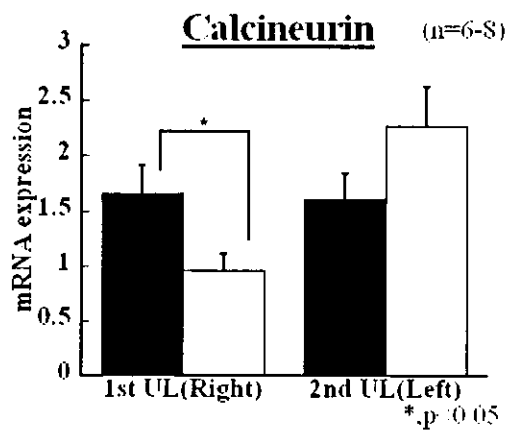
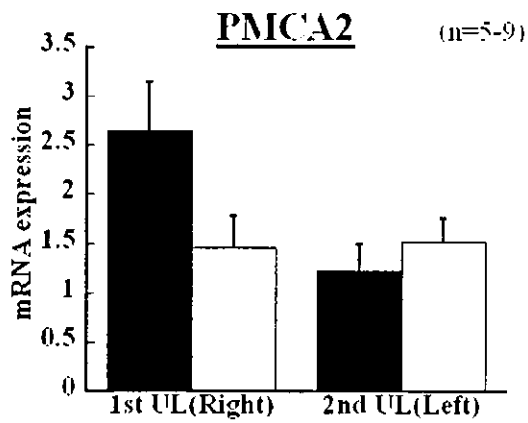
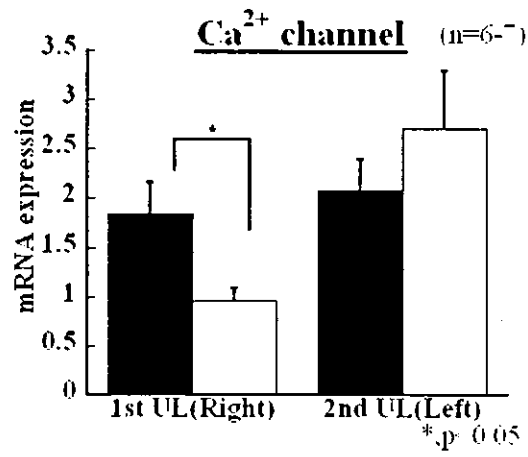


■ ipsi VNC □ contra VNC

図1. いずれの遺伝子も UL6 時間後に破壊側 VNC で発現が一過性に上昇し 24 時間後には control level に収束した



Right VNC □ Left VNC

図2. いずれの遺伝子発現も Bechterew 現象出現時(2nd UL)には一回目の UL 時(1st UL)の鏡面像を呈した

メニエール病の遺伝子解析と良性発作性頭位性めまい症の発症メカニズムに関する研究

分担研究者 鈴木 衛 東京医科大学教授

研究要旨 メニエール病・低音障害型感音難聴と診断された 35 例と対照 20 例を検討した。血液から DNA を抽出し、mascode system で HSP70 遺伝子の SNP 解析を行った。ストレスの程度は心理テストの Profile of mood states (POMS) で評価した。profile of mood states スコアによるメ病患者のストレスの程度と自覚症状とを比較した。HSP70 とその誘導因子である HSF1 の mRNA レベルでの発現と DNA レベルでの異常について検討した。HSP70 遺伝子のプロモーター領域の SNP はメ病、低音障害型感音難聴に深く関与すると考えられた。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。摘出卵形囊斑に振子様用回転を加え、卵形囊斑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用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斑に返還された後、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斑の活動を高めている可能性が示唆された。

A. 研究目的

- 1)メ病・低音障害型感音難聴において HSP70 の遺伝子と精神的ストレスとがいかに関連するかを検討する。
- 2) 良性発作性頭位性めまい症(BPPV)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斑モデルを用いて検索する。

B. 研究方法

- 1)メ病・低音障害型感音難聴と診断された 35 例と対照 20 例を検討した。血液から DNA を抽出し、mascode system で HSP70 遺伝子の SNP 解析を行った。ストレスの程度は心理テストの Profile of mood states (POMS) で評価した。profile of mood states スコアによるメ病患者のストレスの程度と自覚症状とを比較した。HSP70 とその誘導因子である HSF1 の mRNA レベルでの発現と DNA レベルでの異常について検討した。
- 2) 両生類摘出卵形囊斑に振子様用回転刺激を加えて発生する活動電位を測定した。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観察した。

C. 研究結果

- 1) HSP70 遺伝子のプロモーター領域である・110, 190 の領域に SNP がみられ、190 領域では対照と比べて患者群に遺伝子型 GC が有意に多く、さらに精神的ストレスのある患者群で遺伝子型 GC が

有意に多かった。

- 2) 正常卵形囊斑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用回転を行うと、回転に応じる電位は正常よりも増加した。

D. 考察

- 1) HSP70 は温熱や水浸高速ストレスによって発現するタンパクである。精神的ストレスを感じている群に mRNA 発現が増加したことから、ストレスが負荷された場合にも生体の防御反応として HSP70 を合成するために mRNA の発現が増加したと考えられる。HSPA1L 遺伝子の 190 領域 GC の SNP を持つものに mRNA の発現が増加している症例が多いのは、SNP は mRNA の翻訳領域にあることから合成されたタンパクの機能が障害されたためと推察された。以上より遺伝子のプロモーター領域の SNP はメ病、低音障害型感音難聴に関与すると考えられた。
- 2) BPPV には理学療法が有効であるが、療法後一時的にめまいの増悪をきたす症例が多い。耳石塊を卵形囊斑上にのせると直後に著明な放電の増加がみられ、また回転刺激に対する卵形囊斑神経放電は増加または減少した。このような神経放電の変化が理学療法後のめまい増強に関与するものと考えられた。

E. 結論

- 1) HSP70 遺伝子のプロモーター領域の SNP はメ病, 低音障害型感音難聴に深く関与すると考えられた。
- 2) 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。

F.健康危険情報

なし

G.研究発表

1. 論文発表

- 1) 北島尚治, 鈴木 衛, 堀口利之, 市村彰英, 小川恭生, 清水重敬, 竹之内 剛:頭位変換療法後の BPPV の経過について. *Equilibrium Res* 2004, 63:28-33
- 2) 鈴木 衛:外側半規管型BPPV. *日耳鼻専門医通信* 2004, 81:16-17

2. 学会発表

- 1) Otsuka K, Suzuki M, Furuya M, et al: Model experiment of semicircular canal function of BPPV. The 23rd Barany Society meeting. Paris,2004.7.
- 2) Inagaki T, Suzuki M, Otsuka K, et al: Fuctional model of benign paroxysmal positional vertigo using an isolated frog utricle. The 23rd Barany Society meeting. Paris,2004.7.
- 3) Suzuki M: Application of basic research for understanding BPPV mechanism. "Influence of basic science research on the otological practice" Amplifon Workshop Debrecen,2004.9.
- 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 2004 年 1 月, 大分市
- 5) 鈴木 衛:頭位性めまいの病態と半規管の機能. 第 28 回山形県耳鼻咽喉科疾患研究会 2004 年 6 月, 山形市
- 6) 鈴木 衛:頭位性めまいの病態と臨床像. 第 5 回京滋めまいカンファランス. 2004 年 10 月, 京都市
- 7) 鈴木 衛:病態からみた頭位性めまいの取り扱い. 徳島めまい研究会 2004 年 11 月, 徳島市
- 8) 大塚康司, 鈴木 衛, 稲垣太郎, 北島尚治, 小

川恭生, 古屋正由, 竹之内 剛:BPPV における半規管反応性の変化について. 第 63 回日本めまい平衡医学会総会 2004 年 11 月, 高崎市

- 9) 稲垣太郎, 鈴木 衛, 北島尚治, 小川恭生, 大塚康司, 古屋正由, 竹之内 剛:摘出卵形嚢を用いた BPPV のモデル実験. 第 63 回日本めまい平衡医学会総会 2004 年 11 月, 高崎市

H. 知的所有権の取得状況

なし

メニエール病患者における HSP70 の遺伝子解析

河口幸江, 萩原 晃, 林 賢, 鈴木 衛
(東京医科大学耳鼻咽喉科)

【はじめに】

メニエール病の発症には精神的ストレスが関与するという報告は数多いが、それがどのように発症に関与するかは明確でない。そこで、メニエール病患者についてストレスタンパクの一つである HSP70 の遺伝子解析を行った。さらにその結果と患者の精神的ストレスおよび臨床所見との関連について検討した。

【対象と方法】

厚生省研究班の診断基準に従いメニエール病確実例と診断された患者 15 例と、メニエール病疑い例と考えられる低音障害型感音難聴をくり返した蝸牛型メニエール病患者 9 例の計 24 例である。平均年齢 45.7 歳、男性 10 例、女性 14 例であった。また、めまい・難聴のない健常者 20 例を対照とした。

患者にインフォームドコンセントを行った後、採血した。その血液より Qiagen 社の抽出キットを用いて DNA・RNA をそれぞれ抽出した。抽出した DNA は島津製作所の mascode system を用いて HSP70 遺伝子中の HSPA1L 遺伝子(図 1)の SNP(single nucleotide polymorphisms)解析を行った。また、RT-PCR 法にて HSP70、およびその誘導因子である HSF-1 の mRNA 発現解析を行った。さらに、心理テストの POMS(profile of mood states)を用いて患者の精神ストレスの程度を測定した。

【結果】

HSPA1L 遺伝子の SNP 解析では、mRNA 発現調節領域の・110 と mRNA の翻訳領域の 190 に SNP があった。・110 領域では患者群で C/A ヘテロ 21 例(87.5%)、C/C ホモ 3 例(12.5%)、対照で C/A ヘテロ 18 例(90.0%)、C/C ホモ 2 例(10.0%)と SNP に差がなかった($p>0.05$)が、190 領域では患者群で G/C ヘテロ 16 例(66.6%)、G/G ホモ 8 例(33.3%)、対照で G/C ヘテロ(25.0%)、G/G ホモ 15 例(75.0%)と G/C ヘテロを持つものが患者に有意に多かった($p<0.001$) (表 1)。

POMS の結果、患者の 72.7%が何らかの精神的ストレスを感じていた。HSPA1L 遺伝子 190 領域の SNP と精神的ストレスの関連をみたところ、患者全体(24 例)のうち G/C ヘテロを持ちストレスを感じているものが 13 例(54.2%)と最も多かった(表 2)。患者において HSPA1L 遺伝子 190 領域の G/C ヘテロと G/G ホモそれぞれの群でメニエール病の臨床的発作回数の平均値を比較してみると、G/C ヘテロ 5.37 回、G/G ホモ 3.57 回と G/C ヘテロ群に多い傾向があった。

HSP70 とその誘導因子である HSF-1 の mRNA 発現を解析したところ、HSF-1 では mRNA の発現量に差はみられなかった(図 2)。HSP70 の mRNA の発現量は対照と比べて発現が著しく増加しているものや発現の低下しているものがあつた。患者全体(24 例)のうち HSP70 と精神的ストレスの関連をみたところ、mRNA の発現が増加し、ストレスを感じているものが 12 例(50.0%)と最も多かった(表 3)。HSPA1L 遺伝子の 190 領域の SNP と mRNA の関連をみると、G/C ヘテロを持ち mRNA の発現が増加しているものが 12 例(50.0%)と最も多かった(表 4)。

【考察と結論】

メニエール病患者に健常者と比べて有意に多い SNP が HSPA1L 遺伝子 190 領域にあつた。SNP とは一塩基多型といい、ひとつの塩基が他の塩基に置き換わる遺伝子変異の一種であり、正常人でも存在する数百塩基対から一千塩基対に1か所程度の割合で起こる。その存在部位によっては遺伝子の機能、すなわちタンパクの質的・量的異常を引き起こす可能性があり、そのため疾患発症の危険因子や薬剤応答性に関与する。コントロール群とある疾患群の間で特定の SNP の出現頻度を調べて有意差をもって疾患群に多い場合、その SNP が

この疾患の成因に関与することがわかってきている。このことから、HSPA1L 遺伝子 190 領域の SNP はメニエール病の成因に関与することが考えられる。

HSPA1L 遺伝子 190 領域 G/C ヘテロを持つ患者はストレスを感じている割合が多く、発作回数も多い傾向にあった。聴力予後との検討も行ったが HSPA1L 遺伝子 190 領域の SNP との相関はなかった。このことから、HSPA1L 遺伝子 190 領域の SNP はメニエール病の成因に関与するが重症度に関与する因子ではない可能性が考えられた。

HSP70 は温熱や水侵拘束ストレスによって発現するタンパクであることはすでに知られている。精神的ストレスを感じている群に HSP70 の mRNA 発現が増加している割合が多かったことから、精神的ストレスがかかった場合にも生体の防御反応として HSP70 を合成するために mRNA の発現が増加しているのではないかと考えられた。また、HSPA1L 遺伝子 190 領域 G/C ヘテロをもつものに HSP70 の mRNA の発現が増加している症例が多かった。しかしこの SNP は mRNA の翻訳領域にあることより、合成されたタンパクの機能に障害がある可能性が考えられる。

一方、めまいそのものがストレスとなり HSP70 の増加をきたす原因となることが予想される。そこで今後 BPPV などの発症機序が解明されている疾患においても SNP 解析・mRNA の発現量の解析を行い、メニエール病と比較検討する。また、メニエール病においても発作期と寛解期で mRNA の発現量を解析し比較検討する予定である。

【参考文献】

- 1) 北原正章, 他: 心身医学的にみたメニエール病. 耳鼻臨床 1977;70(増 5):1778-1782
- 2) Morimoto R I. et al: Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperons. Cell 2002, 110: 281-284
- 3) 伊藤要子: 温熱療法の新しい臨床応用(予備加温療法) - 加温により誘導される HSP70 の生体防御作用 - . 放射線生物研究 1988, 33:4
- 4) Berrocal JRG et al: Validity of the western blot immunoassay for heat shock protein -70 in associated and isolated immunorelated inner ear disease. Laryngoscope 2002, 112: 304-309

			HSPA1L 190 genotype	
			G/G	G/C
Stress	+	n	3	13
		%	12.5	54.2
-	-	n	3	5
		%	12.5	20.8

n=24

表2 HSPA1L遺伝子のSNPと精神的ストレス

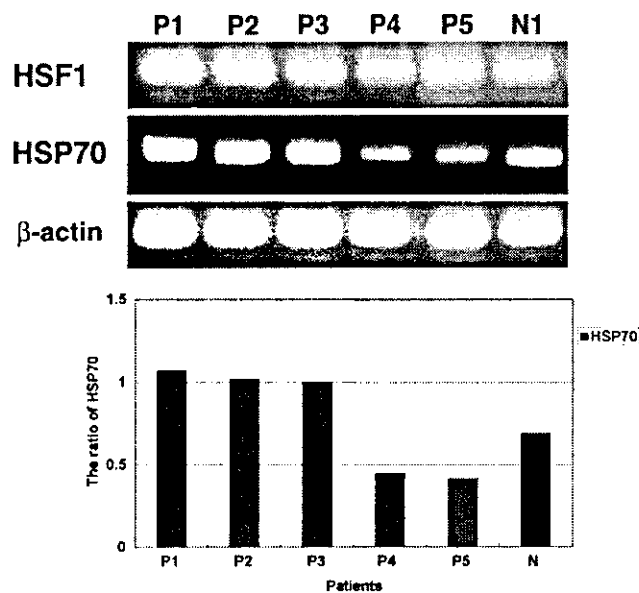


図2 HSP70・HSF-1のmRNA発現

		Stress		
			+	-
mRNA	Over expression	n	12	3
		%	50.0	12.5
	Down regulation	n	6	3
		%	25.0	12.5
			n=24	

表3 精神的ストレスとHSP70のmRNAの発現量

		HSPA1L 190 genotype		
			G/G	G/C
mRNA	Over expression	n	3	12
		%	12.5	50.0
	Down regulation	n	5	4
		%	20.8	16.7
			n=24	

表4 HSPA1L遺伝子のSNPとmRNAの発現量

摘出卵形囊および摘出後半規管を用いた BPPV のモデル実験

稲垣太郎¹⁾, 鈴木 衛¹⁾, 北島尚治¹⁾, 大塚康司²⁾, 古屋正由³⁾, 小川恭生¹⁾, 竹之内剛³⁾

(¹⁾東京医科大学耳鼻咽喉科 (²⁾厚生中央病院耳鼻咽喉科

(³⁾東京医科大学八王子医療センター耳鼻咽喉科)

【はじめに】

良性発作性頭位めまい症 (benign paroxysmal positional vertigo: BPPV) は、頻度の高いめまい疾患で、予後は比較的良好である。基本的に自然寛解するが、中には数年以上も続く難治例もある。BPPV の病態として、canalolithiasis¹⁾, cupulolithiasis²⁾が考えられてきたが、典型例では後半規管の canalolithiasis が主たる病因とされるようになった。

BPPV に対しては上記の説を根拠として様々な理学療法が工夫、施行されており治療に役立っている。しかしながら、理学療法直後から眼振の誘発がないにもかかわらず、数日間浮動性のめまいが残る例がしばしばみられる。このめまい感は、後半規管から卵形囊に返還された耳石が卵形囊斑に何らかの作用を及ぼし、生じているのではないかと推察される。

今回われわれは、摘出卵形囊を用いて BPPV モデルを作成し、卵形囊斑上での耳石の作用、特に BPPV 理学療法後の卵形囊斑感覚上皮への作用について検討した。また、摘出後半規管を用いて canalolithiasis モデル、cupulolithiasis モデルを作成し、両モデルにおいて介在する耳石が半規管の反応にどのように影響するかについても検討した。

【対象と方法】

実験 I: 返還耳石の卵形囊電位に及ぼす影響

実験には、体重 110-220g のウシガエル (*Rana catesbeiana*) を用いた。

ウシガエルをエーテルにて深麻酔後断頭し、実体顕微鏡下に Suzuki らの方法³⁾に準じ、リンゲル液内で前、外側半規管および卵形囊に上前庭神経が付着した状態で摘出した。さらに、前、外側半規管膨大部神経を膨大部付着部で切断した。卵形囊斑周囲の膜迷路は切除し、平衡斑を直視できるようにした。リンゲル液を満したシャーレの中心から 3cm の位置に試料を針で固定した。この時、膨大部側が外側、神経が内側になるようにし、卵形囊斑は水平面内に位置するよう注意した (図 1)。上前庭神経はガラス吸引電極で吸引し、卵形囊神経からの複合活動電位 (CAP) を記録した。

卵形囊を固定したシャーレを直径 30cm の回転テーブルの中心に固定し、振子様回転刺激を加えた。回転周期 0.1Hz、振幅 135°、最大角速度 84°/sec. とした。

実験 I-a: 卵形囊斑耳石を除去する前後での CAP の変化

耳石が卵形囊感覚上皮をいかに有効に刺激するかを検討するために、卵形囊斑耳石を除去する前後での CAP の変化を観察した。卵形囊斑上の耳石を微量の水流にて注意深く除去し、その前後にて振子様回転刺激に対する卵形囊神経 CAP スパイク密度の変化を観察した。

実験 I-b: 卵形囊斑上に返還した耳石の作用

卵形囊斑上に返還した耳石の作用を調べる目的で、耳石塊を負荷する前後での卵形囊神経 CAP の変化を観察した。卵形囊斑上に負荷する耳石塊は同側の球形囊耳石を用いた。

(1) 耳石塊を卵形囊斑上に負荷した瞬間の CAP の変化を記録した。

(2) 負荷前、負荷直後および負荷 10 分後にて振子様回転刺激に対する卵形囊神経 CAP の変化を観察した。

実験 II: canalolithiasis モデル、cupulolithiasis モデルの耳石が半規管電位に及ぼす影響

ウシガエルをエーテルにて深麻酔後断頭し、Suzuki らの方法⁴⁾により実体顕微鏡下に後半規管および膨大部神経のみを摘出した。

実験 I と同様にシャーレに膨大部が右側、神経が外側になるように固定した (図 1)。回転テーブルへのシャ

ーレの固定, 振子様回転刺激の条件は実験 I と同様である. canalolithiasis モデル, cupulolithiasis モデルは Suzuki らの方法により作成した. 後半規管神経はガラス吸引電極で吸引し CAP を記録した.

まず, 正常後半規管の振子様回転刺激に対する CAP を記録した. ついで canalolithiasis モデル, cupulolithiasis モデルを作成し, 振子様回転刺激に対する CAP を記録した. 負荷した耳石の量は半規管内における耳石塊の長さがクブラ全長の半分以上となるようにした.

誘発された CAP は, ガラス吸引電極を通じてオシロスコープへ誘導し, スパイク密度ヒストグラムに変換した (図 1). ヒストグラム上にて振子様回転刺激に応じる正弦波波形の最大値の平均と最小値の平均の差を計算し, 反応量とした (図 2).

【結果】

実験 I -a: 耳石除去前の卵形囊神経 CAP スパイク密度は振子様回転刺激に応じて正弦波様波形を示したが, 耳石除去後正弦波様波形は消失した. なお, 自発放電に変化はなかった (図 3).

実験 I -b(1): 卵形囊神経 CAP スパイク密度は, 耳石負荷後 3-4 秒間一過性に増加した. 増加率は約 2 倍であった. 約 30 秒後に再度負荷しても同様の反応が記録された (図 4).

実験 I -b(2): 耳石負荷前の自発放電の平均は 38.5spikes/sec. であった. 振子様回転刺激での CAP ヒストグラムは 5 秒周期の正弦波波形となり, 耳石負荷前の最大値と最小値の差 (反応量) は平均 114.2spikes/sec. であった. 耳石負荷直後は 98.4spikes/sec. から 146.6spikes/sec. に及び, 負荷前に比べると 7 個の試料で増加し 4 個の試料で減少していた. 耳石負荷 10 分後は 103.3spikes/sec. から 141.7spikes/sec. であり, 耳石負荷直後とほぼ同じ値であった (図 5).

実験 II: 振子様回転刺激での後半規管神経 CAP ヒストグラムは 10 秒周期の正弦波波形となった. 耳石負荷前反応量は平均 232.7spikes/sec. であった. canalolithiasis モデルでは 200 から 310spikes/sec. であり, 負荷前とほぼ同じ値であった. しかし, 正弦波波形自体が消失し自発放電のみ認めるものも 2 個あった. cupulolithiasis モデルでは 112.5 から 160spikes/sec. であり, 負荷前に比べ抑制されていた. 正弦波波形自体が消失し自発放電のみ認めるものは 3 個あった (図 6).

【考察】

典型的な BPPV 症例は, 頭位変換眼振検査にて方向交代性の回旋性眼振を呈する. その病変は後半規管内の半規管結石症とされており, Epley ら⁵⁾, Brandt ら⁶⁾により有効な理学療法が報告されている. Suzuki ら⁷⁾も BPPV モデルにおいて後半規管内の耳石の移動とそれに伴う後半規管膨大部神経 CAP の変化を報告している.

臨床の場合では, 理学療法直後またはしばらく経過後浮動性のめまいを訴える症例をしばしば経験する. 転倒する例もあり, 理学療法のリスクマネージメントの意味からも注意が必要である. これは半規管から卵形囊斑上に返還した耳石の影響と推察されるが, 実際に耳石が卵形囊斑上でどのように作用しているかはまだ検討されていない. 今回, 振子様回転刺激を用いて耳石負荷が卵形囊電位に及ぼす影響を検討した.

卵形囊斑では運動毛が耳石膜の小孔に陥入しており, その耳石膜表面に耳石が付着している. 実験 I -a で卵形囊斑上の耳石を除去することにより, 振子様回転刺激に応じる CAP が消失したことから, 耳石が今回の回転加速度に対するトランスデューサーとして重要な働きをしていると考えられる. Suzuki らは後半規管のクブラを摘出すると自発放電は認めるが CAP はほとんど失われ, その後クブラを元の位置に戻すと再び CAP が得られたと報告している⁴⁾. 卵形囊での耳石は膨大部での cupula と同様の役割を担っているものと思われた.

実験 I -b(1) で耳石負荷直後に CAP スパイク頻度が増加したのは, 負荷耳石の感覚細胞に対する直接的な刺激によると思われる. これが理学療法直後のめまい増強に関与することが推測された. なお, 耳石負荷前の自発放電の頻度は Shirane⁸⁾によると 10-100spikes/sec. であり, 今回の実験でも同様の結果であった.

実験 I -b(2) では, 実験 I -a の結果を考えると耳石負荷後に全例で CAP スパイク密度が増加する事が予想されたが, 実際には増加する場合, 減少する場合ともにみられた. これは卵形囊斑感覚上皮の形態的特徴によるものと考えられる. 卵形囊斑の感覚細胞は striola を境に 2 つの細胞群に分けることができ, それぞれの動毛

が向かい合う方向で並んでいる。負荷した球形囊耳石塊の存在する位置、そして耳石塊負荷により運動毛が興奮側、抑制側のどちらに倒れるかにより回転刺激に対するCAP発火頻度が左右されると推測される。striolaはやや外側に位置するため、内側部分の細胞数が多い。この部の運動毛が外側に倒れた場合に卵形囊CAP発火頻度はより増加する。反対に内側に倒れた場合は、発火頻度は減少すると考えられる。いずれにしても理学療法によって返還した耳石塊の負荷により、誘発されるCAPに変化が生じることになり、それが理学療法後に現れるふらつきの原因ではないかと考える(図7)。CAP発火頻度が増加した症例の方が多くなったのは、振子様回転刺激により生じる遠心力の影響のため動毛が外方に倒れやすくなったためと考えられる。

Sekineら⁹⁾は外側半規管型BPPV患者の前庭一眼反射(vestibulo-ocular reflex: VOR)がcanalolithiasisでは変化なかったが、cupulolithiasisでは抑制されたと報告している。またBPPV患者で温度眼振が抑制されたという報告もある^{10,11)}。

今回の実験Ⅱでのcanalolithiasisモデルでは反応の抑制が少ないので、内リンパ流動の抑制効果は弱いと思われた。反応が消失したのは耳石が半規管内で塞栓を起こし内リンパ流動が消失するに至ったためと考えた。これは半規管を結紮した際に反応が消失した¹²⁾のと同様の機序であろう。またcupulolithiasisモデルでCAPが抑制されたのは、耳石自体が直接クプラの偏位を妨げ、CAPを抑制したものと考えられた。

【結語】

ウシガエルの膜迷路を用いて、卵形囊および後半規管における耳石の作用を検討した。

耳石は卵形囊斑上にて運動刺激に対するトランスデューサーとして重要な働きをしていた。

理学療法にて卵形囊斑上に返還された耳石は、理学療法直後のめまいおよび遷延するふらつきの原因になると考えられた。

cupulolithiasisモデルでは、振子様回転刺激に対する反応が著明に抑制された。

【参考文献】

- 1) Hall SF, Ruby RRF, McClure JA. The mechanics of benign paroxysmal vertigo. *J Otolaryngol* 1979; 8: 151-8.
- 2) Schuknecht HF. Cupulolithiasis. *Arch Otolaryngol* 1969; 90: 765-78.
- 3) Suzuki M, Harada Y, Hirakawa H, Hirakawa K, Omura R. An experimental study demonstrating the physiological polarity of the frog's utricle. *Arch Otorhinolaryngol* 1987; 244: 215-7.
- 4) Suzuki M, Harada Y, Sugata Y. An experimental study on a function of the cupula: effect of cupula removal on the ampullary nerve action potential. *Arch Otorhinolaryngol* 1984; 241: 75-81.
- 5) Epley JM. Positional vertigo related to semicircular canalolithiasis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 112: 154-61.
- 6) Brandt T, Stedden S. Current view of the mechanism of benign paroxysmal positioning vertigo: Cupulolithiasis or canalolithiasis? *J Vestib Res* 1993; 3: 373-82.
- 7) Suzuki M, Kadir A, Hayashi N. Functional model of benign paroxysmal positional vertigo using an isolated frog semicircular canal. *J Vestib Res* 1996; 6: 121-5.
- 8) Shirane M. Action potential from isolated frog utricle. *Equilibrium Res* 1983; 42: 16-20.
- 9) Sekine K, Imai T, Nakamae K, Fujioka H, Takeda N. Dynamics of the vestibulo-ocular reflex in patients with the horizontal semicircular canal variant of benign paroxysmal positional vertigo. *Acta Otolaryngol* 2004; 124: 587-94.
- 10) Baloh RW, Honrubia V, Jacobson K. Benign positional vertigo: clinical and oculographic features in 240 cases. *Neurology* 1987; 37: 371-8.
- 11) Korres SG, Balatsouras DG, Ferekidis E. Electroneystagmographic findings in benign

paroxysmal positional vertigo. Ann Otol Rhinol Laryngol 2004; 113: 313-8.

12) Suzuki M, Kadir A, Hayashi N. Experimental model of vertigo induced by detached otoconia. Acta Otolaryngol 1996; 116: 269-72.

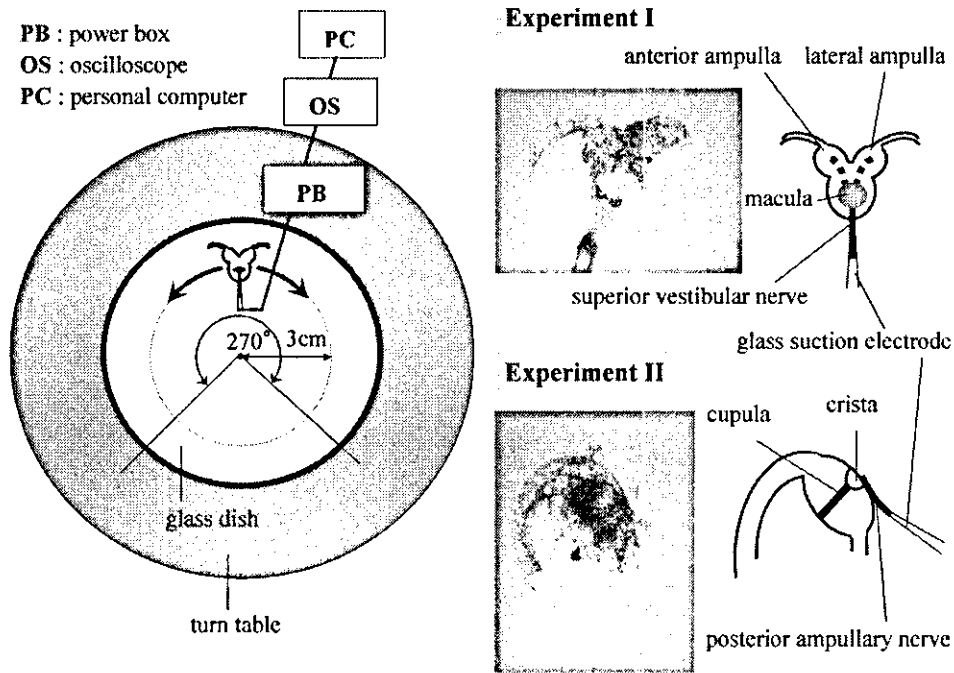


図1. 実験装置(左)顕微鏡下にみた卵形嚢, 後半規管およびそれらの模式図(右)

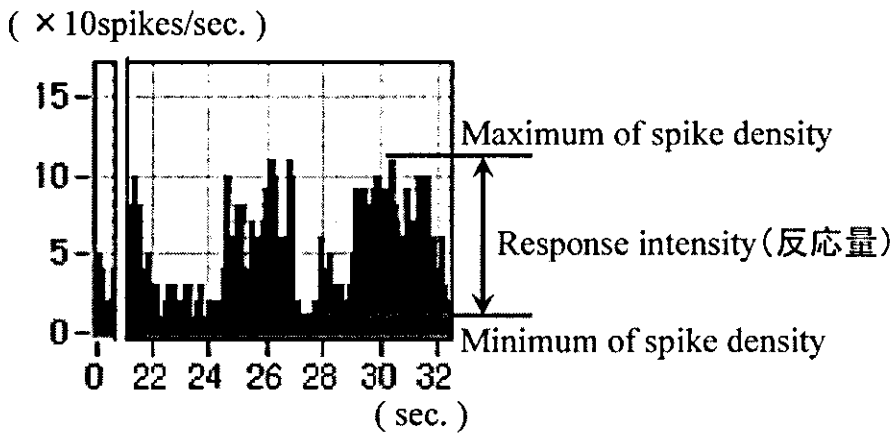


図2. ヒストグラム上での最大値, 最小値および反応量の決定法

Experiment I-a

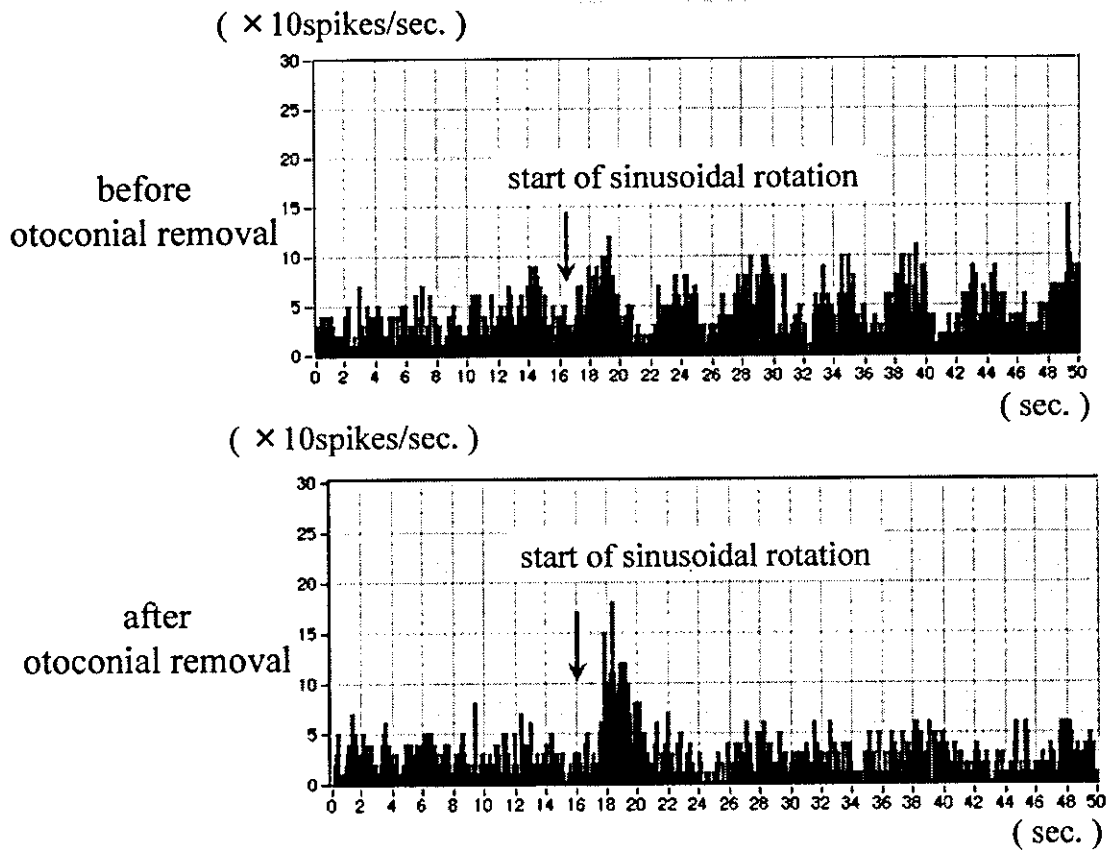


図3. 実験 I-a における耳石の作用。
耳石除去前は振子様回転刺激に伴う正弦波波形を示したが、耳石除去後に正弦波波形は消失した。

Experiment I-b (1)

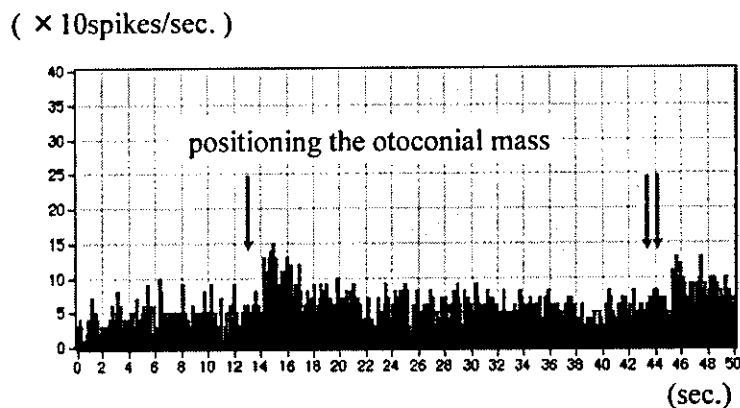


図4. 実験 I-b(1)における耳石の作用。
耳石を卵形囊斑上に負荷した直後から3-4秒間、上前庭神経CAPスパイク密度は一過性に増加した。増加率は約2倍であり、約30秒後に再度負荷しても同様の反応が記録された。

Experiment I-b (2)

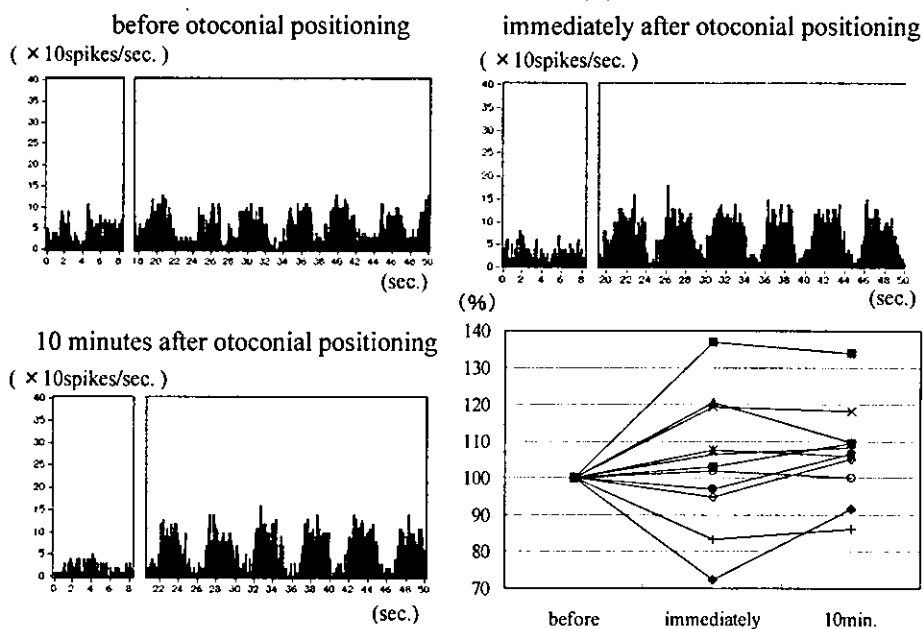


図5. 実験 I-b(2)における耳石の作用

振子様回転刺激でのヒストグラムは5秒周期の正弦波波形となり、耳石を負荷することにより、この例での振幅は増大した。10分後でもその効果は変わらなかった。7例で増加し4例で減少していた。

Experiment II

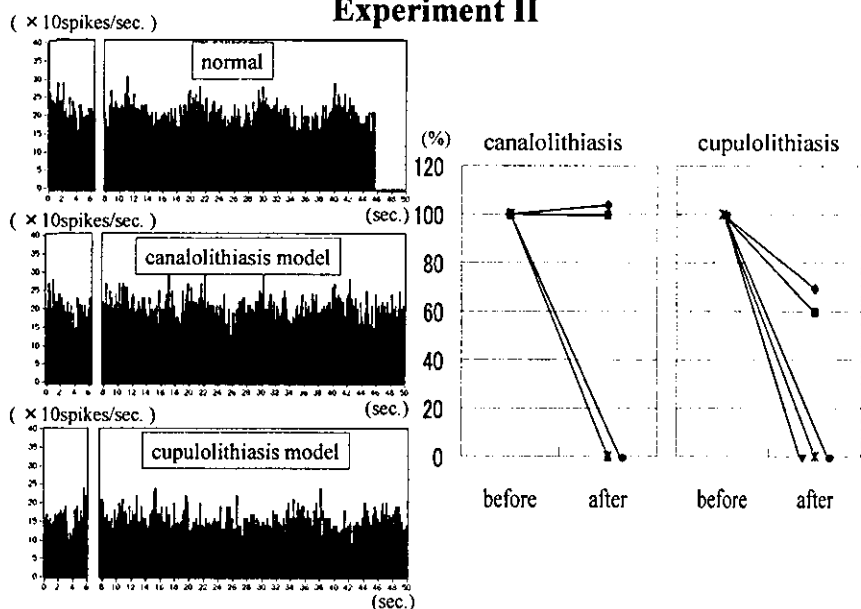


図6. 実験 II における耳石の作用

振子様回転刺激でのヒストグラムは10秒周期の正弦波波形となった。canalolithiasis モデルでは、正弦波波形自体が消失したが、正弦波波形を認めたものでは負荷前とほぼ同じ値であった。Cupulo-lithiasis モデルでは負荷前に比べ抑制されていた。正弦波波形自体が消失し自発電のみ認めるものもあった。

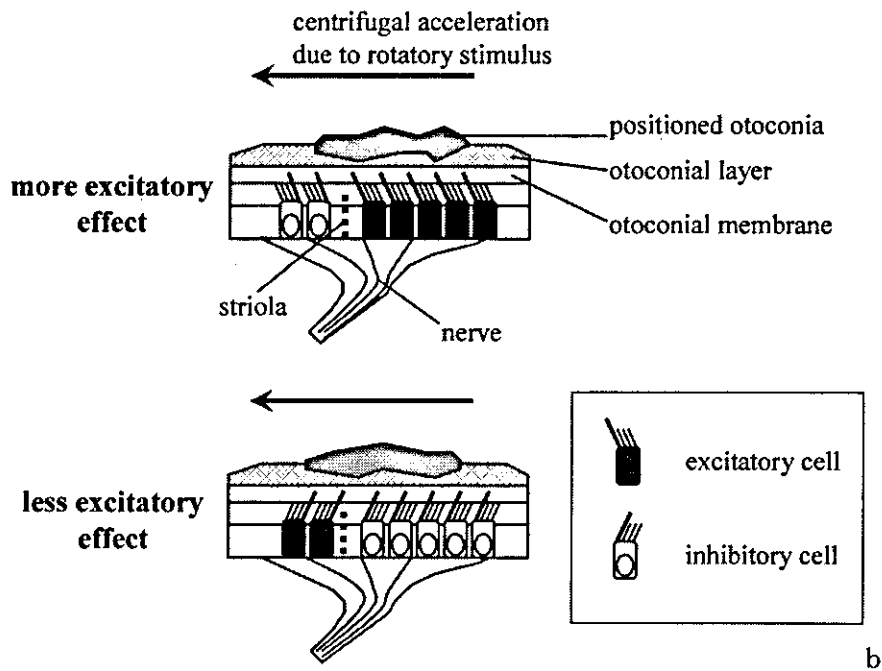


図7. 耳石塊が卵形囊斑に及ぼす影響

卵形囊斑上に耳石塊を負荷した際、感覚毛が外側に倒れた状態になると興奮性の電位が出やすく、内側に倒れた状態では抑制されやすくなると考えられる。

メニエール病の病態と治療に関する研究

分担研究者 工田 昌也 広島大学講師

研究要旨 メニエール病の新しい治療薬剤の開発を目的として、エダラボンによる内耳障害の軽減効果ならびに抗酸化剤の作用機序について検討した。その結果、抗酸化剤による治療はメ病の内耳障害、特に聴力の回復に有効であり、投与経路としては局所投与が全身投与より優れていることが明らかとなった。臨床的にはメ病の聴力変動、特に患側と健側との関係を検討し、メ病による聴力変動は両側性に生じることが多く、メ病の病因にストレスなどの全身的要因が大きく関与していることが明らかとなった。

A. 研究目的

メ病の新しい治療法の開発を目的に、基礎的にはエダラボンのフリーラジカル抑制作用による内耳障害軽減作用の検討を行なった。また、臨床的には抗酸化剤のメ病、特に聴力障害に対する治療効果のまとめを行い、その問題点、今後の展開について検討した。さらにメ病の聴力変動について解析し、その病態を検討した。

B. 研究方法

1) エダラボンによる内耳障害の軽減

プライエル反射正常の成熟ラットを使用した。動物は9群にわけ、A群はエダラボン 3mg/kg を1日1回3日間静注、B群はエダラボン 0.8mg を鼓室内投与、C群はPaExoA, 2 μ g 鼓室内投与と同時、D群はPaExoA 投与1時間後、E群はPaExoA 投与24時間後にエダラボン 0.8mg を鼓室内投与、F群はPaExoA 投与直後より、G群はPaExoA 投与後1時間後から、H群はPaExoA 投与後24時間後からエダラボン 3mg/kg を1日1回、3日間静注、I群はPaExoA 投与直後から生食3日間静注を行った。

内耳障害の検討はABRで行い投与前、投与後2, 5, 9日に測定した。

2) 抗酸化剤によるメ病の治療

抗酸化剤の難聴に対する治療効果を検討するため老人性難聴、シスプラチン難聴、メ病に対して抗酸化剤(レバミピド、ビタミンC、グルタチオン、など)を原則として8週間以上経口投与し難聴に対する治療効果を検討した。また、抗酸化剤の一種である α -lipoic acid を難治性のステロイド依存性感音難聴の1例に投与し、その効果を検討した。

3) メ病の聴力変動

一側性メ病51例の聴力の変動を標準純音聴力検査を基に患側低周波数(125, 250, 500Hz)平均聴力レベル、患側全周波数(125, 250, 500, 1k, 2k, 3k, 4k, 8kHz)平均聴力レベル、患側8kHz聴力レベル、対側低周波数平均聴力レベル、対側全周波数平均聴力レベルの変動を経時的に解析すると共に、それぞれの相関を検討した。

C. 研究結果

1) エダラボンによる内耳障害の軽減

エダラボン単独投与ではABR閾値の変化は認められなかった。また、PaExoA 鼓室内投与によりすべての動物でABR閾値の上昇が認められたが、PaExoA 鼓室内投与と同時あるいは1時間後にエダラボンを鼓室内投与したものではABR閾値の上昇は認められなかった。PaExoA 投与24時間後にエダラボンを鼓室内投与したものでは投与2日後に2匹の動物でABR閾値の上昇が認められた。PaExoA 鼓室内投与直後よりエダラボンを静注したものではABRの閾値上昇は認められなかったが、PaExoA 投与1時間後からエダラボン静注を開始したものでは投与2日後に2匹の動物でABR閾値の上昇が認められた。PaExoA 投与24時間後からエダラボンを静注したものではすべての動物でABR閾値の上昇が認められた。

エダラボンの投与時期、経路による内耳障害予防効果の比較では、エダラボンを3日間静注した群でのABR閾値の変動はPaExoA 投与直後から静注を開始した群で有意($p<0.01$)に減少したが、PaExoA 投与後1時間、24時間後からの群では障害予防効果は認められなかった。PaExoA 投与後に

エダラボンを鼓室内投与したものでは同時投与群、1時間後に投与した群で有意な減少が認められたが24時間後に投与した群では有意差は認められなかった。

2) 抗酸化剤によるメ病の治療

抗酸化剤による難聴の治療成績は老人性難聴では125, 250, 500, 8000Hzで有意の聴力改善が認められ、抗酸化剤投与前のオーディオグラムと投与後のオーディオグラムを各周波数別に比較し、10dB以上の改善があったものを改善、10～10dBを不変、10dB以上悪化したものを悪化、とすると改善率は125Hzで40%、250Hzで37%、500Hzで34%、1kHzで26%、2kHzで6%、4kHzで26%、8kHzで46%であった。シスプラチン難聴では125, 250, 500, 8000Hzで有意の聴力改善が認められ、改善率は125Hzで69%、250Hzで54%、500Hzで54%、1kHzで31%、2kHzで31%、4kHzで23%、8kHzで46%であった。メ病では125, 250, 500, 1000, 2000Hzで有意の聴力改善が認められ、改善率は125Hzで62%、250Hzで59%、500Hzで59%、1kHzで45%、2kHzで28%、4kHzで26%、8kHzで28%であった。

α -lipoic acid 投与例は29歳女性、ステロイド依存性感音難聴症例で17週間の投与で聴力は平均10.7dBの改善を示した。

3) メ病の聴力変動

今回検討した疾患のうちメ病では程度の差はあれほぼすべての症例で患側の聴力変動に加えて健側にも聴力変動が生じていることが明らかとなった。さらにはほぼ半数の症例では低周波数の聴力変動と相関して8kHzの聴力変動が生じていた。これらを相関の有無で比較すると、低周波数平均聴力レベル、全周波数平均聴力レベルの両者ともメ病で患側と健側との間に相関が有るものが多かった。次に、聴力の変動が年平均変動回数で1.19/年より大きいものとそれ以下とのもので比較した結果、聴力変動が大きいものでは患側と健側との聴力に相関のあるものが有意に多かった。また、全周波数の平均聴力が40dB未満のものと40dB以上のものとの比較では患側低周波数平均聴力レベルと8kHz聴力レベルとの間で聴力の悪いもので相関が有るものが多い傾向が認められた。また、血清ADH値と年平均聴力変動回数の関係を検討した結果、有意な正の相関を認めた。

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あるが、近年の研究により、その病態には共通した障害機構が存在し、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とが明らかになっている。このような観点から我々はフリーラジカルを制御することで内耳障害の予防や治療が可能になることを報告してきた。今回、抗酸化剤であるエダラボンの内耳障害予防・治療効果をラットPaExoA鼓室内投与モデルを使用して検討した結果エダラボンが有意に聴力障害の発現を抑制することが明らかとなった。また、抗酸化剤の投与時期の検討では障害作成後24時間以内なら何らかの効果が認められることが明らかとなった。さらに、投与経路として鼓室内投与と静脈内投与を比較した結果、鼓室内投与のほうが有意に障害発生を抑制できることが明らかとなり、AMPAによる前庭障害動物でのエダラボンの効果と同様の結果であった。この理由として、鼓室内投与のほうが短期間に局所濃度が上がることなどが考えられた。加えて、局所投与では全身的副作用の軽減や使用薬剤の減量が可能であり、抗酸化剤の投与経路は局所投与のほうが全身投与に比べてより有効であると考えられた。

我々は、フリーラジカルを制御することで内耳障害の軽減あるいは治療の可能性があることを明らかにし、この認識に従って各種感音難聴に対して抗酸化剤による治療を行ない、メ病、老人性難聴、シスプラチン難聴に対してある程度の効果を挙げることができた。難聴に対する治療効果の周波数別検討では125, 250, 500Hzの低周波数はすべての疾患で良好な効果であり、老人性難聴、シスプラチン難聴では8000Hz、メ病では1000Hzがそれに続いた。それに対して2000, 4000Hzでの改善は少なかった。一般に感染、騒音、耳中毒性薬剤による難聴は感覚細胞が最も障害を受けやすい高音域から生じ、低音域の障害には内リンパ水腫あるいは血管条、血管障害などが関与するとされている。実際、感染、耳毒性薬剤、騒音などの内耳障害性の刺激によりコルチ器有毛細胞や血管条でフリーラジカルが発生することが報告されており、今回の検討からも抗酸化剤はこのような場所でのフリーラジカルの産生を制御し聴力の回復につながったものと考えられた。抗酸化剤による難聴の治療に関する問題点としては1)すべての症例に治療効果が認められるわけではないこと、2)2000, 4000Hzでの改善が少ないこと、3)明確なエビデンスがないこと、などがあげられる。これらのうち1), 2)

に関して実際に我々の用いた抗酸化剤の作用が不十分であった可能性があること、抗酸化剤の作用機序としてフリーラジカルを消去する結果細胞機能の改善が期待できるものの完全に死んでしまった細胞は再生不可能なことなどが考えられる。しかしながら、逆に考えればこれまで治療法のなかった難聴の何割かが改善できる可能性を示したものともいえる。抗酸化剤については今回使用したもののほかにも種々の薬剤がありそれぞれ動物実験により内耳障害軽減効果が認められており、その中の一部は実際に臨床において使用されている。実際、 α -lipoic acidなどはビタミン C の 100 倍以上の抗酸化作用を有し、欧米ではサプリメントとして一般に販売されており、我々が使用した結果でも良好な結果を得た。さらに、抗酸化剤の投与経路に関しても全身投与よりも局所投与のほうが効果が大きいといった報告もあり、薬剤の選択、投与経路の改善などで治療効果を改善できる可能性も有る。また、3)のエビデンスに関して突発性難聴では抗酸化剤の有用性についての比較試験も行われており、今後は厳密なケースコントロールスタディーを行う予定である。

今回の検討で一側性メ病においても両側メ病と同様に患側の聴力変動とともに健側にも聴力変動が生じていることが明らかとなり、メ病のほぼ半数で患側と健側の聴力レベルに相関を認め、この傾向は特に聴力変動の多い症例でより顕著であった。患側の聴力変動と相関して健側にも聴力変動が生じることは聴力変動の原因として心理的ストレスのような全身的要因の関与が考えられる。メ病の病態にストレスが大きく関与することは良く知られており、実際、今回ストレスのマーカーとして血清 ADH の測定を行ったが血清 ADH の値と年平均聴力変動回数は有意の相関を示し、聴力変動の多いものでは患側の聴力変動と相関して健側にも聴力変動が生じる傾向はより顕著であった。これらのことから考えるとメ病の原因のひとつには全身的な要因があり、その影響は程度の差はあれ両耳に及ぶものと考えられ、一側性メ病の少なからぬものが両側に移行していくことに関係しているものと思われた。さらに、患側低周波数平均聴力レベルと 8kHz 聴力レベルとの関係の検討では、メ病のほぼ半数の症例で患側低周波数の変動と相関して同側 8kHz の聴力の変動が生じているものが認められ、この傾向は聴力変動の多いもの、平均聴力の悪いもの、病態の進行しているものでより顕著であった。一般的に内リンパ水腫は蝸牛頂回転に強く、感

覚細胞障害は蝸牛基底回転に強いが、メ病の聴力障害は低周波数は主に内リンパ水腫により、8kHzでの聴力低下は感覚細胞障害によるものと考えられ、低周波数の聴力の変動と相関して同側 8kHz の聴力の変動が生じることはメ病の病的変化は内リンパ水腫のみではなくそれに加えて蝸牛全体に何らかの障害が生じており、このことが長期的な高音部も含めた聴力の低下をきたす原因と思われた。

E. 結論

新しいメ病の治療薬としてはフリーラジカルを制御する薬剤が有効であると思われた。また、メ病の病態にストレスなどの全身的要因が大きく関与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) 工田昌矢:末梢前庭器におけるフリーラジカル. *Equilibrium Res*; in press.
- 2) 工田昌矢:中耳炎による内耳障害の発症機序と治療について. *Otol Jpn* 14:36-38,2004
- 3) Takumida M, Anniko M: Localization of endotoxin in inner ear following inoculation of endotoxin in the middle ear. *Acta Otolaryngol* 2004;124:772-777.
- 4) Takumida M, Anniko M: Functional significance of nitric oxide in the inner ear. *In Vivo*. 2004 ;18:345-50.
- 5) Takumida M, Anniko M: Heat shock protein 70 delays gentamicin-induced vestibular hair cell death. *Acta Otolaryngol*; in press

2. 学会発表

- 1) 工田昌矢, 夜陣絃治:抗酸化剤による老人性難聴の治療効果. 第 14 回日本耳科学会 2004,10 京都
- 2) 工田昌矢, 夜陣絃治:メニエール病の聴力変動-特に対側聴力との関係-. 第 62 回日本めまい平衡医学会.2004,11,高崎

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

エダラボンによる内耳障害の予防・治療効果

工田昌也, 夜陣紘治(広島大学病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科)

Matti Anniko(ウプサラ大学医学部耳鼻咽喉科・頭頸部外科)

【はじめに】

我々はこれまで各種内耳障害の発生機序に関して内耳感覚細胞の障害にはフリーラジカルが大きく関与していること, フリーラジカルを制御することで内耳障害の予防, 治療ができる可能性があることを明らかにしてきた¹⁻³⁾. 実際に内耳障害を軽減する薬剤には NO, ROS 消去剤などが考えられているがその詳細, 特に障害作成後の治療効果, 投与経路による効果などについては不明な点が多い. そこで, 今回は内耳障害に対する抗酸化剤であるエダラボンの効果を明らかにすると共に, エダラボンの投与時期, 投与経路について検討した.

【研究方法】

プライエル反射正常の成熟, 雄 Sprague-Dawley 系ラット(体重 230-350 g), 32 匹を使用した. 動物は 9 群にわけ, A 群(n=2)の動物はエダラボン 3mg/kg を 1 日 1 回, 3 日間静注, B 群 (n=2)はエダラボン 0.8mg を鼓室内投与, C 群 (n=4)は PaExoA 2 μ g 鼓室内投与と同時にエダラボン 0.8mg を鼓室内投与, D 群 (n=4)は PaExoA 投与 1 時間後にエダラボンを鼓室内投与, E 群 (n=4)では PaExoA 投与 24 時間後にエダラボンを鼓室内投与, F 群 (n=4)では PaExoA 投与直後よりエダラボン 3mg/kg を 3 日間静注, G 群 (n=4)では PaExoA 投与後 1 時間後からエダラボンを 3 日間静注, H 群 (n=4)では PaExoA 投与後 24 時間後からエダラボンを 3 日間静注, I 群 (n=4)では PaExoA 投与直後から生食を 3 日間静注した.

内耳障害の検討は ABR で行い測定は投与前, 投与後 2, 5, 10 日で行った.

【結果】

ABR 閾値へのエダラボンの効果

Edaravone の単回鼓室内投与, 1 日 1 回 3 日間静脈内投与では ABR の閾値の変化は認められなかった.

ABR 閾値への PaExoA の効果

PaExoA 鼓室内投与によりすべての動物で ABR 閾値の上昇が認められた. この閾値上昇は投与 2 日後にはすべての周波数で認められ, 投与 5 日後には部分的な回復が生じ, 15 日後には完全に回復した.

エダラボン鼓室内投与による ABR 閾値上昇への影響

PaExoA 鼓室内投与と同時にあるいは 1 時間後にエダラボンを鼓室内投与したものでは投与 2, 5 日後とも ABR 閾値の上昇は認められなかった. PaExoA 投与 24 時間後にエダラボンを鼓室内投与したものでは投与 2 日後に 2 匹の動物で ABR 閾値の上昇が認められたが, 5 日後には正常に回復し, 2 匹の動物では ABR 閾値の上昇は認められなかった.

エダラボンの静脈注射による ABR 閾値上昇への影響

PaExoA 鼓室内投与直後よりエダラボンを静注したものでは投与 2, 5 日後とも ABR 閾値の上昇は認められなかった. PaExoA 投与 1 時間後からエダラボン静注を開始したものでは投与 2 日後に 2 匹の動物で ABR 閾値の上昇が認められたが, 5 日後には正常に回復し, 2 匹の動物では ABR 閾値の上昇は認められなかった. PaExoA 投与 24 時間後からエダラボンを静注したものではすべての動物で ABR 閾値の上昇が認められた. エダラボンの投与時期, 投与経路による内耳障害予防効果を比較するために, 各群間で ABR 閾値の上昇の程度を比較した. PaExoA 単独投与群では投与 2 日後に, ABR 閾値は平均 12.6 ± 2.29 dB(平均 \pm SD)の上昇を示した. PaExoA 投与後にエダラボンを鼓室内投与したものでは同時投与群で 4.9 ± 4.70 dB ($p < 0.05$), 1 時間後に投与した群で 3.5 ± 3.70 dB ($p < 0.01$), と有意な減少が認められたが 24 時間後に投与した群では 7.2 ± 8.46 dB であり有意差は認められなかった. エダラボンを 1 日 1 回 3 日間静注した群での ABR 閾値変動は PaExoA 投与直後から静注を開始した群で 1.1 ± 0.78 dB と有意 ($p < 0.01$)の減少が認められたが,