

相関しないものと考えられる。今回の検討でも、疾患持続が長くなり、聴力障害の進行した症例で蝸电图陽性になりやすいことが考えられ、それに対し、血漿 AVP 値は疾患持続とは無関係であることから、その病態の同じ側面を見ているものではないのであろう。またグリセロールテストも、蝸牛の病態に関連するものであり、AVP と単純に相関するものではないようである。

今回の症例で、3つの検査すべて陰性を示したのは1例のみであり、これら検査を組み合わせることにより、メニエール病の診断は非常に楽になるのではないかと思われる。しかしながら、血漿 AVP からメニエール病の予後を推定するまでは、まだ難しく、今後の検討課題と思われる。

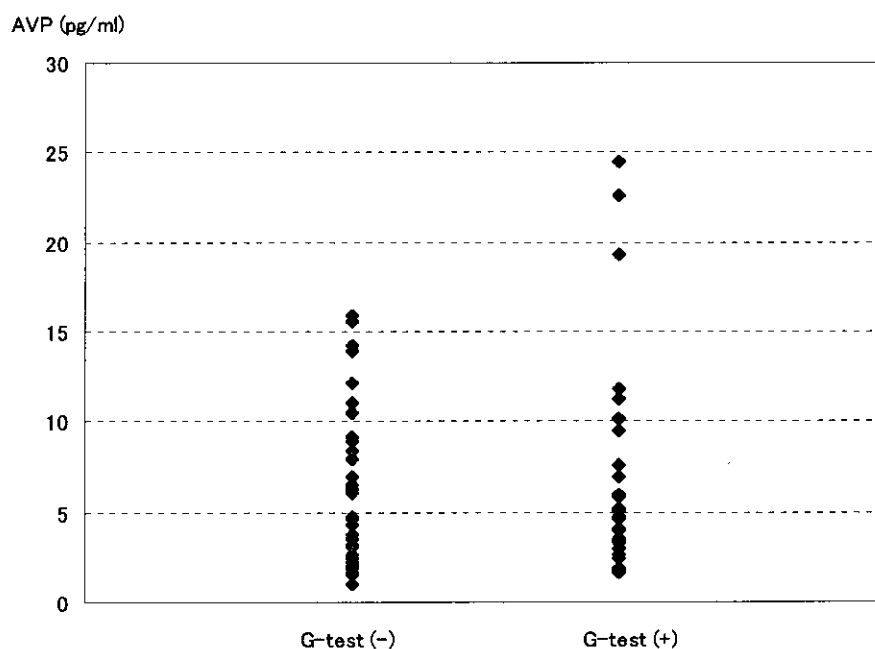


図1 血漿 AVP とグリセロールテスト

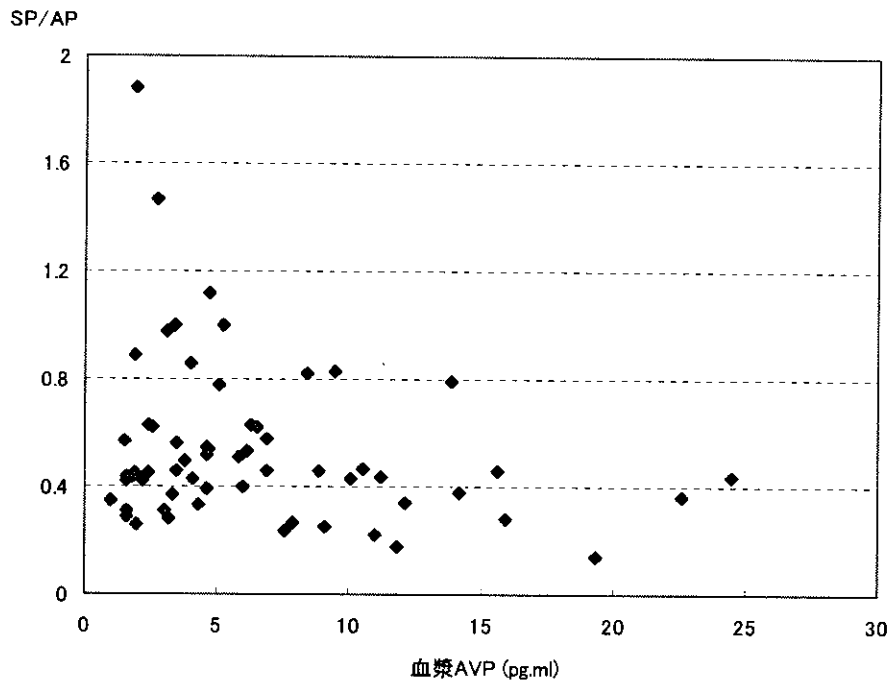


図2 血漿 AVP と SP/AP

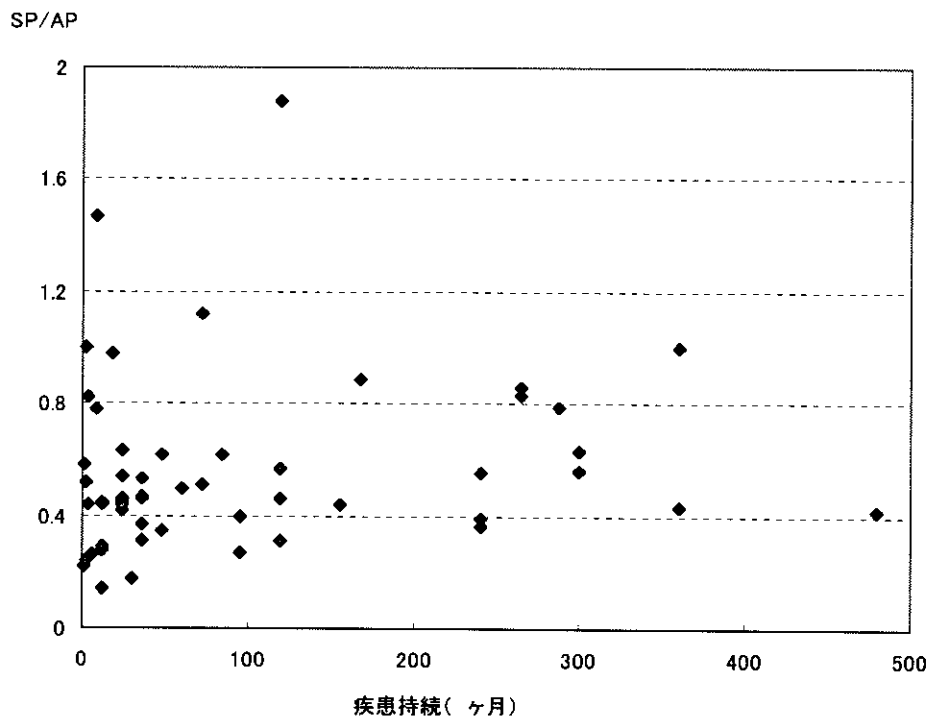


図3 疾患持続と SP/AP

ヒスタミンレセプターのラット内耳における発現と局在

東 祐史, 澤田正一, 山河和博, 柿木章伸, 竹田泰三
(高知大学医学部神経統御学講座 聴平衡・嚙下機能統御学教室)

【はじめに】

ヒスタミンは生体アミンのひとつであり, 中枢ではヒスタミンニューロンの伝達物質として, 末梢では即時型免疫反応や胃酸分泌に関与していることが知られている. また, ヒスタミンの標的細胞に発現しているヒスタミンレセプターは, H1, H2およびH3レセプターに分類され, これらを介してさまざまな生理作用を担っている. 内耳とヒスタミンの関係については, 内耳微小循環や神経伝達物質に関する報告があるが, その受容体の発現や局在に関する報告はない.

一昨年の本研究会において, 我々は内耳において, ヒスタミン受容体の mRNA が発現していることを報告した. しかしながら, その局在までは検討できず, 生理学的な意義についても明らかではなかった. 今回我々は, 内耳の micro-dissection における PCR, および免疫染色を用いて, ヒスタミン受容体の発現と局在について検討したので報告する.

【方法】

1. RT-PCR

対象は Wistar 系ラット12匹. 灌流はネブタール深麻酔下に PBS にて, 経心灌流ののち, 脳, whole cochlea を直ちに摘出し, total RNA を抽出した. それとは別に, 内耳を実体顕微鏡下に lateral portion (血管条, ラセン靭帯), medial portion (コルチ器), modiolus に micro-dissection し, 同様に total RNA を抽出. Total RNA を逆転写し cDNA を作成, 内耳および脳組織の cDNA について, H1, H2およびH3レセプターに対する特異的なプライマーを用いて PCR を施行.

PCR 産物の検出は, アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド染色で行った. また, それぞれの PCR 産物は, サイクルシーケンス法にて塩基配列の確認をした.

2. 免疫組織科学的検討

対象は Wistar 系ラット. 4%パラホルムアルデヒドにて経心灌流ののち, 側頭骨を採取し, overnight で固定, 10%EDTA にて1週間脱灰ののち, 凍結切片を作成. 7-10 μ の薄切切片を作成し, 10%ヤギ血清でブロッキングしたのち, 一次抗体で overnight インキュベーション. 一次抗体には, Chemicon の anti-histamine H1,H2,H3 receptor をそれぞれ使用, 抗体濃度は1:200.

二次抗体は Alexa 546 anti-rabbit antibody を用いて6時間インキュベーションしたのち, 共焦点レーザー顕微鏡で観察した.

【結果】

1. RT-PCR

ラットの内耳と脳において, それぞれH1,H2,H3レセプターの発現を認めた (図. 1). また, ネガティブコントロールとして逆転写反応を行わなかったサンプルでは, バンドは認めなかった.

内耳をそれぞれ, modiolus, medial portion, lateral portion に分けたサンプルの RT-PCR の結果は, H1,H2,H3 receptor ともに modiolus のみに発現していた (図.2).

2. 免疫染色

H1,H2,H3 receptor ともにラセン神経節のみに陽性に染まり, 血管条やラセン靭帯, コルチ器などには陽性所見は認めらなかった (図. 3).

さらに, ラセン神経質細胞 I 型細胞か II 型細胞のどちらが免疫陽性か調べるために, II 型細胞が染まる

neurofilament 200kD の抗体とヒスタミン H1,H2,H3 レセプターとの同一切片で二重染色を行った。結果は Neurofilament 200kD で陽性を示すのが II 型細胞であることより、ヒスタミン H1,H2,H3 レセプターともにほとんどの I 型細胞に陽性を示した(図.4)。

【考察】

内耳におけるヒスタミンの生理学的な機能については、いくつかの報告があるが、明らかでない点が多い。カエルの平衡器官の電気生理学的な実験で、ヒスタミンは有毛細胞の伝達物質として働く可能性を示唆している。しかしながら、蝸牛については、ほ乳類内耳におけるヒスタミンの電気生理学的な報告が2つあるだけである。Minodaらは 10,50microM の鼓室階へのヒスタミン灌流では CAP の増加を認め、この増加はヒスタミン H1,H2 レセプターのアンタゴニストによって抑制されたと報告しており、ヒスタミンが内耳において神経伝達物質として働いている可能性とヒスタミンレセプターの内耳における存在の可能性を示唆していた。今回、ヒスタミンレセプターがI型ラセン神経節細胞に発現していたことより、二つのことが考えられた。一つはヒスタミンが有毛細胞から求心第一次ニューロンへの神経伝達物質として働いている可能性、もう一つは求心第一次ニューロンにシナプスする遠心系の神経伝達または、調節物質として働いている可能性が考えられた。

しかし、今後、さらに生理実験を行い、内耳へどのような生理学的な影響を与えるか、明らかにする必要があると考えられた。

【参考文献】

- 1) Azuma H, Sawada S, Takeuchi S, Higashiyama K, Kakigi A, Takeda T. Expression of mRNA encoding the H1, H2, and H3 histamine receptors in the rat cochlea. *Neuroreport* 2003;14: 423-425.

Fig.1

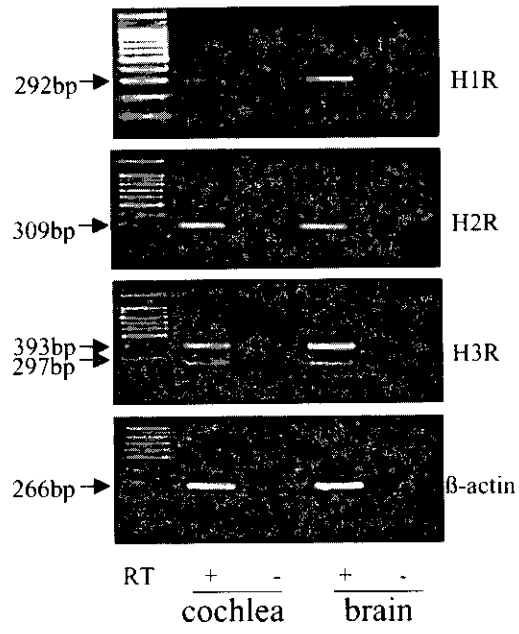


Fig.2

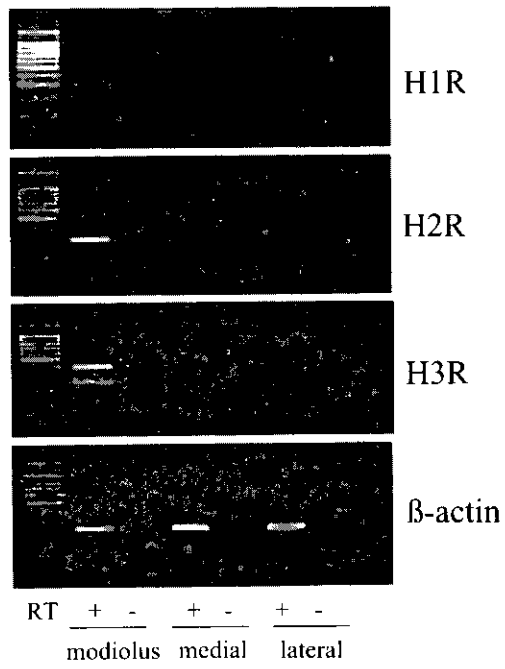


Fig.3

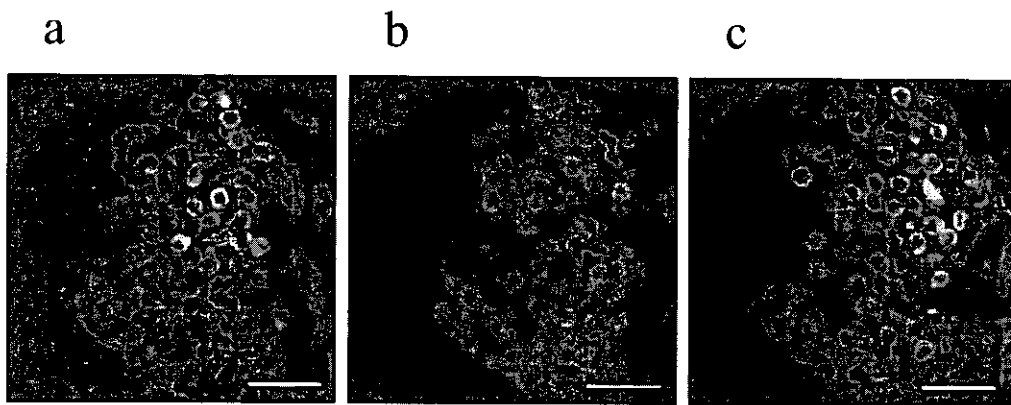
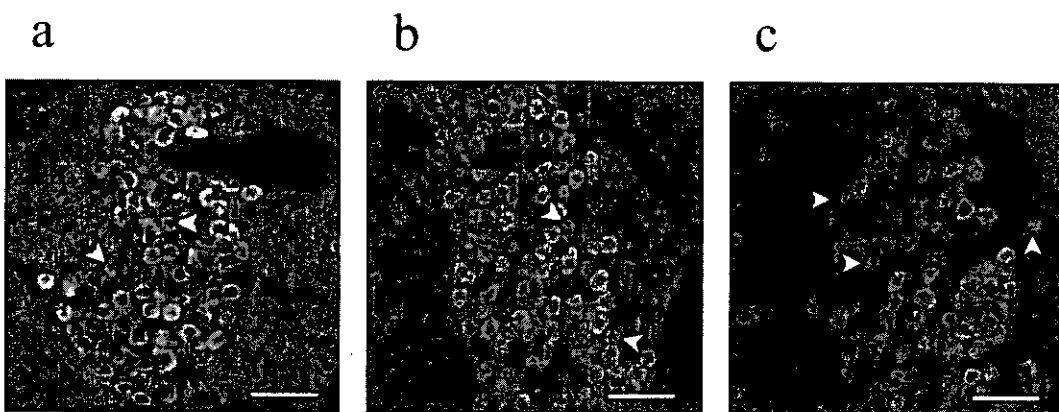


Fig.4



メニエール病のストレスと BPPV の眼振の経時変化に関する研究

分担研究者 武田 憲昭 徳島大学教授

研究要旨 ストレス解析用 DNA マイクロアレイを用いて、メニエール病患者のストレスを評価した。メニエール病患者では、めまい発作時や急性期にはストレス関連遺伝子の発現変化が認められたが、症状が落ち着くにしたがってストレス関連遺伝子の発現変化は認められなくなった。ストレス解析用 DNA マイクロアレイはメニエール病のストレスを客観的かつ定量的に評価することが可能と考えられた。良性発作性頭位めまい症の病態は半規管結石とクプラ結石があり、病態の違いが眼振の経時変化にどのような影響を及ぼすか検討した。半規管結石症例では眼振が早期に消失するのに対し、クプラ結石症例では眼振が消失しにくかった。良性発作性頭位めまい症の病態の違いが治癒率に影響を及ぼしていると考えられた。

A. 研究目的

1) ストレス解析用 DNA マイクロアレイを用いて、メニエール病患者のストレスを評価する。

2) 良性発作性頭位めまい症(BPPV)の病態は半規管結石とクプラ結石があり、病態の違いが眼振の経時変化にどのような影響を及ぼすか検討する。

B. 研究方法

1) メニエール病患者を対象とし、末梢白血球のストレス関連遺伝子の発現変化を、発作期と非発作期で比較する。DNA マイクロアレイは、基板上にプローブ DNA を高密度に集積化して、多数の遺伝子の mRNA 発現量を迅速に解析できる。末梢白血球はストレスに関連する因子のほぼ全ての受容体を持っているため、末梢白血球に伝えられたストレス応答を白血球の mRNA の発現としてとらえ、1500 個のストレス関連遺伝子を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析することで、ストレスを客観的・定量的に評価する。

2) BPPV 患者 97 例について検討した。後半規管型 P-BPPV、前半規管型 A-BPPV、外側半規管型 H-BPPV に分類し、H-BPPV はさらに①上向性持続型: 方向交代性上向性眼振を呈し持続時間が長い、②上向性減衰型: 方向交代性上向性眼振を呈し持続時間が短い、③下向性持続型: 方向交代性下向性眼振を呈し持続時間が長い、④下向性減衰型: 方向交代性下向性眼振を呈し持続時間が短い の 4 型に分類した。P-BPPV および A-BPPV は耳石置換法(Epley 法)によって治療を行い、H-BPPV は耳石置換法(Lempert 法)・治

療的頭振・Brandt-Daroff 法にて治療を行い、眼振の消失を経時的に観察した。

C. 研究結果

1) カロリックテストの前後におけるストレス関連遺伝子の発現変化を評価すると、カロリックテストによるめまい発作誘発ではストレス関連遺伝子の発現変化は認められなかった。しかし、メニエール病患者にて病期とストレス関連遺伝子の発現変化を評価すると、めまい発作時、急性期には多くのストレス関連遺伝子の発現変化が認められたが、症状が落ち着くにしたがってストレス関連遺伝子の発現変化は認められなくなった。

2) BPPV 症例の眼振の経時変化を型別に評価すると、P-BPPV 及び下向性減衰型 H-BPPV 症例の眼振残存率に対して、上向性持続型 H-BPPV 症例の眼振残存率が有意に高かった。方向交代性上向性眼振から下向性眼振に変化した症例は上向性持続型 H-BPPV に比べて早期に眼振が消失した。BPPV 症例を減衰型 BPPV 症例(P-BPPV 症例、下向性減衰型 H-BPPV 症例)と持続型 BPPV 症例(上向性持続型 H-BPPV 症例及び下向性持続型 H-BPPV 症例)に分類して眼振の経時変化を評価すると、持続型 BPPV 症例が減衰型 BPPV 症例に対して有意に眼振残存率が高かった。

D. 考察

1) カロリックテストによるめまい発作誘発ではストレス関連遺伝子の発現変化は認められなかったことから、めまいそのものによるストレスでは、ストレス

関連遺伝子の発現は変化しないものと考えられた。メニエール病患者にて病期とストレス関連遺伝子の発現変化を評価すると、めまい発作期にはストレス関連遺伝子の発現変化が認められ、非発作期ではストレス関連遺伝子の発現変化は認められなくなった。メニエール病ではストレスが内リンパ水腫の反復、遷延を引き起こし、内耳の不可逆的病変へと変化していくと考えられている。DNA マイクロアレイによりストレスを評価し、早期のストレス対策を行うことにより、メニエール病の難治化を予防することができる可能性が示唆された。

2) 半規管結石が病態であると考えられる P-BPPV 症例及び下向性減衰型 H-BPPV 症例は Epley 法もしくは Lempert 法を施行して比較的早期に眼振が消失したと考えられた。

方向交代性上向性眼振から下向性眼振に変化した H-BPPV 症例は、クブラ結石から半規管結石へ病態が変化し比較的早期に眼振が消失したと考えられた。上向性持続型 H-BPPV 症例及び下向性持続型 H-BPPV 症例の眼振残存率は P-BPPV 症例及び下向性減衰型 H-BPPV 症例に比べて有意に高く、眼振が消失しにくかった。減衰型 BPPV 症例と持続型 BPPV 症例において病態の違いが治癒率に影響を及ぼしていると考えられた。

E. 結論

1) ストレス解析用 DNA マイクロアレイはメニエール病のストレスを客観的かつ定量的に評価することが可能と考えられた。

2) 良性発作性頭位めまい症の半規管結石とクブラ結石の病態の違いが、眼振の治癒率に影響を及ぼしていると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) Nakagawa A, Uno A, Horii A, Kitahara T, Kawamoto M, Uno Y, Fukushima M, Nishiike S, Takeda N, Kubo T. Fos expression in the amygdala by hypergravity and its relation to motion sickness. *Brain Res* 2003;986:114-123.
- 3) Morita M, Imai T, Sekine K, Takeda N, Koizuka I, Uno A, Kitahara T, Kubo T. A new rotational test for vertical semicircular canal function. *Auris Nasus Larynx* 2003;30: 233-237.
- 4) Kitahara T, Kondoh K, Morihana T, Okumura S, Horii A, Takeda N, Kubo Y. Steroid effects on vestibular compensation in humans. *Neurol Res* 2003;25: 281-291.
- 5) Naoi K, Nakamae K, Fujioka H, Imai T, Sekine K, Takeda N, Kubo T. Three-dimensional eye movement simulator extracting instantaneous eye movement rotation axes and innervations for eye muscle. *IEICE Trans. Inf. & Syst* 2003; E86-D: 2452-2462.
- 6) Sekine K, Imai T, Nakamae K, Miura K, Fujioka H, Takeda N. Dynamics of vestibulo-ocular positional vertigo. *Acta Otolaryngol* 2003, in press.
- 7) Sekine K, Imai T, Morita M, Nakamae K, Miura K, Fujioka H, Kubo Y, Takeda N. Vertical canal function in normal subjects and patients with benign paroxysmal positional vertigo. *Acta Otolaryngol* 2004, in press.
- 8) Horii A, Mitani K, Kitahara T, Uno A, Takeda N, Kubo T. Role of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) in the treatment of dizziness. *Otol Neurotol* 2004, in press.
- 9) 戸田直紀, 中村克彦, 東 貴弘, 宮崎かつし, 武田憲昭. ハント症候群の難聴とめまいの長期予後. *耳鼻臨床* 2003;96: 405-409.
- 10) 高石 司, 阿部真琴, 武田憲昭. ムンプス不顕感染によりめまい, 難聴をきたした 3 歳児の症例. *Equilibrium Res* 2003;62: 199-204.
- 11) 辻美由起, 西池季隆, 武田憲昭. 耳閉感と内リンパ水腫. *Equilibrium Res* 2003;62: 569-574.
- 12) 武田憲昭, 関根和教. 回転検査. *耳喉頭頸* 2003;75: 145-151.

- 13) 武田憲昭. 耳鼻咽喉科領域におけるめまい.
カレントセラピー 2003;21: 1027-1030.
- 14) 武田憲昭. メニエール病. 耳鼻咽喉科薬物治療マニュアル, 神崎仁, 小川郁, 編, 金原出版, 2003, pp.168-170.
- 15) 武田憲昭. めまい:耳鼻科的立場から. ダイナミックメディスン, 第1巻, 下条文武, 齋藤 康, 編, 西村書店, 2003, pp.3.92-3.93.
2. 学会発表
- 1) Ando M, Sawada K, Sakata H, Takeda N, Fukui H. Increased corticotropin-releasing factor immunostaining in mossy fiber terminals in apposition to unipolar brush cells in the cerebellum of rolling mouse Nagoya. The 26th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Tokyo, 2003.7.
- 2) Sekine K, Imai T, Nakamae K, Miura K, Fujioka H, Takeda N. Dynamics of vestibular ocular reflex in patients with cupulolithiasis and canalolithiasis. The 33rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, 2003.11.
- 3) 安藤正裕, 武田憲昭, 澤田和彦, 福井義浩. ローリングマウス前庭小脳 unipolar brush cell に投射する CRF 陽性苔状線維終末. 第 60 回日耳鼻徳島県地方部会, 徳島, 2003. 3.
- 4) 武田憲昭. 全身疾患とめまい・平衡障害. 教育セミナー「全身疾患と耳鼻咽喉科」, 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003.5.
- 5) 今井貴夫, 伊東真人, 和泉憲政, 細川清人, 松永 喬, 武田憲昭: 当科における良性発作性頭位めまい症の検討. 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003.5.
- 6) 関根和教, 今井貴夫, 武田憲昭. 外側半規管 BPPV 症例の外側半規管動特性の検討. 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003. 5.
- 7) 佐藤孝宣, 武市美香, 中上亜紀, 高岡 司, 上枝仁美, 関根和教, 安藤正裕, 武田憲昭. 若年者に発症したワレンベルグ症候群の 1 例. 第 29 回四国四県地方部会連合学会, 松山, 2003.6.
- 8) 秋月裕則, 西池季隆, 大山晴三, 渡邊 洋, 松岡克典, 久保 武, 武田憲昭. Virtual Reality による動揺病研究. 第 29 回四国四県地方部会連合学会, 松山, 2003. 6.
- 9) 安藤正裕, 澤田和彦, 坂田ひろみ, 福井義浩, 武田憲昭. ローリングマウス前庭小脳における unipolar brush cell の分布と Corticotropin releasing factor の動態. 第 21 回頭頸部自律神経研究会, 大阪, 2003.8.
- 10) 安藤正裕, 澤田和彦, 坂田ひろみ, 福井義浩, 武田憲昭. ローリングマウス前庭小脳における UBC の分布と CRF の動態: 免疫組織学的研究. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
- 11) 大山晴三, 西池季隆, 渡邊 洋, 松岡克典, 久保 武, 秋月裕則, 武田憲昭. Virtual Reality (VR)により引き起こされた動揺病における自律神経反応の検討. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003. 11.
- 12) 関根和教, 秋月裕則, 武田憲昭. 当科めまい外来における最近のめまい統計. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
- 13) 近藤英司, 関根和教, 武田憲昭. 良性発作性頭位めまい症の臨床統計. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003. 11.
- 14) 今井貴夫, 伊東真人, 細川清人, 松永 喬, 武田憲昭, 久保 武. 当科における良性発作性頭位めまい症の検討. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
- 15) 高石 司, 武田憲昭. BPPV の患側と原因頭位. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
- 16) 関根和教, 六反一仁, 武田憲昭. ストレス解析用 DNA チップを用いたメニエール病患者のストレス評価. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
- 17) 中上亜紀, 関根和教, 武田憲昭. 回転性めまいで発症した若年性 Walleberg Syndrome の 2 症例. 第 62 回日本めまい平衡医学会. 横浜, 2003.11.
- 18) 近藤英司, 関根和教, 佐藤孝宣, 上枝仁美, 北村嘉章, 秋月裕則, 田村公一, 武田憲昭, 当科における良性発作性頭位めまい症の臨床統計. 第 29 回中国四国地方部会連合学会, 松山, 2003.12.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

良性発作性頭位めまい症の眼振の経時変化

武田憲昭, 関根和教
(徳島大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

良性発作性頭位めまい症(BPPV)は典型例とされてきた後半規管が病巣と考えられる後半規管型BPPV(P-BPPV)以外にも, 病巣が水平半規管や前半規管である水平半規管型BPPV(H-BPPV)や, 前半規管型BPPV(A-BPPV)も報告されるようになってきた¹⁾²⁾. また, 病態は半規管結石とクブラ結石の2つの仮説があり, 特にH-BPPVにおいて, 半規管結石では方向交代性下向性眼振が生じ, クブラ結石では方向交代性上向性眼振が生じるとの考えが広まってきた³⁾. BPPVの治療法として耳石置換法が広く行われているが, 病態の違いが良性発作性頭位めまい症の眼振の経時変化にどのような影響を及ぼすか検討した.

【対象と方法】

対象は2001年4月から2003年10月までに当科を受診し, 眼振を確認することによってBPPVと診断された97例(男性:37例, 女性:60例)について検討した. P-BPPV及びA-BPPVはめまい平衡医学会のめまい診断基準化のための資料に準じて診断し⁴⁾, 耳石置換法(Epley法)によって治療を行った⁵⁾. H-BPPVはめまい平衡医学会のめまい診断基準化のための資料を改変した基準に準じて診断し, 耳石置換法(Lempert法)・治療的頭振・Brandt-Daroff法にて治療を行った⁶⁾. H-BPPVでは方向交代性頭位眼振を生じる. 方向交代性頭位眼振を外側半規管レベルの異常としてとらえ, 眼振の方向と眼振の持続時間から①上向性持続型:方向交代性上向性眼振を呈し持続時間が長い, ②上向性減衰型:方向交代性上向性眼振を呈し持続時間が短い, ③下向性持続型:方向交代性下向性眼振を呈し持続時間が長い, ④下向性減衰型:方向交代性下向性眼振を呈し持続時間が短い⁷⁾の4型にH-BPPV患者を分類した.

【結果】

BPPV症例の内訳ではP-BPPV症例が50例で51%, H-BPPV症例も下向性及び上向性をあわせると46例で48%を占めた. 前半規管型BPPVは1例のみ認められた. H-BPPV症例の46例にて, 上向性持続型が21例, 下向性持続型が21例, 下向性減衰型が4例認められたが, 上向性減衰型は存在しなかった. 上向性持続型の内, 4例に方向交代性上向性眼振から下向性眼振に変化した症例を認めた.

BPPV症例の眼振の経時変化を型別に評価すると, P-BPPV及び下向性減衰型H-BPPV症例の眼振残存率に対して, 上向性持続型H-BPPV症例の眼振残存率が有意に高かった. 方向交代性上向性眼振から下向性眼振に変化した症例は上向性持続型H-BPPVに比べて早期に眼振が消失した. BPPV症例を減衰型BPPV症例(P-BPPV症例, 下向性減衰型H-BPPV症例)と持続型BPPV症例(上向性持続型H-BPPV症例及び下向性持続型H-BPPV症例)に分類して眼振の経時変化を評価すると, 持続型BPPV症例が減衰型BPPV症例に対して有意に眼振残存率が高かった.(図1)

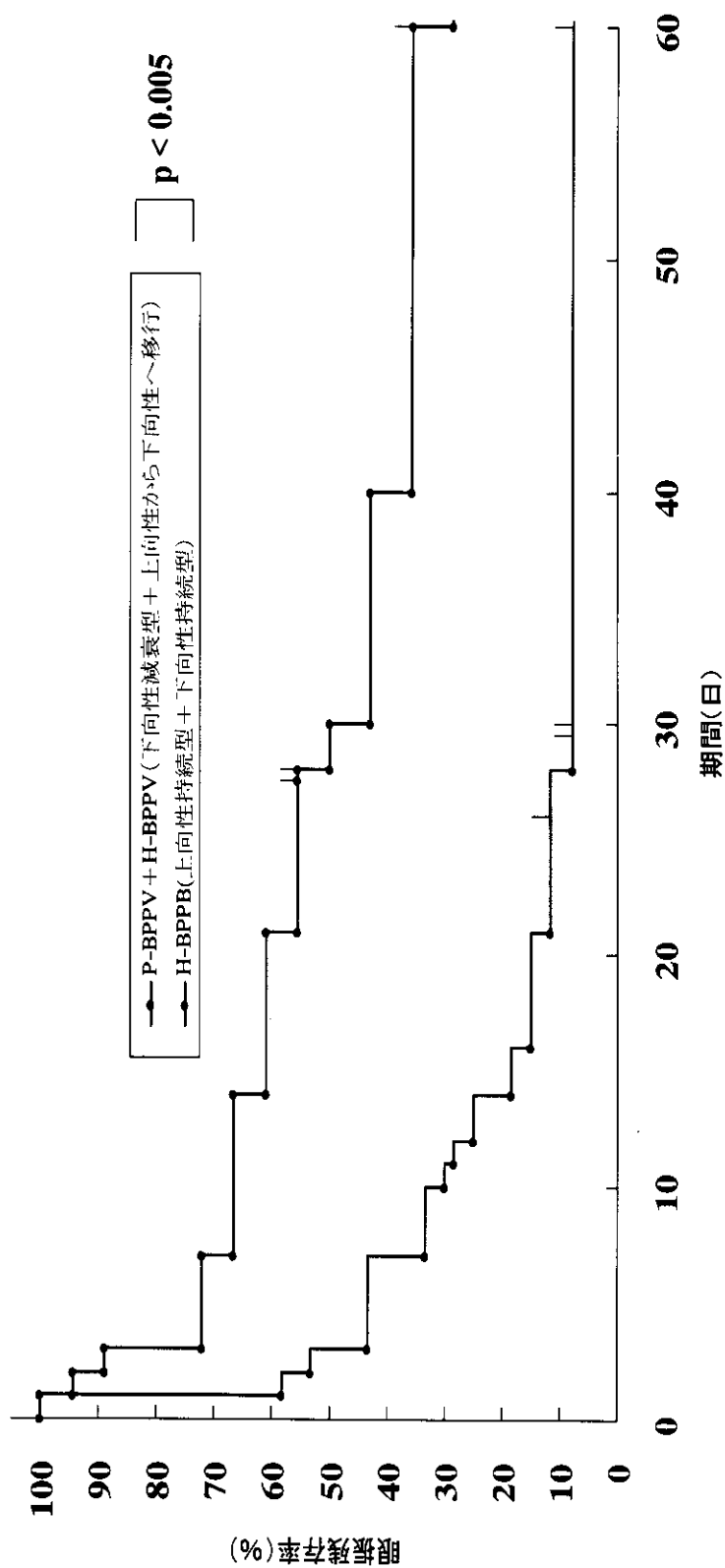
【考察】

半規管結石が病態であると考えられるP-BPPV症例及び下向性減衰型H-BPPV症例はEpley法もしくはLempert法を施行して比較的早期に眼振が消失したと考えられた. 方向交代性上向性眼振から下向性眼振に変化したH-BPPV症例は, クブラ結石から半規管結石へ病態が変化し比較的早期に眼振が消失したと考えられた. 上向性持続型H-BPPV症例及び下向性持続型H-BPPV症例の眼振残存率はP-BPPV症例及び下向性減衰型H-BPPV症例に比べて有意に高く, 眼振が消失しにくかった. 減衰型BPPV症例と持続型BPPV症例において病態の違いが治癒率に影響を及ぼしていると考えられた.

【参考文献】

- 1) McClure JA. Horizontal canal BPV. *J Otolaryngol* 1985; 14: 30-35.
- 2) Baloh RW, Jacobson K, Horubia V. Horizontal semicircular canal variant of benign positional vertigo. *Neurology* 1993; 43: 2542-2549.
- 3) Augusto PC, Giovanni V, Bruno F, Stefano B. The treatment of horizontal canal positional vertigo: our experience in 66 cases. *Laryngoscope* 2002; 112: 172-178.
- 4) 小松崎篤, 二木隆, 原田康夫, 他. めまいの診断基準化のための資料 1987年めまいの診断基準化委員会答申書. *Equilibrium Research* 1988;47:245-273.
- 5) Epley JM. New dimensional of benign paroxysmal positional vertigo. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1980; 88: 599-605.
- 6) Lempert T, Ttiel-Wilck K. A positional maneuver for treatment of horizontal-canal benign positional vertigo. *Laryngoscope* 1996; 106: 476-478.

BPPV(減衰型)症例とBPPV(持続型)症例の眼振残存率



BPPV(持続型)症例がBPPV(減衰型)症例に対して有意に眼振残存率が高い。

ストレス解析用 DNA マイクロアレイを用いたメニエール病患者のストレス評価

武田憲昭, 関根和教(徳島大学医学部耳鼻咽喉科)
六反一仁(徳島大学)

【はじめに】

メニエール病のめまい発作の誘発要因については、ストレスが発作の発症と密接に関係していることは繰り返し報告されている。しかし、ストレス反応は複雑系であり、定量性に欠け個体差が大きく、正確に評価できているとは言えない。ストレスとめまい発作の関係を定量的に評価し、めまい発作を予測することにより、めまい発作の予防及び早期治療を行うことはメニエール病の治療において重要である。現在までのメニエール病をはじめとするめまい患者のストレス評価は、ライフイベントやストレスラーの評価、心理テストなどが中心で、血中のストレス関連ホルモンの変化も報告されている。しかし、ストレス反応は複雑系であり客観的・定量的に評価できないため、大きな誘因であるストレスによりめまい発作を予測することはできなかった。本研究ではストレス解析用 DNA マイクロアレイを使用し、ストレスが誘因となってめまい発作を起こると考えられているメニエール病患者の病状・病期とストレス関連遺伝子発現の関係を評価した。

【方法】

基板上にプローブ DNA を高密度に集積化して多数の遺伝子の mRNA 発現量を迅速に解析できる DNA マイクロアレイ技術は、複雑系の反応の評価に最適である。末梢白血球はストレスに関連する因子のほぼ全ての受容体を持っているため、末梢白血球に伝えられたストレス応答を白血球の mRNA の発現としてとらえ、1500 個のストレス関連遺伝子を網羅的に解析することで、ストレスを客観的・定量的に評価する¹⁾²⁾。図1に実験の流れを図示する。

【結果】

カロリックテストの前後におけるストレス関連遺伝子の発現変化を評価すると、カロリックテストによるめまい発作誘発ではストレス関連遺伝子の発現変化は認められなかった。しかし、メニエール病患者にて病期とストレス関連遺伝子の発現変化を評価すると、めまい発作時、急性期にはストレス関連遺伝子の発現変化が認められたが、症状が落ち着くにしたがってストレス関連遺伝子の発現変化は認められなくなった。

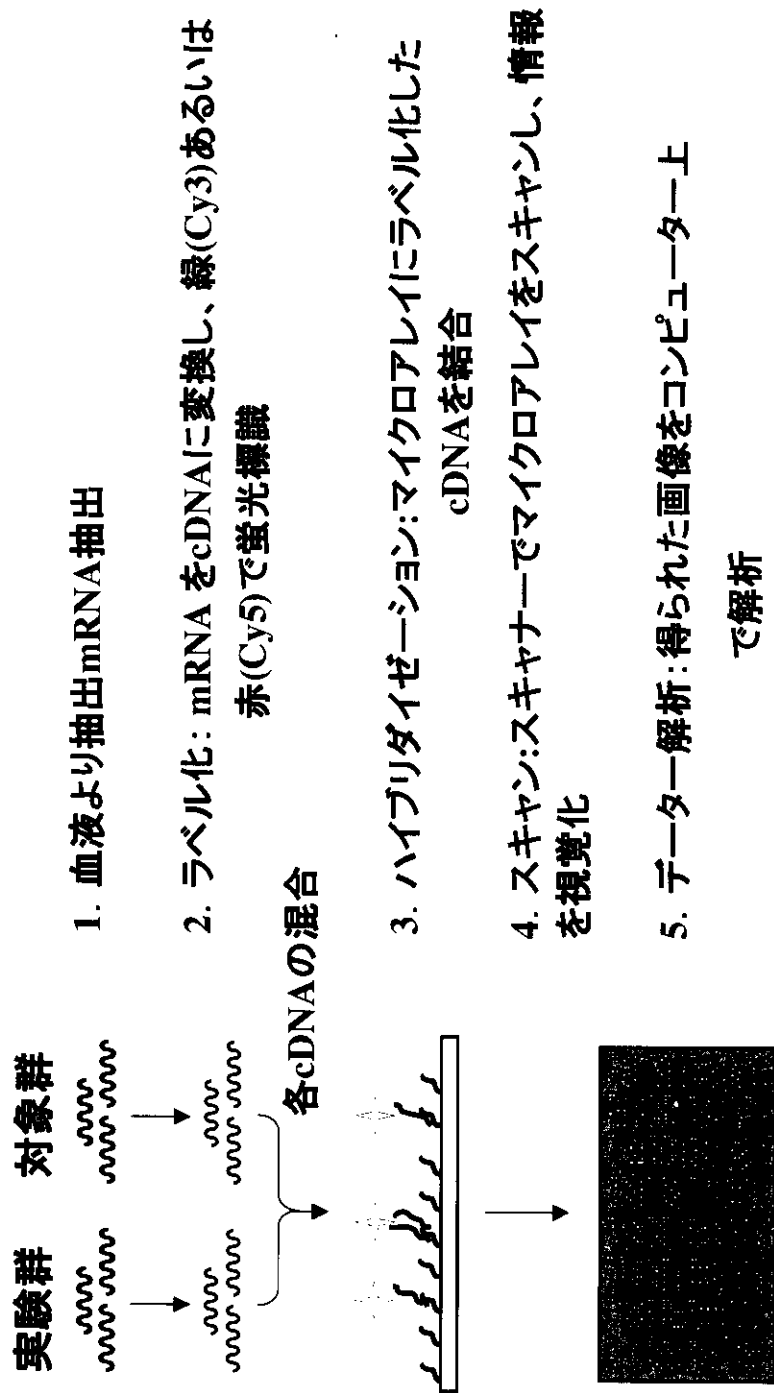
【考察】

カロリックテストによるめまい発作誘発ではストレス関連遺伝子の発現変化は認められなかったことから、めまいそのものによるストレスでは、ストレス関連遺伝子の発現は変化しないものと考えられた。メニエール病患者にて病期とストレス関連遺伝子の発現変化を評価すると、めまい発作期にはストレス関連遺伝子の発現変化が認められ、非発作期ではストレス関連遺伝子の発現変化は認められなくなった。メニエール病ではストレスが内リンパ水腫の反復、遷延を引き起こし、内耳の不可逆的病変へと変化していくと考えられている。DNA マイクロアレイによりストレスを評価し、早期のストレス対策を行うことにより、メニエール病の難治化を予防することができる可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 六反一仁, 加藤宏一, 奈良原正俊, 富田裕行, 斎藤俊郎, 杉山 寿. ストレス評価用 DNA チップを用いたメンタルジェネティクスの展開. バイオインダストリー 2002;9: 19-24.
- 2) Ikeyama S, Kusumoto K, Miyake H, Rokutan K, Tashiro S. A non-toxic heat shock protein 70 inducer, geranylgeranylacetone, suppresses apoptosis of cultured rat hepatocytes caused by hydrogen peroxide and ethanol. J Hepatol 2001;35: 53-61.

マイクロアレイ実験の流れ



メニエール病患者の病期による各遺伝子発現の比を、赤色と緑色のシグナル強度の比として解析することができる。これが黄色の場合は変化なし、緑色の場合はdown regulateしており、赤色の場合はup regulateしていることを示している。またスポットの強度からmRNAの濃度を測定することが可能である。

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

薬物輸送システムを用いためまい治療に関する研究

分担研究者 山下 裕司 山口大学教授

研究要旨 グルタミン酸による前庭障害に対する抗酸化剤(エダラボン)の局所投与効果を投与時期別にみた。エダラボン局所投与は、12時間以内であればグルタミン酸による前庭障害を抑制した。次に、TTX局所投与を用いて一過性の両側前庭入力遮断モデルを作成し、前庭眼反射、前庭頸反射の回復過程を観察した。前庭眼反射は120時間以内、前庭頸反射はややそれよりも早く回復した。さらには、これら動物モデルの前庭頸反射を解析する独自のシステムを作成した。

A. 研究目的

- ・ グルタミン酸の神経毒に対する抗酸化剤であるエダラボン局所投与の有効性を、投与時期別に検討する。
- ・ TTXを用いて一過性両側前庭入力遮断モデルを作成する。
- ・ モルモットの前庭頸反射解析システムを作成する。

B. 研究方法

- ・ モルモットの右側蝸牛基底回転鼓室階に小孔を作成し、同部より、シリンジポンプを用いて、10 mM AMPAを注入した。3 mg/mlに調整したエダラボンをゼルフォームに浸して正円窓膜上に留置したが、AMPA注入直後、注入後12時間、24時間の3群を作成した。1週間後に温度眼振検査を行った。
- ・ モルモットの右側蝸牛基底回転鼓室階に小孔を作成し、浸透圧ポンプを用いてTTXを0.5 μ l/hで7日間注入した。注入中、注入中止後の行動、前庭眼反射、前庭頸反射を経時的に観察した。観察後、組織を摘出して組織学的に形態を観察した。
- ・ 体幹を固定したモルモットの頭頂部、鼻尖部にマーカーを貼り、振子用回転刺激を加えた。頭部運動をビデオに撮影してマーカーの動きをNIH imageで解析した。

C. 研究結果

- ・ AMPAによる末梢前庭機能障害は、エダラボン同時局所投与で完全に抑制された。この効果は障害後12時間までは明らかであった。24時間後投与でも、温度眼振検査で良好な反応を示した

ものが1部の動物に見られた。

- ・ TTX投与中止後、前庭眼反射は120時間以内、前庭頸反射はややそれよりも早く回復した。1週間のTTX投与では、末梢前庭の形態にはほとんど影響を認めなかった。
- ・ 複数の条件下に前庭頸反射を解析したが、結果としてきれいな正弦波形を得ることができた。

D. 考察

- ・ 抗酸化剤であるエダラボンは、AMPAによる末梢前庭障害を軽減した。その効果は、投与時期が早期であればあるほど有効であった。しかし、1部の動物には、障害後24時間の時点でも有効であった。臨床的にグルタミン酸神経毒、すなわち虚血性末梢前庭障害に対するエダラボンの早期局所投与治療の有効性が示唆された。
- ・ TTXを用いて、組織変化をきたすことなく前庭入力を一過性に遮断できることがわかった。行動学的にもその影響は可逆的であった。本モデルは、無重力状態、あるいは、無重力から加重力に変化する際での中枢神経系の変化の解明に有効であることが示唆された。
- ・ これまで、動物モデルの前庭脊髄反射の解析法で、確立されたものはなかった。本法は、今後前庭障害に対する薬物治療の効果を判定するひとつの有効な手段となる可能性が示唆された。

E. 結論

1. AMPAによる末梢前庭障害に対するエダラボン早期局所投与の有効性が示された。
2. TTXを用いた一過性前庭入力遮断モデルを確立した。
3. モルモットの前庭頸反射解析システムを確立し

た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 奥田 剛, 菅原一真, 竹本 剛, 下郡博明, 山下裕司. ゲンタマイシン内耳障害における caspase inhibitor 直接投与の効果. 頭頸部自律神経 2003;17:40-42.
- 2) 竹本 剛, 菅原一真, 奥田 剛, 下郡博明, 山下裕司. 音響障害における抗酸化剤エダラボン直接投与の保護効果. 頭頸部自律神経 2003;17:43-46.
- 3) Sugahara K, Inouye S, Izu H, Katoh Y, Katsuki K, Takemoto T, Shimogori H, Yamashita H, Nakai A. Heat shock transcription factor HSF1 is required for survival of sensory hair cells against acoustic overexposure. *Hearing Res* 2003;182:88-96.
- 4) 橋本 誠, 堀池 修, 菅原一真, 池田卓生, 山下裕司. 不安とめまい感あるいは耳鳴との関連—STAI を指標にして—耳鼻臨床 2003;96:765-770.
- 5) 菅原一真, 山下裕司, 橋本 誠, 堀池 修, 奥田 剛, 竹本 剛, 高橋正紘: めまいとストレスの関連について—インターネットを用いた アンケート調査—. 日本耳鼻咽喉科学会 2003;106:866-871.
- 6) 竹本 剛, 下郡博明, 山下裕司. めまい, 難聴が短期間に反復したハント症候群の 1 例. *Equilibrium Res* 2003;62:322-325.
- 7) 山下裕司. めまい・耳鳴のストレス緩和療法—STAI を指標として—総合臨床 2003;52:3333-3336.
- 8) 池田卓生. 日常外来での画像作成・記録 眼振記録. *JOHNS* 2003;19:1706-1710.
- 9) Okuda T, Sugahara K, Shimogori H, Yamashita H: Inner ear changes with intracochlear gentamicin administration in guinea pigs. *Laryngoscope* 2004, in press.
- 10) Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Shimogori H, Yamashita H. The clinical

free radical scavenger, edaravone, protects cochlear hair cells from acoustic trauma. *Eur J Pharmacol* 2004, in press.

- 11) 山下裕司. 7. 内耳内薬剤投与術 2) 鼓室内投与法 (編集) 飯沼壽孝, 木田亮紀, 小林俊光, 久 育男, 森山 寛: イラスト手術手技のコツ 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 耳・鼻編 東京医学社 2003, pp.217-218.
- ##### 2. 学会発表
- 1) 下郡博明, 菅原一真, 奥田 剛, 竹本 剛, 山下裕司. AMPA による末梢前庭障害の病態. 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003.5.
 - 2) 堀池 修, 下郡博明, 池田卓生, 山下裕司. エダラボンによるアミノグリコシド前庭障害の抑制効果. 第 104 回日耳鼻総会, 東京, 2003.5.
 - 3) 奥田 剛, 菅原一真, 竹本 剛, 田中邦剛, 下郡博明, 山下裕司. In vivo における caspase inhibitor の内耳保護効果. 第 21 回頭頸部自律神経研究会, 大阪, 2003. 8.
 - 4) 竹本 剛, 菅原一真, 田中邦剛, 奥田 剛, 下郡博明, 山下裕司. テブレノンが誘導する内耳熱ショック応答と音響外傷に対する保護効果. 第 21 回頭頸部自律神経研究会, 大阪, 2003. 8.
 - 5) 山下裕司 (特別講演). 「内耳への直接的薬物治療」—基礎と臨床— 第 3 回北陸めまい研究会, 金沢, 2003.8.
 - 6) 奥田 剛, 菅原一真, 竹本 剛, 下郡博明, 山下裕司. Caspase によるゲンタマイシン蝸牛障害に対する保護効果. 第 13 回日本耳科学会, 千葉, 2003. 10.
 - 7) 竹本 剛, 菅原一真, 田中邦剛, 奥田 剛, 下郡博明, 山下裕司. テブレノンの内耳直接投与による熱ショック応答と保護効果についての検討. 第 13 回日本耳科学会, 千葉, 2003. 10.
 - 8) 田中邦剛, 竹本 剛, 奥田 剛, 菅原一真, 下郡博明, 山下裕司. 音響障害におけるエダラボンの投与時期と内耳保護効果についての検討. 第 13 回日本耳科学会, 千葉, 2003. 10.
 - 9) Tanaka K, Shimogori H, Horiike O, Takemoto T, Yamashita H. The effect of antioxidant on the peripheral vestibular disorder induced by streptomycin. The 7th Japan-Taiwan Conference in

- Otolaryngology, head and Neck Surgery, 品川,2003. 10.
- 10) Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Shimogori H, Yamashita H. Intracochlear infusion of geranylgeranylacetone can protect cochlear hair cells from acoustic trauma. The 7th Japan-Taiwan Conference in Otolaryngology, head and Neck Surgery, 品川,2003.10.
 - 11) 山下裕司(教育講演). Drug delivery system とめまい治療. 第 62 回日本めまい平衡医学会,横浜,2003. 11.
 - 12) 田中邦剛, 下郡博明, 奥田 剛, 竹本 剛, 菅原一真, 山下裕司. AMPA 末梢前庭障害に対する AMPA レセプターアンタゴニストの影響. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜, 2003.11.
 - 13) 原 浩貴, 下郡博明, 池田卓生, 菅原一真, 奥田 剛, 竹本 剛, 山下裕司. テトロドトキシンを用いた一過性前庭入力遮断モデル動物作成の試み—第二報—. 第 62 回日本めまい平衡医学会,横浜,2003.11.
 - 14) 下郡博明, 奥田 剛, 竹本 剛, 田中邦剛, 菅原一真, 山下裕司. AMPA 末梢前庭障害に対するエタラボン局所投与時期の検討. 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜,2003.11.
 - 15) 奥田 剛, 綿貫浩一, 池田卓生, 山下裕司. 内リンパ水腫症例に対するステロイド鼓室内投与の長期観察(第2報). 第 62 回日本めまい平衡医学会, 横浜,2003.11.
 - 16) Takemoto T, Sugahara K, Okuda T, Shimogori H, Yamashita H. Attenuation of cochlear damage from noise trauma by geranylgeranylacetone, an inducer of heat shock proteins. AAOO, Florida, 2004. 2.
 - 17) Shimogori H, Sugahara K, Tanaka K, Okuda T, Takemoto T, Yamashita H. Edaravone protects AMPA-induced vestibular disorder in the guinea pig. AAOO, Florida, 2004.2.
 - 18) Tanaka K, Shimogori H, Horiike O, Takemoto T, Yamashita H. The role of edaravone, a free radical scavenger, against the peripheral vestibular disorder induced by streptomycin. AAOO, Florida, 2004.2.
 - 19) Okuda T, Sugahara K, Takemoto T, Shimogori H, Yamashita H. Pan-caspase inhibitor and caspase 9 inhibitor alleviate gentamicine-induced cochlear damage in guinea pigs. AAOO, Florida, 2004.2.
 - 20) Hara H, Shimogori H, Sugahara K, Okuda T, Takemoto T, Yamashita H: Bilateral tetrodotoxin injection into inner ear makes reversible blockage of VOR in guinea pig. AAOO, Florida, 2004.2.
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)
なし

AMPA 末梢前庭障害に対するエダラボン局所投与時期に関する研究

下郡博明, 奥田 剛, 竹本 剛, 田中邦剛, 御厨剛史, 山下裕司
(山口大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

ドラッグデリバリーシステムが開発され、薬物の内耳局所投与治療が注目されている¹⁾。局所治療は、全身投与では副作用が懸念される薬剤を、高濃度に最小限度の副作用で投与可能である点で優れている。そして、さらには従来内耳血管閉塞の存在のため全身投与では内耳に移行しにくい薬剤も、治療薬の候補となりうる点で着目される。これら薬剤の効果を検討するための適した動物モデルの作成は不可欠である。一側末梢前庭破壊モデルの場合は、末梢前庭機能自体の回復は困難であり、従って、内耳への薬物直接投与の効果は判定できない。我々は、AMPA を用いた末梢前庭部分障害モデルを作成し、報告した²⁾。このたび我々は、本モデルを用いて抗酸化剤であるエダラボンの効果を、その投与時期別に検討したので報告する。

【対象・方法】

プライエル反射正常、両鼓膜正常な体重 500g 前後のハートレイ系白色モルモットの雄を用いた。処置側は、すべて右とした。モルモットの蝸牛基底回転鼓室階に小孔を作り、シリンジポンプを用いて人工外リンパ液で調整した 10 mM AMPA を 0.6 ml/h で 5 分間注入することで、一側末梢前庭障害を作成した。AMPA 注入のみの群、注入直後、注入後 12 時間、注入後 24 時間にエダラボン 3 mg/ml を浸したゼルフォームの薄片を正円窓膜の上に貼付した 3 群を作成した。コントロールとして、同条件での人工外リンパ液のみを注入した群を作成した。術後7日でカロリックテストを行い、末梢前庭機能を評価した。カロリックテストは、50 度頭部挙上した体位で、10 秒間に 5 ml の氷水を注入した。暗所開眼で行い、赤外線 CCD カメラで観察、ビデオ記録して眼振の持続時間を測定した。処置側の眼振持続時間を未処置側の眼振持続時間で割った値を、time ratio として算出し、各群間で比較した。

【結果・考察】

AMPA 注入直後にエダラボンを局所投与した群は、人工外リンパを注入したコントロール群と差を認めず、全例とも眼振持続時間は左右差を認めなかった。AMPA 注入後 12 時間でエダラボンを投与した群は、処置側の眼振持続時間はやや短く、time ratio が低下したものの、直後投与群と統計学的に有意差を認めなかった。24 時間後投与群、AMPA 注入のみの群では、直後投与群と比較して統計学上有意に time ratio の低下を認めた(図1)。しかし、動物個別に検討してみると、24 時間後投与群のなかの約 2 割に眼振持続時間の回復を認めた。

本障害モデルは、過去の組織学的検討から、グルタミン酸神経毒に類似したものと考えている。グルタミン酸神経毒により進行するカスケードのなかで³⁾、エダラボンは reactive oxygen species, なかでもヒドロキシラジカルを消去することで、そのあとのアポトーシスへの進行を抑制するのではないかと考えた。だとすれば、このような障害に対してのエダラボンの効果は、その投与が早期である程高いことは、ごく自然なことである。しかし、24 時間後投与でも効果があったケースがあったことは、エダラボンの未知の作用がまだある可能性も示唆された。

結論として、AMPA 障害に対するエダラボンの局所投与は早期であればあるほど有効であるが、障害後 1 日以内なら回復例もあることがわかった。このことは、グルタミン酸神経毒による前庭障害に対して、早期のエダラボン投与の有効性を示唆すると考えた。

【参考文献】

- 1) Silverstein H. Use of a new device, the Micro Wick™, to deliver medication to the inner ear. *Ear Nose Throat J* 1999;78: 595-600.
- 2) 下郡博明, 奥田 剛, 菅原一真, 山下裕司. AMPA 微量注入による可逆性末梢前庭障害モデルの作成. *Otology Jpn* 2002;12: 345.
- 3) Gilgun-Sherki Y, Rosenbaum Z, Melamed E, Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. *Pharmacol Rev* 2002;54: 271-284.

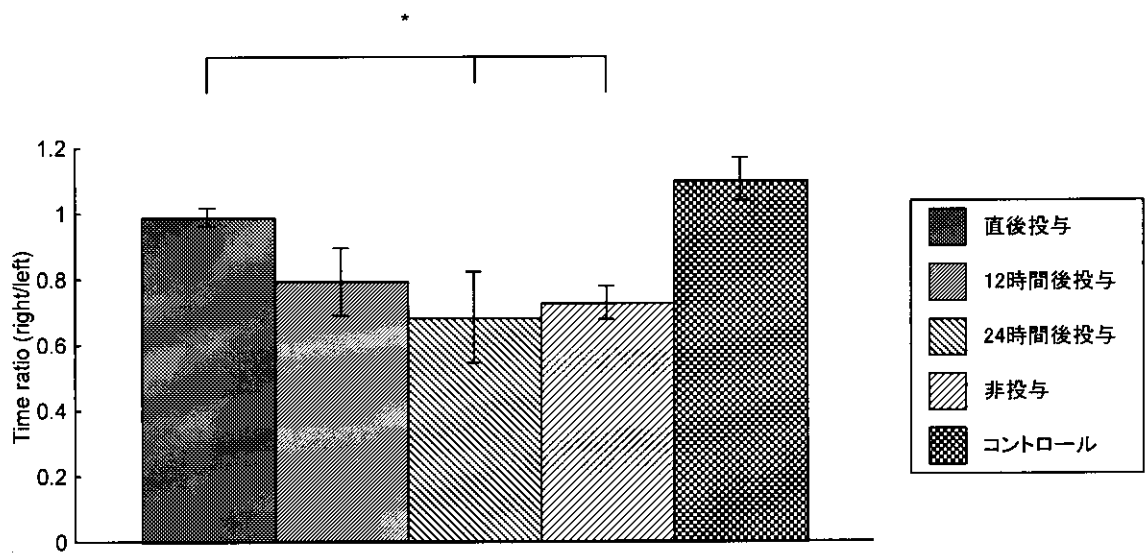


図1

モルモット前庭頸反射解析システム作成の試み

綿貫浩一, 池田卓生, 原 浩貴, 竹野研二, 下郡博明, 山下裕司
(山口大学医学部耳鼻咽喉科)

【はじめに】

前庭反射には、前庭眼反射、前庭脊髄反射、前庭自律神経反射の3つの反射がある。前庭眼反射とは、頭部の運動や位置変化に対して視線を一定に保ち、網膜上の像を固定し、視覚情報を正しく中枢に伝えるものである。前庭脊髄反射は、前庭器を受容器として頸・体幹・四肢などのおもに抗重力筋を効果器とする身体の姿勢・平衡に関与する反射である。姿勢制御には、視覚や体性感覚入力も重要な役割をしている。前庭器が重力に対する頭の偏位を検知し、脊髄へその情報を送り、四肢・体幹の筋緊張を調節し、身体平衡にそして頸筋に作用し、頭の偏位をもとにもどすよう作用している。迷路から直接の影響は頸筋に対して最も強く、これより以下躯幹、四肢への影響はよく統合された反射系を形成している。前庭眼反射の検査としては、ヒトでも実験動物のモルモットでも近年赤外線 CCD カメラを用いた眼球運動画像解析法で眼振を計測することが可能となっている¹⁻⁴。しかし前庭脊髄反射については、ヒトではいくつかの方法が考案されているが^{5,6}、実験動物に関しては定量的解析を行う方法が未だ確立されていない。そこで今回、モルモットを用いて前庭脊髄反射の一つである前庭頸反射を解析することを試みた。

【対象と方法】

プライエル反射正常、鼓膜正常な体重 500g 前後のハートレイ系白色モルモットの雄を用いた。モルモットの胴体部を固定し、頸部は自由に可動できる固定装置を自作した(図1)。ライト付きのビデオカメラを頭部の直上に固定し、モルモットには鼻先部と頭頂部の2点にマーカーをつけた。マーカーをより認識しやすくするため、両耳を白色テープで覆い、頭部の下にはホワイトボードを設置した。山口大学式持続過重力負荷装置にモルモットを固定し、頸部を中心に振り様回転刺激を加えた。回転刺激は最大角速度 60° /秒、周期 3 秒と、最大角速度 90° /秒、周期 4.5 秒の2種類とし、刺激時間は 10 秒間とした。ビデオカメラで直上から撮影して、そのビデオ画像をパソコン(アップル社製 Power Mac G4)に取り込んだ。画像サイズは 320×240 ピクセル、取り込み速度は1秒間に 30 フレームとし、画像ファイルの保存形式は Quick Time 4.0 形式とした。フリーウェアの画像解析ソフトウェア NIH Image (U.S.National Institutes of Health が開発し、インターネットを介して <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/> から入手可能)を用いて2点のマーカーの位置を自動解析するプログラムを作成した(図2)。プログラムでは、まず画像処理を行って画像内の不要な領域を除去し、2点のマーカーを認識した。その後、2点で作る直線と頭頂部のマーカーから正面へ引いた直線のなす角度 θ を求めた。 θ を求めるには、2点のマーカーの座標から Arctan を求め、頭頂部のマーカーから正面へ引いた直線を 0° として、頭部偏倚角度 θ を求めた。頭部偏倚角度の方向としては、基準となる 0° の直線から右向きに頭部を傾けたときを正とした。

【結果】

解析結果は縦軸が頭部偏倚角度、横軸が時間のグラフであらわした。回転刺激に合わせてその回転とは反対方向に、ほぼサインカーブを描くように頭部は偏倚した(図3)。最大角速度 60° /秒、周期 3 秒の回転刺激では頭部偏倚角度は $-6.8 \sim 9.4^{\circ}$ の範囲で、平均値は 1.5° であった。最大角速度 90° /秒、周期 4.5 秒の回転刺激では頭部偏倚角度の範囲は $-11.2 \sim 15.4^{\circ}$ 、平均値 2.9° であった。つまり最大角速度 60° /秒、周期 3 秒のときより最大角速度 90° /秒、周期 4.5 秒のときの方が頭部偏倚角度は、より大きい振幅を示した。