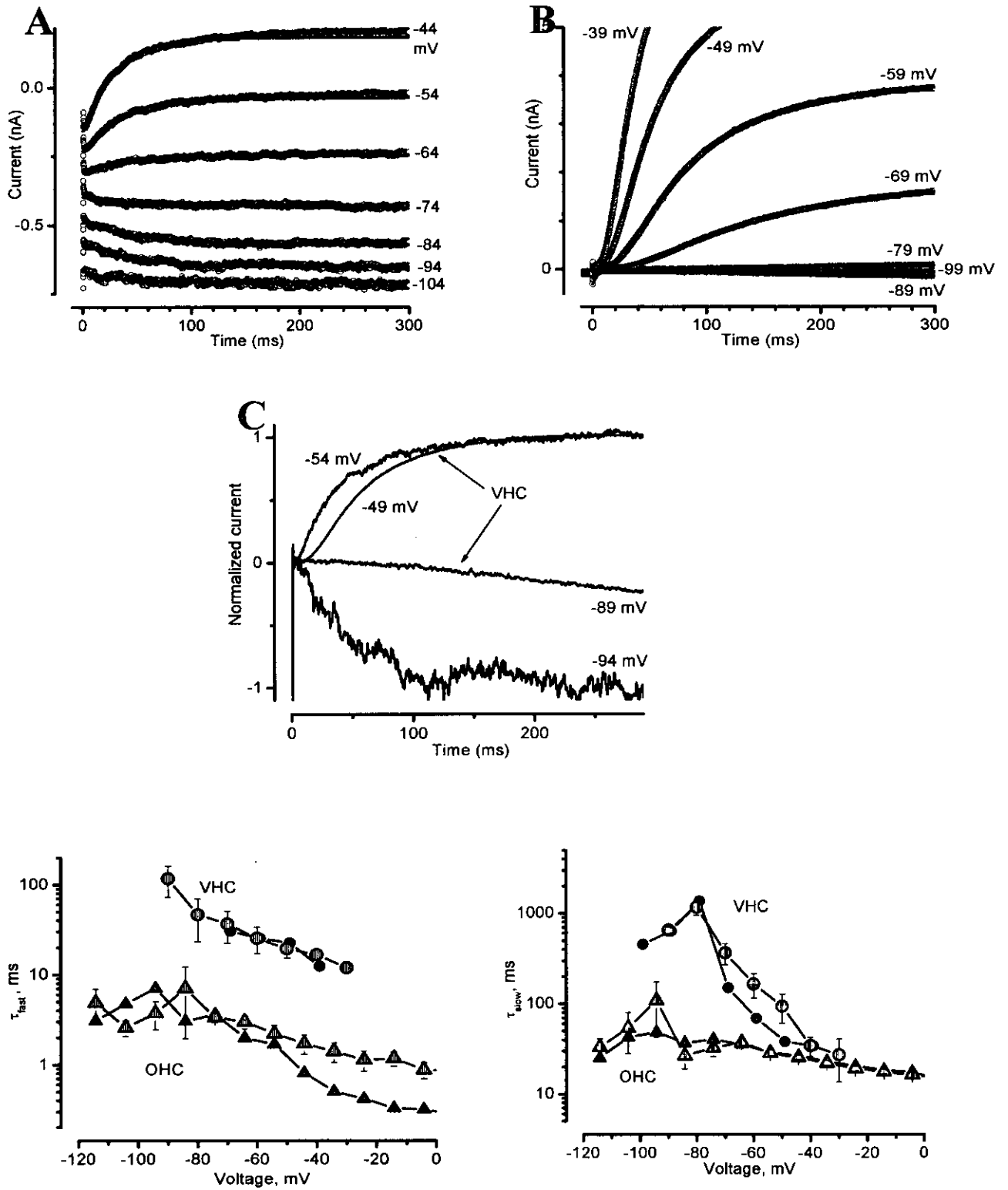


Fig3

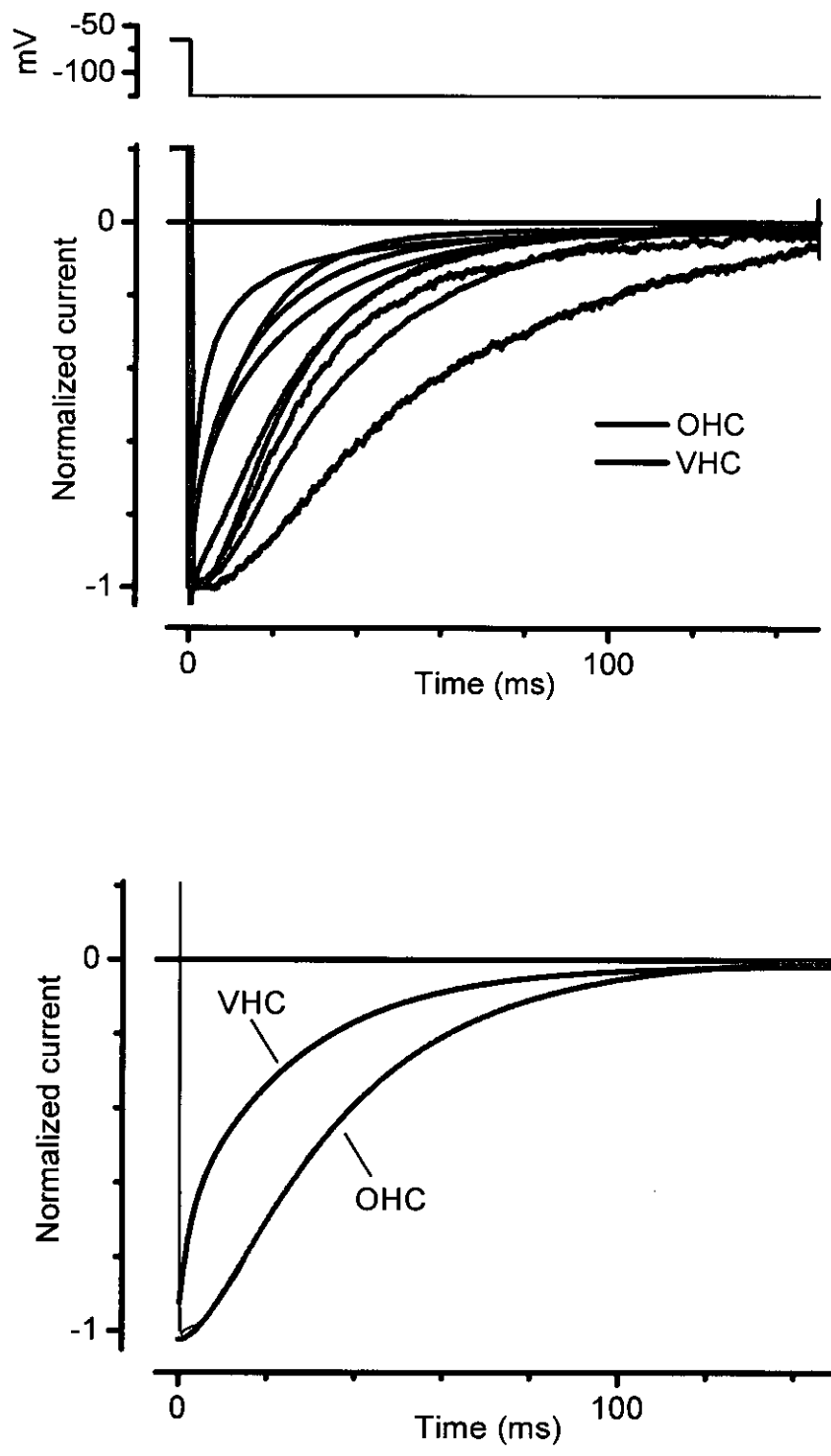


Fig4

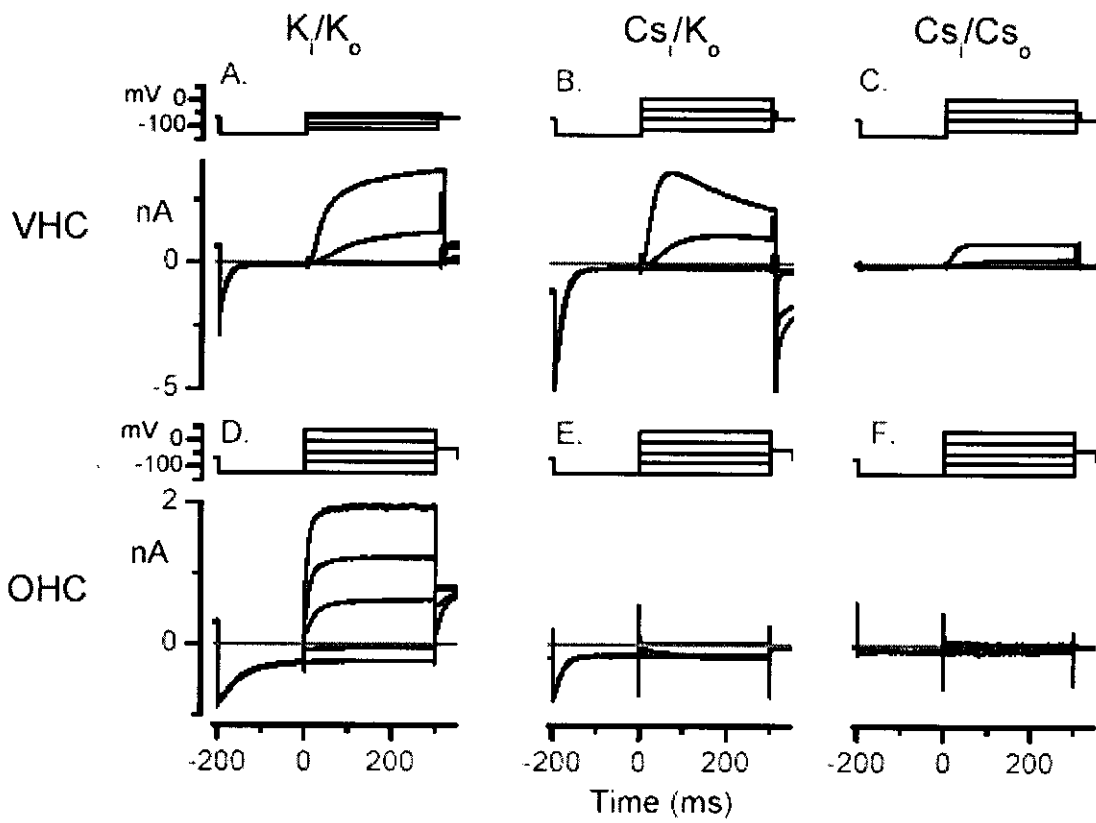


Fig5

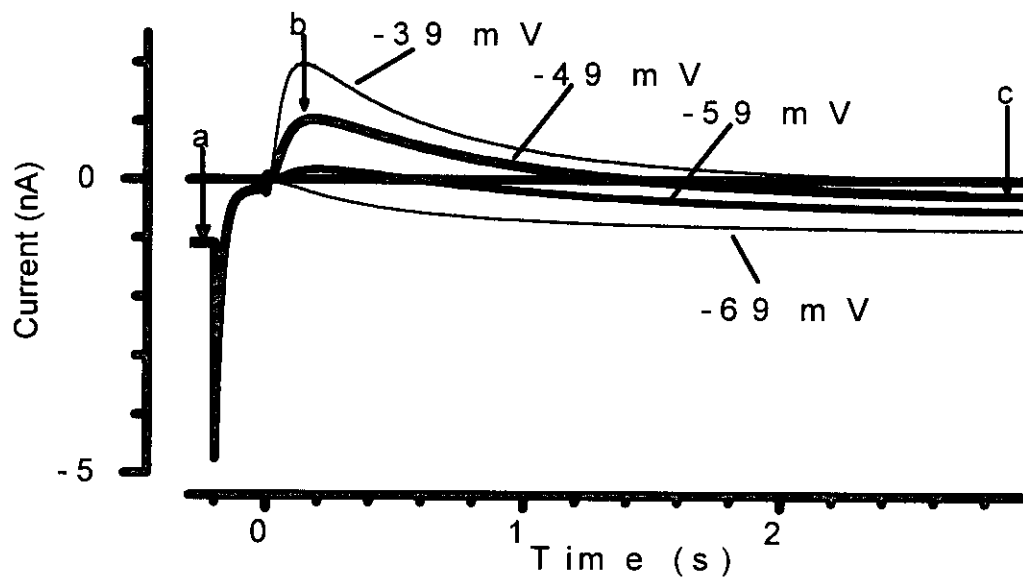


Fig6

幹細胞移植による内耳障害治療に関する研究

分担研究者 伊藤 壽一 京都大学教授

研究要旨 わが国にはメニエール病などの疾患で高度平衡機能障害、高度難聴になり、障害者認定を受けている人が 50～60 万人いると推定されている。これらの内耳障害に対しては、これまで病態の解明に向けての研究は多く行われてきたが、治療に関しては必ずしも満足の得られるものは確立されていない。これらの高度内耳障害に対する新しい治療法として、神経栄養因子の内耳への投与が考えられる。神経栄養因子の投与方法として、本研究では内耳への神経幹細胞の移植を試みた。動物を使い内耳へ神経幹細胞を移植した。移植された神経幹細胞は神経栄養因子を産生する可能性が示唆されたが、臨床的に応用するには産生する神経栄養因子の量は不十分であり、内耳機能を回復し、保護するためにはさらに別の投与方法も必要であることが判明した。

A. 研究目的

わが国には治療が困難な高度難聴障害、高度平衡機能障害の人が 50～60 万人いるとされている。このような障害の人に対する新しい治療として、幹細胞移植治療を考えている。メニエール病などの高度平衡機能障害の治療研究において、現実の臨床の場では、めまいの制御と進行する難聴の予防に力点が置かれる。積極的に内耳障害を改善する方法として、内耳に各種神経栄養因子を投与する方法が考えられる。動物実験では、浸透圧ポンプや遺伝子導入が神経栄養因子の投与方法として試みられており、その有用性が実証されている。しかし、これらの方法は限られた期間しか神経栄養因子を内耳に供給することができない。

一方我々は内耳に種々の幹細胞を移植し、内耳の感覚細胞を再生させようとする試みを行っている。内耳での細胞移植のドナー細胞として研究が進められている神経幹細胞は、中枢神経系においては移植後かなりの幹細胞がグリア細胞に分化し、栄養因子の供給方法として報告されている。このように神経幹細胞は障害された組織再生という本来の目的以外にも、移植先で神経栄養因子を産生する性質が知られ、栄養因子の供給に関しても可能性がある。しかもこの産生能力は長期にわたる供給の可能性もある。このような神経幹細胞の性質を利用し、内耳においても、神経幹細胞を移植することで神経栄養因子供給が可能であると期待される。このような観点からこれまで内耳に移植した神経幹細胞が内耳に生着し、神経栄養因子を産生する可能性があるかどうか検討してきた。今回はこれに加え、内耳に移植した神経幹細胞の産生する神経栄養因子を定量できないか検

討した。

B. 研究方法

内耳に神経幹細胞を投与するにあたり、神経幹細胞は、妊娠12日令の EGFP トランスジェニックマウスから採取したものをを用いた。胎生11.5日目にマウス胎児の終脳背側にある神経上皮を取り出し、培養液中で培養した。培養6日目、得られる細胞塊を分離し、 1×10^5 個/ μl の細胞浮遊液を得て、移植に用いた。C57BL/6J マウス(6週令)の内耳に、外側半規管にあけた小孔から、微量注入ポンプを利用して神経幹細胞浮遊液を $10 \mu\text{l}$ 注入した。ケタミン (100 mg/kg)、キシラジン (9 mg/kg) の腹腔内注射で麻酔し、耳後切開し、側頭骨を露出した。外側半規管、後半規管に小孔を開け、神経幹細胞浮遊液を注入した。

1) 組織学的検討: 移植後 28 日目(1ヶ月目)、動物を深麻酔下で、4%パラホルムアルデヒドの外側半規管から、微量注入ポンプを利用して経心灌流固定を行った。側頭骨を取り出し、免疫染色にて移植された細胞の分化を検討した。ニューロンのマーカーとして microtubule-associated protein 2 (MAP2) を用い、グリア細胞のマーカーとして glial fibrillary acidic protein (GFAP) を用いた。神経栄養因子の産生は、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) と、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) について免疫染色で評価した。

2) 移植後1～3週にわたり、内耳より外リンパ液を採取し、ELISA法にてリンパ液中のGDNF、BDNFの量を測定した。なお、以上の研究は京都大学動物実験倫理委員会の規定に従って行った。

C. 研究結果

移植細胞由来の細胞群は、全個体とも蝸牛内、前庭器内に観察された。移植細胞由来の細胞群は蝸牛軸や側壁などの構造物に付着し、浮遊している細胞は極わずかであった。このことは神経幹細胞由来の細胞が、蝸牛内で少なくとも約1ヶ月間生着出来ることを示す。

蝸牛内でグリア細胞のマーカーである GFAP と神経細胞のマーカーである MAP2 の発現が移植細胞由来の細胞で見られた。移植細胞の96%は GFAP 陽性細胞であり、16%は MAP2 陽性細胞であった。すなわち、蝸牛内に移植された細胞のほとんどがグリア細胞に分化したと考えられる。一方、神経栄養因子については、蝸牛における移植細胞の 90%が GDNF 陽性で、49%が BDNF 陽性であった。すなわち、神経幹細胞由来の細胞は、蝸牛内で、GDNF、BDNF の両方あるいは一方を分泌する能力があると考えられる。

外リンパ液からそれらの神経栄養因子の量を測定したが、測定した時期に拘わらず、有意な量は得られなかった。

D. 考察

以前からの研究また今回の実験では神経幹細胞由来の細胞が移植後長期にわたり内耳内で生存することが明らかになった。脳や網膜で報告されている結果と同様、内耳でもほとんどの移植細胞由来の細胞はグリア細胞に分化した。また免疫染色の結果ではこれらの移植細胞、特にグリア細胞に分化した細胞は神経栄養因子を産生する可能性がある。このことは神経幹細胞が障害を受けた内耳の治療に利用可能であることを示唆する。神経幹細胞が神経栄養因子を産生し、高度内耳障害に対する治療法としての期待を抱かせるものである。しかし、内耳リンパ液から神経栄養因子を定量すると、臨床的に満足できるようなレベルの量は得られなかった。今後、さらに他の方法でも神経栄養因子を投与する方法を開発する必要がある。

E. 結論

内耳に移植した神経幹細胞は長期にわたり内耳に生着し、さらに神経栄養因子を産生し、高度内耳障害に対する治療法としての可能性がある。しかし、内耳に移植した神経幹細胞が出す神経栄養因子を定量的に測定した結果、神経幹細胞は神経栄養因子を出すが内耳を保護するほど十分な量ではないと

考えられた。

F. 健康危険情報

特記すべき点なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakagawa T, Ito J. Application of cell therapy to inner ear disease. Acta Otolaryngol 2004; Suppl 551: 6-9.

2. 学会発表

- 1) Ito J. Hair cell restoration by cell transplantation The 40th Inner Ear Biology Workshop Granada, Spain,2003.9.
- 2) Ito J. Regeneration of the inner ear. COE Symposium Sendai, Japan,2003.9.
- 3) Ito J. Regeneration of inner by transplanting stem cells. The 77th Congress of Korean Society of Otorhinolaryngology Jeju, Korea,2003.10.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき点なし