

幹細胞移植による内耳障害治療

伊藤壽一

(京都大学大学院医学研究科耳鼻咽喉科・頭頸部外科)

【はじめに】

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(1)。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。

【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い行った。

【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である GFAP と神経細胞のマーカである 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, 測定した時期に関わらず, 有意な量は得られなかった。

【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, 内耳リンパ液を採取し, 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内耳を保護するほど十分な量ではなかった。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と考えられた。

【参考文献】

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

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

めまいの病因および治療に関する研究

分担研究者 久保 武 大阪大学教授

研究要旨 動物実験により空間認知を調べるため、放射状迷路テストを用いて検討した。過重力負荷を受けたラットではコントロール動物に比べ空間記憶学習が障害を受けていた。その結果、一度入ったアームを選ぶ確率が高いが、運動量の増加により多くのアームに入り、最終的に獲得したえさの数には差がなかった。カリウムチャンネルである KCNE1, KCNE3 遺伝子の内 2 種類の SNPs (KCNE1 遺伝子上の 112A, KCNE3 遺伝子上の 198C) は、メニエール病群において統計学的に有意に高率に認められることから、これらの SNPs がメニエール病の発症に何らかの遺伝的背景を与える可能性が推察された。めまいを訴える患者は比較的高率にうつ状態を合併しており、このような患者の治療にはその精神的背景も考慮する必要がある。特にうつ傾向のある患者の治療において選択的セロトニン再取込み阻害薬(SSRI)はうつ状態の改善のみならずめまいによる日常生活障害の改善に有用な薬剤であると言える。

A. 研究目的

めまいの病態に関する研究として、空間認知の障害された動物モデルを作成して空間認知障害の研究を行った。また、メニエール病のゲノム解析によりその遺伝的素因を研究した。治療に関連する研究として、新規抗うつ／抗不安薬として開発された選択的セロトニン再取込み阻害薬(SSRI)の効果を調べた。

1) 空間認知が障害された場合、ヒトは「めまい」を訴える。通常 1G で生活している生体が無重力や過重力など unfamiliar な環境に暴露された場合でも空間認知が障害され、めまいを引き起こす。そこで本研究では実際に前庭破壊あるいは重力環境の変化により空間認知障害が誘発されるのかどうか、放射状迷路テストを用いて検討した。

2) 遺伝子上に同定される一塩基変異 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) とメニエール病の発症およびその臨床症状との相関を検討する目的で、同患者ゲノムにおける KCNE1, KCNE3 遺伝子上の SNPs 解析を行った。

3) 近年、選択的セロトニン再取込み阻害薬 (SSRI) が新規抗うつ／抗不安薬としてうつやパニック障害に広く用いられるようになってきた。本研究ではめまい患者に SSRI を投与し、その前後のうつ状態を Self rating Depression Scale (SDS) を用いて、まためまいの自覚症状に関しては我々の開発しためまいアンケートを用いて検討した。

B. 研究方法

1) 空間認知の障害の実験には Wistar 系雄性ラ

ットを用いた。両側前庭破壊後 5 週間の回復期の動物、あるいは 2G の強さで 2 週間の過重力負荷をした動物を用いて、空間記憶テストを行った。

2) メニエール病確実例 63 人よりインフォームドコンセントを得た上で採血しゲノム抽出を行った。KCNE1 遺伝子上の 112G/A 変異、KCNE3 遺伝子上の 198T/C 変異の両者について、メニエール病確実例および非メニエール病者から抽出したゲノムにおいてそれぞれの SNPs がどのような割合で存在するかを決定した。

3) めまい、ふらつきを訴えてめまい外来を受診した患者のうち SSRI 投与に同意し、8 週間の継続投与を行った 47 名の患者を対象とした。これらの計 47 名の患者に SSRI (パロキセチン, 20mg/day) を投与し、治療前、4 週間および 8 週後に Self rating Depression Scale (SDS) およびめまいアンケートを行った。他覚所見については同時期に各種眼振検査や体平衡機能検査、必要に応じて ENG を行い異常所見の有無について検討した。

C. 研究結果

1) 両側前庭破壊を受けた動物ではコントロール群と比べ、有意に誤ったアームを選ぶ確率が高かったが、自発運動量の増加により単位時間あたりに入るアームの数が多く最終的にえさを獲得するまでに要した時間はコントロール群と差がなかった。

2) メニエール病確実例 63 例の解析において、KCNE1 遺伝子 112G ホモが 28 例、112A ホモが 8 例、112G/A ヘテロが 27 例であった。非メニエール病群 237 例においては、112G ホモが 192 例、

112A ホモが 20 例, 112G/A ヘテロが 25 例であった. 112A を少なくとも一つのアリルに有する割合は, メニエール病群において統計学的に有意に高かった ($P < 0.001$).

3) 器質疾患の有無に拘わらず SDS 高値群では SSRI は患者のうつ状態を改善させるだけでなく, めまいによる自覚症状(日常生活障害度)の改善に有用であることが判明した. Group II は器質疾患を持つが SDS は低値である群であり, SSRI はめまいの自覚症状に無効であった. これらの患者にはまず器質疾患に対する適切な薬物治療やリハビリテーションが必要であると思われる. Group IV は器質疾患もなく SDS も低値である群である. この群ではめまいアンケートによると治療前の日常生活支障度が軽く, そのためにアンケートによる改善の検出に限界があった可能性が考えられる.

D. 考察

過重力負荷動物では空間記憶学習が障害を受け一度入ったアーム(えさのない誤ったアーム)を選ぶ確率が高いが, 運動量の増加により多くのアームに入った結果, 最終的に獲得したえさの数には差がなかったと解釈できる. 以上より, 一定の重力環境が空間識の形成に重要であり, 生体は過重力負荷により誘発された空間識の障害を運動量の増加で補っていることが示唆された.

K⁺イオン輸送は, 内耳電位の発生および内耳液の産生に必須の機構であり, 同機構の破綻から難聴・めまいが発症することは容易に想像される. 分子生物学的な検討から, 今回解析を行った KCNE1, KCNE3 カリウムチャネルはともに, 蝸牛, 内リンパ囊の両部位に発現していることが確認され, 内耳における K⁺イオン輸送および水代謝に必須の分子であることが推察される. これまでに, KCNE1 遺伝子ノックアウトマウスでは, 内リンパ腔の消失が惹起されることが報告され, また, 同遺伝子の変異により感音難聴と不整脈(QT 延長)を特徴とする Jervell Lange-Nielsen 症候群が発症することも報告されている.

非メニエール病群との比較により, KCNE1 遺伝子の 112A, KCNE3 遺伝子の 198C を少なくとも一つのアリルに有する割合が, メニエール病確実例群において統計学的に有意に高かったことは, これら2種類の SNPs が, メニエール病の発症に何らかの遺伝的背景を与える可能性を強く示唆するものと考えられる. 一方, これらの SNPs と発症年

齢との間には有意な相関を確認できなかったことは, これらの SNPs はメニエール病の若年発症の因子ではないことを意味している.

SSRI による治療前の結果では, SDS 高値は 47 名中 18 名でめまいを訴える患者にうつ状態を合併することが多いことが示唆された. またアンケートの結果から, SDS 高値群において全般的に日常生活支障度が高いことが判明し, これらの精神的背景を有する群ではうつに対する治療を積極的に考慮する必要性が示唆された.

E. 結論

1) 前庭破壊や過重力負荷で空間記憶に障害を受けた動物は運動量の増加により固有覚や遠心コピーを増加させ, 障害された空間識を補っている可能性があると考えられた.

2) カリウムチャネルである KCNE1, KCNE3 遺伝子の内 2 種類の一塩基変異(KCNE1 遺伝子上の 112A, KCNE3 遺伝子上の 198C)は, メニエール病群において統計学的に有意に高率に認められ, これらの SNPs がメニエール病の発症に何らかの遺伝的背景を与える可能性が推察された.

3) めまいを訴える患者は比較的高率にうつ状態を合併しており, このような患者の治療にはその精神的背景も考慮する必要がある. 特にうつ傾向のある患者の治療において SSRI はうつ状態の改善のみならずめまいによる日常生活障害の改善に有用な薬剤であると言える.

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakagawa A, Uno A, Horii A, Kitahara T, Kawamoto M, Uno Y, Fukushima M, Nishiike S, Takeda N, Kubo T.

Fos induction in the amygdala by vestibular information during hypergravity stimulation. *Brain Res* 2003;986: 114-23.

2) Horii A, Kitahara T, Smith PF, Darlington CL, Masumura C, Kubo T. Effects of unilateral labyrinthectomy on GAD, GAT1 and GABA receptor gene expression in the rat vestibular nucleus.

- Neuroreport 2003;14: 2359-63.
- 3) Russell NA, Horii A, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK. Bilateral peripheral vestibular lesions produce long-term changes in spatial learning in the rat. *J Vestib Res* 2003;13:9-16.
 - 4) Horii A, Imai T, Mishiro Y, Yamaji Y, Mitani K, Kawashima T, Kubo T. Horizontal canal type BPPV; Bilaterally affected case treated with canal plugging and Lempert's maneuver. *ORL* 2003; 65:366-369.
 - 5) Kitahara T, Kondoh K, Morihana T, Okumura S, Horii A, Takeda N, Kubo T. Steroid effects on vestibular compensation in human. *Neurol Res* 2003;25:287-91.
 - 6) Horii A, Russell NA, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK. Vestibular influences on CA1 neurons in the rat hippocampus: an electrophysiological study in vivo. *Exp Brain Res* 2003, in press.
 - 7) Russell NA, Horii A, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK. Long-term effects of permanent vestibular lesions on hippocampal spatial firing. *J Neurosci* 2003;23:6490-8.
 - 8) Akiduki H, Nishiike S, Watanabe H, Matsuoka K, Kubo T, Takeda N. Visual-vestibular conflict induced by virtual reality in humans. *Neurosci Lett* 2003;340:197-200.
 - 9) Kitahara T, Fukushima M, Uno Y, Mishiro Y, Kubo T. Up-regulation of cochlear aquaporin-3 mRNA expression after intra-endolymphatic sac application of dexamethasone. *Neurol Res* 2003;25: 865-70.
 - 10) Morita M, Imai T, Kazunori S, Takeda N, Koizuka I, Uno A, Kitahara T, Kubo T. A new rotational test for vertical semicircular canal function. *Auris Nasus Larynx* 2003;30: 233-7.
2. 学会発表
- 1) 堀井 新, 雑賀孝昇, 西池季隆, 北原 紘, 宇野敦彦, 西村将人, 福嶋宗久, 中川あや, 三谷健二, 久保 武. 難治性メニエール病および遅発性内リンパ水腫に対するゲンタマイシン鼓室内投与について. 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003.5.
 - 2) 堀井 新, 三谷健二, 北原 紘, 宇野敦彦, 久保 武, 雑賀孝昇, 西池季隆, 西村将人. 難治性メニエール病に対するゲンタマイシン鼓室内投与 -3. GM 投与後もコントロール不良であった症例の検討- 日耳鼻大阪府地方部会第 285 回地方会, 2003.6.
 - 3) 堀井 新, 三代康雄, 今井貴夫, 三谷健二, 川島貴之, 久保 武. Canal plugging を行った両側外側半規管型 BPPV の 1 例. 第 13 回日本耳科学会, 幕張, 2003.
 - 4) 三谷健二, 堀井 新, 宇野敦彦, 中川あや, 久保 武. 過重力負荷がラット空間認知に及ぼす影響について. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
 - 5) 中川あや, 宇野敦彦, 堀井 新, 三谷健二, 久保 武. 過重力負荷誘発動揺病におけるラット扁桃体および弧束核 Substance P 神経系の役割. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
なし.
 2. 実用新案登録
なし.
 3. その他
なし.

前庭系の空間認知学習における役割

三谷健二, 堀井 新, 宇野敦彦, 北原 糺, 久保 武
(大阪大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

空間認知は視覚, 前庭覚, 固有覚が中枢神経系内で統合, 比較, 認知, 記憶を繰り返すことにより保たれ, 生体が正確な運動を行うための極めて重要な脳機能の一つである. この空間認知が障害された場合, ヒトは「めまい」を訴える. 末梢前庭障害により正確な頭部運動のシグナルが脳内に入力しなくなった場合にも, あるいは通常 1G で生活している生体が無重力や過重力など **unfamiliar** な環境に暴露された場合でも空間認知が障害され, めまいを引き起こす. すなわち, 末梢前庭障害で起こるめまいにも重力変化で引き起こされる宇宙適応症候群にも空間認知障害という点では共通の神経機序が存在すると考えられている. そこで本研究では実際に前庭破壊あるいは重力環境の変化により空間認知障害が誘発されるのかどうか, 放射状迷路テストを用いて検討した.

【方法】

実験には Wistar 系雄性ラットを用いた. 両側前庭破壊後 5 週間の回復期間において, 放射状迷路を用いた空間記憶テストを行った. 8 本のアームのうち 1 本にのみえさを置き, 誤ってえさのないアームに入った回数およびえさを獲得するまでに要した時間を測定した. コントロール群には耳後部に皮膚切開のみを加えたシャム手術を行った.

過重力負荷には我々の開発した回転装置 1)を用いて 2G の強さで 2 週間の刺激を与えた. コントロール動物は回転装置のそばにおいて, 装置から出る音刺激のみを与えた. 放射状迷路テストは 8 本のアームのうち 4 本にえさを置き, 単位時間あたりに獲得したえさの数, 単位時間あたりに入ったアームの数, 同じアームに入った数を測定し空間記憶学習の指標とした.

【結果と考察】

両側前庭破壊を受けた動物ではコントロール群と比べ, 有意に誤ったアームを選ぶ確率が高かったが, 自発運動量の増加により単位時間あたりに入るアームの数が多く最終的にえさを獲得するまでに要した時間はコントロール群と差がなかった 2), (図1). このことは, 前庭入力が増断されることにより空間認知を形成する重要な感覚入力の一つが欠損した結果, 空間記憶学習が障害されたが, 運動量の増加により多くのアームに侵入しえさを獲得すると言う最終目的は達成されたものと考察できる. 両側前庭破壊は運動時に動揺視を起し, 視覚情報の利用が障害され空間記憶学習が阻害されたとの解釈もできるが, 前庭破壊により海馬の場所特異的に発火する place cell の機能低下が視覚情報の有無に関係なく起こる事 3)と合わせて考えると, 本結果は正常前庭機能が空間記憶学習に重要であると考えるのが妥当と思われる.

過重力負荷を受けた動物ではコントロール動物に比べ有意に同じアームに複数回入る数も多く, また単位時間あたりに入ったアームの数は多かった. しかし, 最終的に単位時間あたりに獲得したえさの数は両者に差がなかった(図2). このことは, 過重力負荷動物では空間記憶学習が障害を受け一度入ったアーム(えさのない誤ったアーム)を選ぶ確率が高いが, 運動量の増加により多くのアームに入った結果, 最終的に獲得したえさの数には差がなかったと解釈できる. 以上より, 一定の重力環境が空間認知の形成に重要であり, 生体は過重力負荷により誘発された空間認知の障害を運動量の増加で補っていることが示唆された.

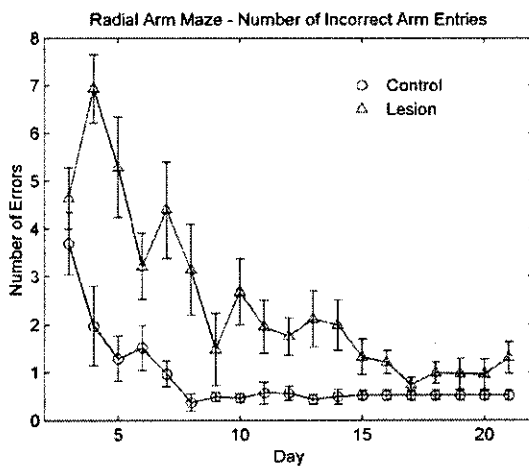
両側前庭障害で自発運動量が増加することは良く知られたことであるが 2), 逆に両側前庭への過剰刺激とも言えることのできる過重力負荷でも動物の運動量が増え, 最終的にはえさの獲得に支障がなかった. このことは, 運動量の増加によりたまたまえさへの遭遇率が高まったと考えるより, 前庭破壊や過重力負荷で空間記憶に障

害を受けた動物は運動量の増加により固有覚や遠心コピーを増加させ、障害された空間識を補っている可能性があると考えられる。

【参考文献】

- 1) Takeda N, Horii A, Uno A, Morita M, Mochizuki T, Yamatodani A, Kubo T. A ground-based animal model of space adaptation syndrome. *J Vestibular Res* 1996;6: 403-40.
- 2) Russell NA, Horii A, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK. Bilateral peripheral vestibular lesions produce long-term changes in spatial learning in the rat. *J Vestibular Res* 2003;13: 9-16.
- 3) Russell NA, Horii A, Smith PF, Darlington CL, Bilkey DK. Long-term effects of permanent vestibular lesions on hippocampal spatial firing. *J Neurosci* 2003;23: 6490-6498.

(A) 餌に到達するまでに間違っ
餌のないarmに入った回数



(B) 餌に到達するまでに要した時間

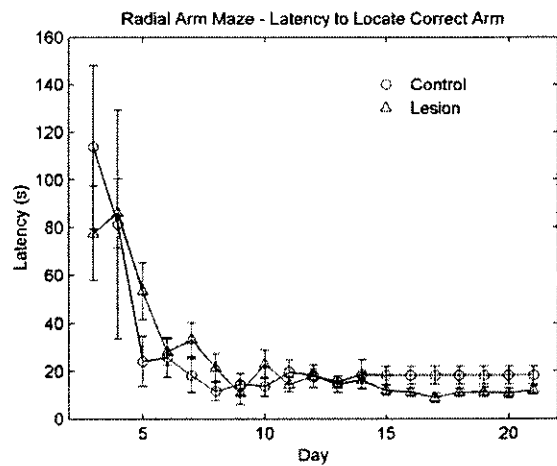
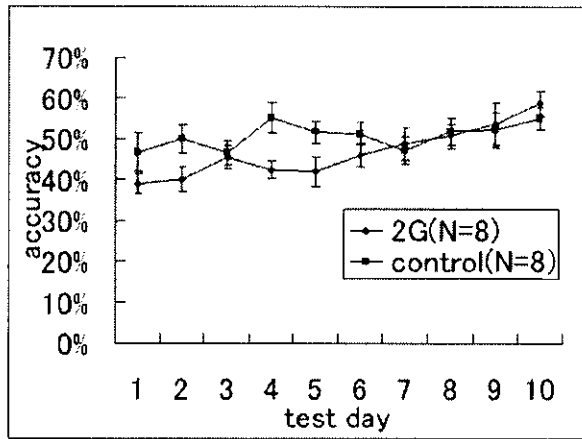


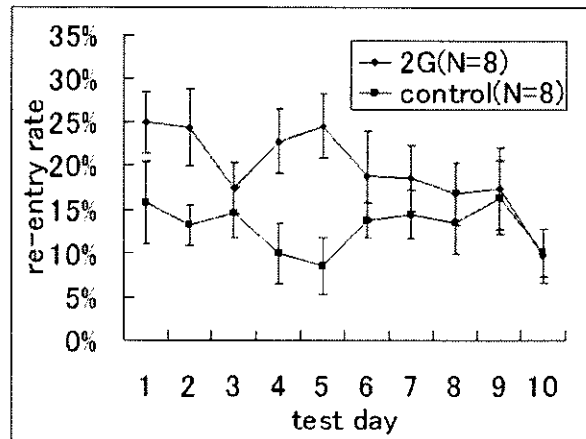
図 1

(A) 餌のあるarmに入った確率



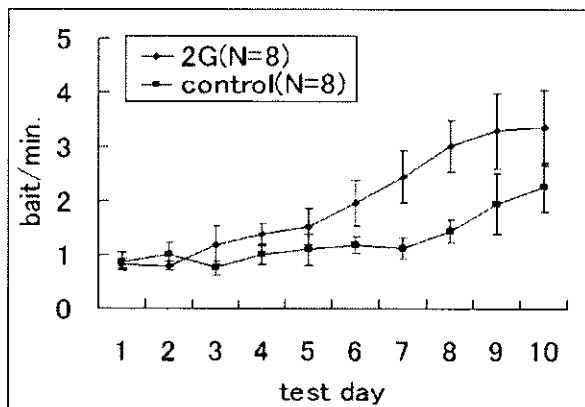
p<0.05: 2G vs control

(B) 繰り返し同じarmに入った割合



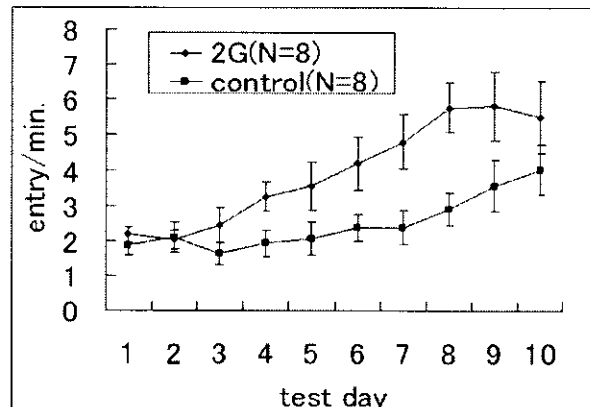
p<0.05: 2G vs control

(C) 1分間あたりに食べた餌の数



p=0.08: 2G vs control

(D) 1分間あたりにに入ったarmの数



p<0.05: 2G vs control

図 2

KCNE1・KCNE3 遺伝子 SNPs とメニエール病 Genotype の相関

土井勝美, 佐藤 崇, 宇野敦彦, 堀井 新, 久保 武
(大阪大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

K⁺イオン輸送は、内リンパ液の産生・吸収においても重要な機能を果たしている。KCNE1 と称される K⁺チャネルは、内リンパ液の産生部位である蝸牛血管条に発現することが知られ、同チャネルのノックアウトマウスでは内リンパ腔が消失することが報告されている¹⁾。また、KCNE family に属する K⁺チャネルとしては KCNE1- KCNE4 の 4 種類が同定されているが²⁾、我々は、KCNE3 が内リンパ液の吸収部位である内リンパ嚢に強く発現していることを確認している。メニエール病の発症、内リンパ水腫の形成に KCNE1, KCNE3 遺伝子が関与している可能性を考慮して、今回、これら 2 つの K⁺チャネル遺伝子上の SNPs 解析を行った。

【対象と方法】

厚生省前庭研究班, AAO-HNS の診断基準に従い、メニエール病確実例と考えられる患者 63 症例(男性 18 例, 女性 45 例; 平均年齢 42.5 歳)よりゲノム抽出を行った。患者には十分なインフォームド・コンセントを与えて研究内容に了解を得た。KCNE1, KCNE3 遺伝子の塩基配列から、それぞれの遺伝子に特異的なプライマーを作成して PCR 法によりその coding region 全長を増幅した。増幅された遺伝子断片を回収した後、直接シーケンス法によりその塩基配列を決定した。KCNE1 遺伝子上の 112G/A 変異, KCNE3 遺伝子上の 198T/C 変異の両者について、メニエール病確実例においてそれぞれの SNPs がどのような割合で存在するのかをまず決定した後、非メニエール病者(対象群; KCNE1 遺伝子については 237 例, KCNE3 遺伝子については 211 例)から抽出したゲノムにおいて上記 2 種類の SNPs の出現頻度を同様に求め、メニエール病群との間で比較検討した。

【結果】

1) KCNE1 遺伝子 SNPs メニエール病確実例 63 例の解析において、112G ホモが 28 例, 112A ホモが 8 例, 112G/A ヘテロが 27 例であった。非メニエール病群 237 例においては、112G ホモが 192 例, 112A ホモが 20 例, 112G/A ヘテロが 25 例であった(図1)。両群間の比較検討では、112A を少なくとも一つのアリルに有する割合は、メニエール病群において統計学的に有意に高かった($P < 0.001$)。

2) KCNE3 遺伝子 SNPs

メニエール病確実例 63 例の解析において、198T ホモが 52 例, 198C ホモが 3 例, 198T/C ヘテロが 8 例であった。非メニエール病群 211 例においては、198T ホモが 196 例, 198C ホモが 4 例, 198T/C ヘテロが 5 例であった(図1)。両群間の比較検討では、198C を少なくとも一つのアリルに有する割合は、メニエール病群において統計学的に有意に高かった($p = 0.0015$)。

3) SNPs と発症年齢との相関

カルテ上の記載より推察されるメニエール病の発症年齢を、KCNE1・KCNE3 遺伝子のそれぞれの SNPs 群との間で比較検討した。KCNE1 遺伝子の 112G ホモ群では平均 42.2 歳, 112A を少なくとも一つのアリルに有する群では 42.8 歳で、両者には統計学的な有意差は認められなかった。KCNE3 遺伝子の 198T ホモ群では平均 42.8 歳, 198C を少なくとも一つのアリルに有する群では 41.4 歳と、やはり両者間に統計学的な有意差を認めなかった($p = 0.72$)。

【考案】

メニエール病内リンパ水腫の形成機構は現在も不明であるが、内耳液の産生・吸収に関連する分子、すなわ

ち水代謝・電解質代謝に関与するチャンネルの質的・量的な異常がその形成に関与するものと推察されている。K⁺イオン輸送は、内耳電位の発生および内耳液の産生に必須の機構であり、同機構の破綻から難聴・めまいが発症することは容易に想像される。分子生物学的な検討から、今回解析を行った KCNE1, KCNE3 カリウムチャンネルはともに、蝸牛、内リンパ嚢の両部位に発現していることが確認され、内耳における K⁺イオン輸送および水代謝に必須の分子であることが推察される。これまでに、KCNE1 遺伝子ノックアウトマウスでは、内リンパ腔の消失が惹起されることが報告され 1)、また、同遺伝子の変異により感音難聴と不整脈 (QT 延長) を特徴とする Jervell Lange-Nielsen 症候群が発症することも報告されている 3)。

非メニエール病群との比較により、KCNE1 遺伝子の 112A, KCNE3 遺伝子の 198C を少なくとも一つのアリルに有する割合が、メニエール病確実例群において統計学的に有意に高かったことは、これら2種類の SNPs が、メニエール病の発症に何らかの遺伝的背景を与える可能性を強く示唆するものと考えられる。一方、これらの SNPs と発症年齢との間には有意な相関を確認できなかったことは、これらの SNPs はメニエール病の若年発症の因子ではないことを意味している。

今後も、メニエール病の臨床的な特徴や聴覚・平衡機能検査値と KCNE1, KCNE3 遺伝子上の2種類の SNPs との相関を詳細に解析することで、これらの SNPs により何が規定されているのかを明らかにしていきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) Vetter DE, Mann JR, Wangemann P, et al. Inner ear defects induced by null mutation of the *isk* gene. *Neuron* 1996; 17: 1251-1264.
- 2) Schroeder BC, Waldegger S, Fehr S, et al. A constitutively open potassium channel formed by KCNE1 and KCNE3. *Nature* 2000; 403: 196-199.
- 3) Schulze-Bahr E, Wang Q, Wedekind H, et al. KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nature Genet* 1997; 17: 267-268.

KCNE1・KCNE3遺伝子SNPsと発症率

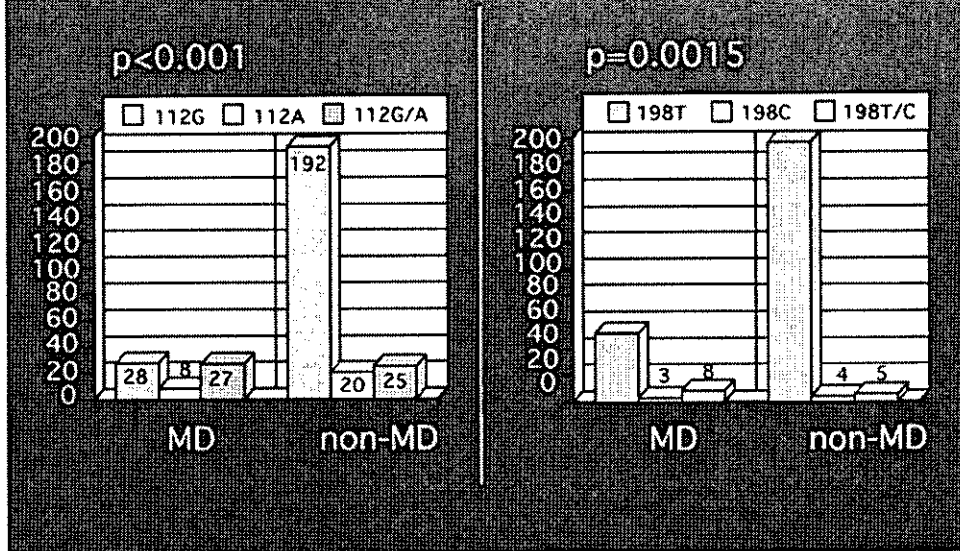


図 1

めまいの自覚症状に対する SSRI の効果

堀井 新, 三谷健二, 北原 紘, 宇野敦彦, 武田憲昭*, 久保 武
(大阪大学医学部耳鼻咽喉科, *徳島大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

めまいを訴える患者の精神的背景として、うつ状態や不安神経症を合併していることが多いことは良く知られており、めまいの治療の際には器質疾患に対してのみならず患者の精神的背景も考慮する必要がある 1)。また、神経症傾向を有する患者では正常人では感じることの少ないわずかな前庭障害でも「めまい」として自覚することが多いとの報告もある 1)。そのため他覚所見のみに重点をおいてめまいの改善を判定することは困難で、アンケートを用いた自覚症状の問診が重要である 2)。近年、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor, SSRI) が新規抗うつ／抗不安薬としてうつやパニック障害に広く用いられるようになってきたが、めまい患者に対する効果について検討した論文は少ない 3)。そこで本研究ではめまい患者 47 名に SSRI を投与し、その前後のうつ状態を Self rating Depression Scale (SDS) を用いて、まためまいの自覚症状に関しては我々の開発しためまいアンケート 2) を用いて検討した 4)。

【方法】

めまい、ふらつきを訴えて、大阪大学医学部附属病院耳鼻咽喉科めまい外来を受診した患者のうち SSRI 投与に同意し 8 週間の継続投与を行った 47 名の患者を対象とした。患者を治療前の時点で器質疾患を持ち SDS 高値群 (Group I, 12 名)、器質疾患を持ち SDS 低値群 (Group II, 17 名)、器質疾患を持たず SDS 高値群 (Group III, 6 名)、器質疾患を持たず SDS 低値群 (Group IV, 12 名) の 4 群に分けた。SDS は 48 以上で高値とした。群間で性別、年齢、罹病期間、CP% に差はなかったが、Group I のみ Group III に比し有意な聴力低下を認めた。Group I および II における器質疾患の内訳はメニエール病 16 例、前庭神経炎 6 例、遅発性内リンパ水腫 3 例、一側性内耳障害、両側性内耳障害、BPPV、頭部外傷各 1 例であった。これらの計 47 名の患者に SSRI (パロキセチン, 20mg/day) を投与し、4 週後および 8 週後に SDS およびめまいアンケートを行った。他覚所見については同時期に各種眼振検査や体平衡機能検査、必要に応じて ENG を行い異常所見の有無について検討した。

【結果と考察】

我々の開発しためまいアンケート 2) では、めまいにより引き起こされる様々な自覚症状を因子 1 (社会活動性の障害)、因子 2 (身体の動きや視覚による症状増悪)、因子 3 (全般活動性の障害)、因子 4 (感情障害)、因子 5 (対人関係の障害) に分けて検討することが可能である。

治療前の SDS の結果、SDS 高値は 47 名中 18 名 (Group I 12 名, Group III 6 名) でめまいを訴える患者にうつ状態を合併することが多いことが示唆される。治療前のめまいアンケートの結果、Group I では上記のすべての因子について Group IV より障害が強く、Group I 同様器質疾患が存在する例でも SDS 低値群 (Group II) では因子 1, 2, 4 で Group I より障害の程度は軽かった。このことより、めまい患者では SDS 高値群において全般的に日常生活支障度が高いことが判明し、これらの精神的背景を有する群ではうつに対する治療を積極的に考慮する必要性が示唆された。

Group I ではめまいアンケートのすべての因子と SDS が SSRI 投与 4 週で有意に改善した。Group III ではめまいアンケートの因子 1 と SDS が SSRI 投与 4 週で有意に改善し、他の因子でも改善傾向を認めたが n が少なく有意には至らなかった。Group II および Group IV ではめまいアンケート、SDS ともに改善は認めなかった。これらの結果より、器質疾患の有無に関わらず SDS 高値群 (Group I, III) では SSRI は患者のうつ状態を改善させるだけでなく、めまいによる自覚症状 (日常生活障害度) の改善に有用であることが判明した。Group

II は器質疾患を持つが SDS は低値である群であり, SSRI はめまいの自覚症状に無効であった。これらの患者にはまず器質疾患に対する適切な薬物治療やリハビリテーションが必要であると思われる。Group IV は器質疾患もなく SDS も低値である群である。この群ではめまいアンケートによると治療前の日常生活支障度が軽く, そのためにアンケートによる改善の検出に限界があった可能性が考えられる。

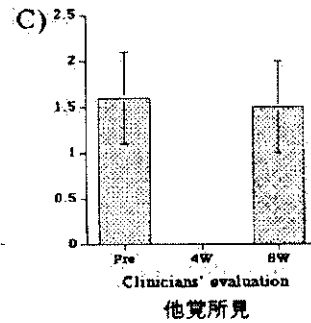
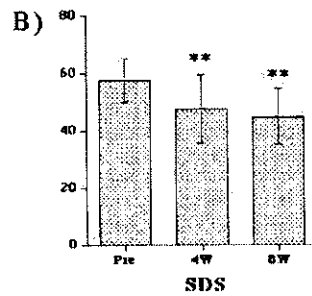
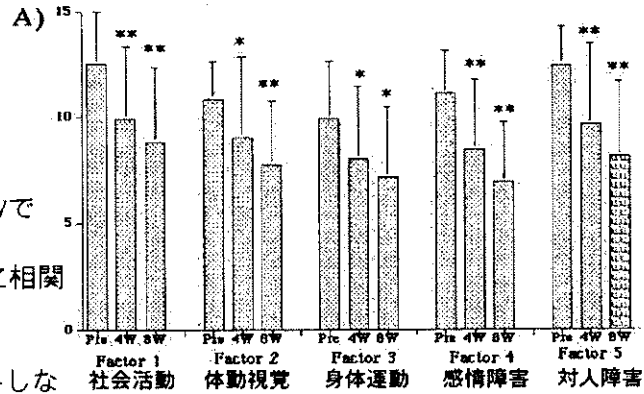
めまいを訴える患者は比較的高率にうつ状態を合併しており, このような患者の治療にはその精神的背景も考慮する必要がある。特にうつ傾向のある患者の治療において SSRI はうつ状態の改善のみならずめまいによる日常生活障害の改善に有用な薬剤であると言える。

【参考文献】

- 1) 荻野 仁. 心因性のめまい. 耳鼻咽喉科診療プラクティス EBM に基づくめまいの診療と治療. 文光堂, 2001, pp.60-64.
- 2) 西池季隆, 武田憲昭, 肥塚 泉, 林 治博, 久保 武, 荻野 仁. めまい患者の日常生活支障度: 多変量解析を用いた評価. 日耳鼻 1995;98: 31-40.
- 3) Staab JP, Ruckenstein MJ, Solomon D, Shepard NT. Serotonin reuptake inhibitors for dizziness with psychiatric symptoms. Arch Otolaryngol Head and Neck Surg 2002;128: 554-60.
- 4) Horii A, Mitani K, Kitahara T, Uno A, Takeda N, Kubo T. Paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), reduces depressive symptoms and subjective handicaps in patients with dizziness. Otol Neurotol 2004, in press.

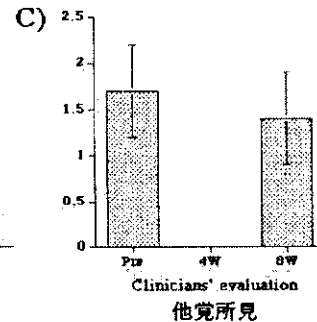
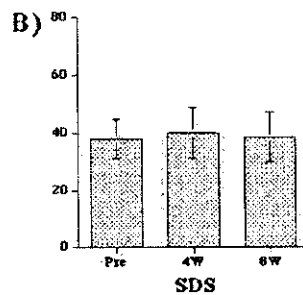
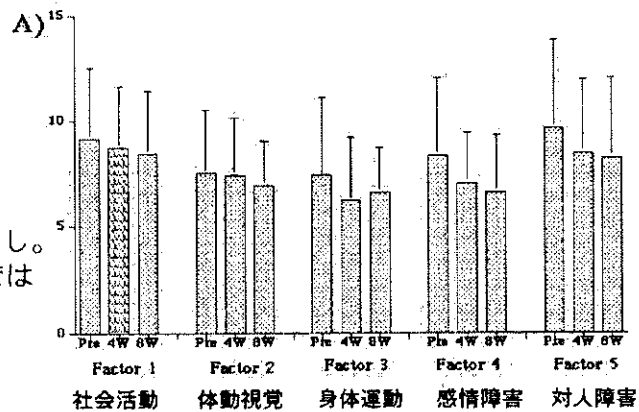
Group I:
器質疾患 (+)
High SDS

- ・ SDSおよび全ての因子で投与4Wで改善=自覚症状の改善あり。
- ・ SDSの改善と因子1, 4, 5の改善に相関あり。
- ・ 他覚所見に改善なし。
- ・ SSRIは前庭機能の回復には寄与しないが、うつ状態を併発した患者では満足度は高い。



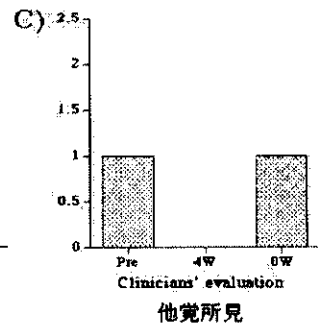
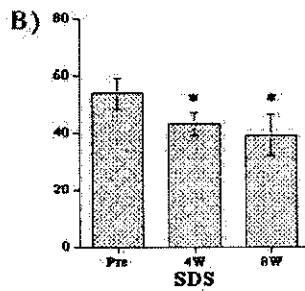
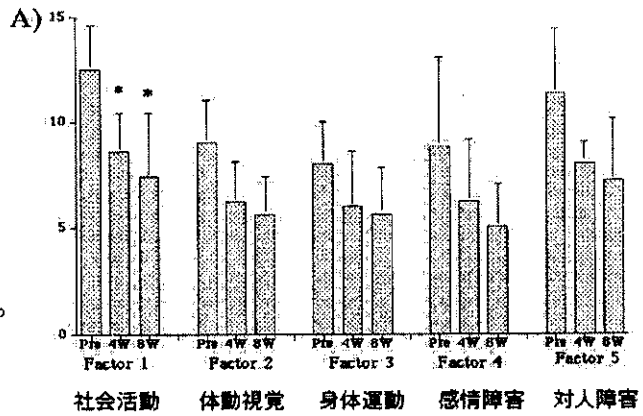
Group II:
器質疾患 (+)
Low SDS

- ・ SDSおよびすべての因子で改善なし。
- ・ うつ状態を併発していない患者ではSSRIは患者の満足度は得られず、器質疾患に対する治療が重要。



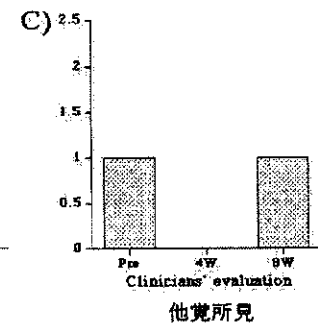
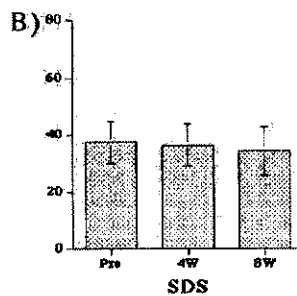
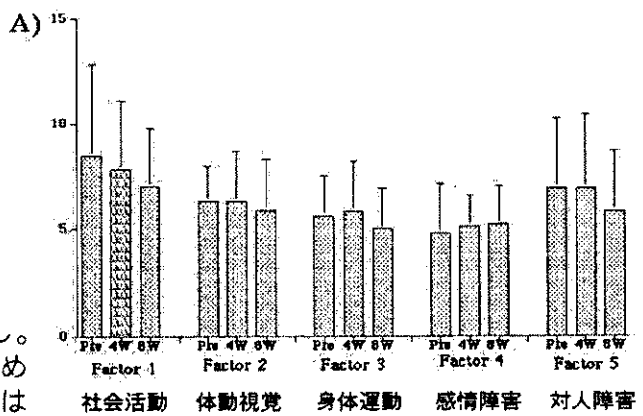
Group III:
器質疾患(-)
High SDS

- ・ SDSおよび因子1で改善した。
- ・ 他の因子でも改善傾向を認めた。
- ・ 器質疾患なく、うつ傾向の高いいわゆる心因性めまい患者ではめまいの自覚症状改善にSSRIが有用である。



Group IV:
器質疾患 (-)
Low SDS

- ・ SDSおよびすべての因子で改善なし。
- ・ 治療前からスコアが低く(=はじめの支障度が低すぎて)アンケートでは微妙な改善を感知できなかった可能性?



厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
分担研究報告書

良性発作性頭位めまい症の発症メカニズムに関する調査研究

分担研究者 鈴木 衛 東京医科大学教授

研究要旨 BPPV における理学療法後のめまい感の発生機序について実験した。また、振動負荷を側頭骨に加え惹起される前庭器の変化を形態学的に検討した。1) 摘出卵形囊斑に振子様用回転を加え、卵形囊上に耳石塊を置く前後で比較した。耳石を置いた直後には一過性の著明な活動電位の上昇がみられた。耳石を置いた状態で振子様回転を行うと回転による電位は増加した。理学療法によって耳石が卵形囊に変換された後、一過性にめまい症状が悪化することが多い。返還した耳石が卵形囊の活動を高めている可能性が示唆された。2) 振動負荷後半規管感覚毛には変化はなかったが、球形囊には毛の脱落などの変化が現れた。球形囊は他の前庭器よりも迷路骨面に近接して存在し、感覚毛の短いことが障害が生じた原因と考えられた。我々は以前に鼓室形成術直後高率に頭位性眼振が出現することを報告した。振動による耳石系の形態学的変化が頭位性眼振に関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

1) 理学療法後に増悪するめまい症状の発生機序を摘出卵形囊モデルを用いて検索する。

2) 側頭骨への振動負荷による前庭器障害について検索し、頭位性眼振の発生機序の一端を解明する。

B. 研究方法

1) 両生類摘出卵形囊に振子様用回転刺激を加えて発生する活動電位を測定する。ついで卵形囊斑上に球形囊から摘出した小耳石塊を置き、同じ刺激下の電位の変化を調べる。

2) マウス側頭骨にダイヤモンドバーで5分間の振動負荷を加え、前庭器感覚上皮の変化を顕微鏡とTEMにより検索する。

C. 研究結果

1) 正常卵形囊の刺激では振子様用回転に応じてサイン波状に変化する電位が記録された。卵形囊斑上に耳石を置くと直後に電位は一過性に著しく増加した。耳石を置いた状態で振子様回転を行うと、回転に応じる電位は正常よりも増加した。

2) 振動負荷後半規管感覚毛には変化はなかったが、球形囊には毛の脱落などの変化が現れた。卵形囊では変化はほとんどみられなかった。

D. 考察

1) BPPVにおいては半規管結石症などの病態を考慮した理学療法が考案され、効果をあげている。

これにより発作性のめまいは著明に抑制されるが、不安定感などの軽いめまい症状は一時的に悪化したり、数日間持続することが多い。今回の実験で、卵形囊斑上に耳石を置いた直後とそれ以後しばらく卵形囊活動電位が増加したことより、これが理学療法直後のめまい症状の増悪や持続する不安定感の原因になりうるものと考えられた。

2) 鼓室形成術では長時間ドリルを使用して骨を削開することが多い。我々はすでに鼓室形成術直後に高率に頭位性眼振が発生することを報告した。今回の実験で、振動負荷によって球形囊を中心に感覚毛の変化がみられたのは、球形囊が他の前庭器よりも迷路骨面に近接して存在し、感覚毛が短いことによるものと考えられた。耳石器の変化によって臨床的にいかなる眼振が出現するかはいまだ明らかではない。振動により耳石系に起こる形態学的変化が頭位性眼振に関与している可能性が示唆された。

E. 結論

1) BPPVの理学療法後のめまい症状の増悪に、返還した耳石が関与することが示唆された。

2) 振動により耳石器感覚上皮に変化が起こり、これが頭位性眼振の原因の一つになることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Otsuka K, Suzuki M, Furuya M. Model experiment of benign paroxysmal positional vertigo mechanism using the whole membranous labyrinth. *Acta Otolaryngol* 2003;123:515-518.
- 2) Furuya M, Suzuki M, Sato H. Experimental study of speed-dependent positional nystagmus in benign paroxysmal positional vertigo. *Acta Otolaryngol* 2003;123:709-712.
- 3) 鈴木 衛. 半規管遮断術後の温度眼振反応. *Equilibrium Res* 2003;62:190-193.
- 4) 市村彰英, 鈴木 衛, 堀口利之, 湯川久美子, 小川恭生, 北島尚治. 下眼瞼向き眼振症例の検討. *Equilibrium Res* 2003;62:302-307.
- 5) 市村彰英, 鈴木 衛, 堀口利之, 北島尚治. 方向交代性頭位眼振症例の検討. *Equilibrium Res* 2003;62:88-95.
- 6) 萩原 晃, 鈴木 衛. 聴覚検査と平衡機能検査の接点. *臨床検査* 2003;47:1151-1156.

2. 学会発表

- 1) 鈴木 衛. 頭位性めまいの取り扱い. 第 10 回 山口県めまい研究会, 宇部市, 2003.11.
- 2) 鈴木 衛. 病態からみた頭位性めまいの取り

扱い. 新医療保険医療医事問題講習会. 浦和市, 2003. 2.

- 3) 鈴木 衛. 頭位性めまいの病態と治療. 第 3 回群馬めまい研究会 前橋市, 2003.4.
- 4) 鈴木 衛. 頭位性めまいの病態と臨床. 第 19 回大分耳鼻咽喉科臨床研究会, 大分市, 2004.1.
- 5) 鈴木伸弘, 市村彰英, 堀口利之, 小川恭生, 清水重敬, 北島尚治, 井上 斉, 鈴木 衛. 内耳性難聴における VEMP の検討. 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003.5.
- 6) 竹之内 剛, 古屋正由, 大塚康司, 小川恭生, 鈴木 衛. 温度眼振反応に関する内リンパ動態の実験的研究. 第 104 回日耳鼻会総会, 東京, 2003.5.
- 7) 竹之内 剛, 小川恭生, 清水重敬, 鈴木 衛, 市村彰英. めまい疾患における座位頭部前屈位眼振検査の試み. 第 62 回日本めまい平衡医学会総会, 横浜, 2003.11.

H. 知的所有権の取得状況

なし

振動負荷による前庭器の形態学的変化

鈴木 衛, 佐藤春城, 金林秀則
(東京医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

音はじめ機械的な振動が内耳に及ぼす影響については、蝸牛では騒音性難聴の研究を中心に多くの報告があり、病態が明らかになっている。しかしながら、振動が前庭器に及ぼす影響についての研究はきわめて少ない。鼓室形成術は頻繁に行われる手術であり、長時間にわたり内耳近傍をドリルで削開するなど振動負荷を与える機会が多い。振動が前庭器にいかなる影響を及ぼすかは検索しておく必要がある。すでに市村(1)は鼓室形成術直後に頭位性眼振検査を施行し、約45%の症例にめまい症状は伴わないものの何らかの頭位性眼振が見られたとした。眼振は術側向きで水平性が多く、数日から数週で消失したとした。眼振の原因として耳石器が考えられるが、耳石器が障害あるいは刺激されたときいかなる眼振が出現するかはいまだ明らかでない。今回、マウスの側頭骨に振動を負荷し耳石器など前庭器の変化について検討した。

【方法】

生後6-8週のBALB-cマウスをケタラールで深麻酔し、頭皮を剥離し頭頂部に5分間の耳科用手術バーで1分間30,000回転の振動刺激を負荷した。負荷直後に内耳を摘出し、2.5%パラホルムアルデヒド・グルタルアルデヒド混合液にて局所環流を行った。その後同液で4℃、2時間の固定、さらに1%オスミウムで4℃、2時間の後固定後半規管膨大部、球形囊斑および卵形囊斑を取り出した。さらにエタノールで脱水後プロピレンオキサイドで置換し、エポンにて包埋した。その後光顕およびTEMにて観察した。

【結果】

半規管膨大部感覚上皮には振動負荷後変化はみられなかった。卵形囊斑にもほとんど変化はなかった。一方、球形囊斑には感覚毛の脱落を主とする障害がみられた。感覚細胞体自体には変化はなかった(図)。また、球形囊耳石の脱落もみとめられた。

【考察】

良性発作性頭位めまい症(BPPV)の病態は基礎的研究や理学療法の見直しなどから次第に明らかになってきた(2, 3)。半規管結石症やクプラ結石症がその代表的な病態と考えられており、理学療法の有効性が注目されている。しかしながら、中には眼振所見の非典型例、眼振が移行する例、理学療法無効例などもあり、病態が単純でないことが想像される。過去の基礎的研究(4)から、半規管のみでなく耳石器も病態の一因となることも予想される。

鼓室形成術は日常頻繁に試行される手術であるが、ドリルの前庭への影響についてはこれまでほとんど検討されてこなかった。すでに市村(1)は鼓室形成術直後に頭位性眼振検査を施行し、約45%の症例にめまい症状は伴わないものの何らかの頭位性眼振が見られたとした。眼振は術側向きで水平性が多く、数日から数週で消失した。生理学的には耳石器の刺激で水平性眼球運動がみられたとの報告がある(5)。鼓室形成術後の眼振の原因として耳石器が考えられる(1)が、耳石器が障害あるいは刺激されたとき臨床的にいかなる眼振が出現するかはいまだ明らかでない。

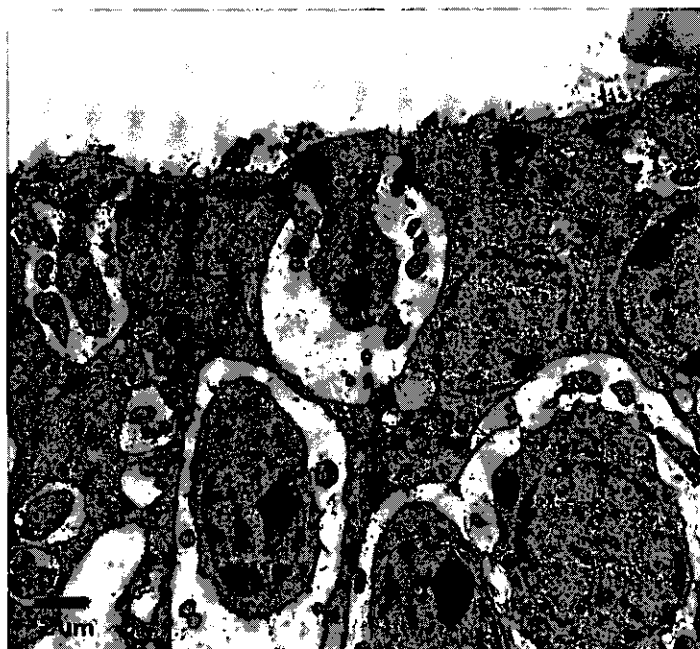
今回の実験から5分間という短い振動負荷であったが、球形囊を中心に感覚毛の変化がみられた。球形囊斑は前庭器の中で最も骨面に近接して位置しており、このことが振動の機械的影響が感覚毛に及んだ原因と考えられる。耳石自体の脱落も観察された。耳石の脱落所見は実体顕微鏡でも観察しており、耳石と感覚毛双方の変化が振動により起こりうると思われる。耳石器の変化が頭位性眼振の原因になり、眼振所見を多彩にし、非

典型例や治療後の眼振残存の原因などになりうることがうかがわれる。

今後は負荷時間を延長して他の前庭器の変化を詳しく観察し、また感覚毛の経時的な変性様式や再生についても検討する予定である。

【参考文献】

- 1) 市村彰英. 鼓室形成術および人工内耳手術後の頭位眼振所見. *Equilibrium Res* 2001;60:105-112.
- 2) Welling DB, et al. Particulate matter in the posterior semicircular canal. *Laryngoscope* 1997;107:90-94.
- 3) Suzuki M. et al. Functional model of benign paroxysmal positional vertigo using an isolated frog semicircular canal. *J Vest.Res* 1995;6:121-125.
- 4) 児玉 章 他. 良性発作性頭位眩暈症の側頭骨病理組織. *耳喉* 1981;53:149-156.
- 5) Goto F, et al. Eye movements evoked by the selective stimulation of the utricular nerve in cats. *ANL* 2003;30:341-348.



図

球形嚢感覚上皮のTEM所見. 感覚毛が脱落している.

摘出卵形囊による BPPV のモデル実験

鈴木 衛, 北島尚治, 竹之内 剛, 大塚康司, 小川恭生
(東京医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

良性発作性頭位めまい症(以下 BPPV)は予後良好で種々の理学療法が工夫されているが(1, 2)中には再発や無効例もあり, さらなる病態の検討が必要である。また, 頭位変換療法施行直後や以後の経過において眼振は消失したものの浮遊感を残す症例も多い。

今回我々は, 摘出卵形囊を用いて BPPV モデルを作成し, BPPV 治癒過程で感じる浮動感, 特に頭位変換療法後に増強するめまい感について検討した。

【対象と方法】

実験動物にはウシガエルを用いた。エーテル深麻酔後断頭し, 内耳を摘出した。卵形囊を上前庭神経, 前・外側半規管とともに切離した。頭位変換療法後に耳石などの debris が卵形囊斑に返還することを想定し, 卵形囊斑上に耳石を置く前後で卵形囊神経活動電位を比較した。

刺激には振子様回転を用いた。ターンテーブル中央にリンゲル液をみたしたガラス容器を設置後, その中に摘出検体を回転中心から3cm の距離に置いた(図1)。図2は回転方向が卵形囊斑に対し内外方向の刺激になるよう設置した場合の略図である。右耳であれば左回転が外側への刺激, 右回転が内側への刺激となる。

上前庭神経をガラス吸引電極で吸引して記録電極とし, 前半規管と外側半規管からの電位の混入を防ぐためそれぞれの膨大部神経を切断した。また, 回転の際に検体が動かないよう半規管あるいは膨大部にガラス針を刺し検体を固定した。

ターンテーブルは角度左右 270 度, 1周期 10 秒で振子様回転させた。予測最大加速度は 84 度/sec²であった。卵形囊斑の中央付近に同側の球形囊から摘出した耳石塊を置き, 頭位変換療法後のモデルとした(図3)。記録された活動電位原波形はスパイク密度ヒストグラムに変換した。

【結果】

1. 正常卵形囊の反応

正常卵形囊に振子様用回転を加えると回転方向に同期する発火頻度の増減が認められた。刺激時の最大発火頻度は自発放電の約 2 倍であった。

2. 耳石除去卵形囊の反応

正常卵形囊から耳石膜を剥離しないよう注意深く耳石のみを洗い落とし, 同様に振子様刺激を加えた。自発放電は残るが耳石除去前と比べて振子様刺激への反応は著明に低下した(図4)。

3. BPPVモデル実験

球形囊から摘出した耳石を卵形囊上に置く前後で発火頻度を比較した。耳石を置いた直後放電は一時的に増加した。以後, 振子様用刺激に同期する放電頻度は耳石を置く前に比べて増加した(図5)。

【考察】

前庭器は内耳骨胞内に深く存在し, 観察はもとより直接の刺激は容易でない。両生類半規管と卵形囊は哺乳類のそれと形態的に酷似しており, 受容器の電気生理学的性質にも共通点が多い。また, 膜迷路が強靭で摘出などの操作が容易であるため, 生理実験には以前より使用されてきた(3, 4)。今回, 卵形囊への直接刺激法として生理的刺激に近い振子様回転を試みた。

回転に応じて増減する活動電位は卵形囊神経から容易に記録された。著者は以前に摘出半規管のクブラを