

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

内リンパ水腫形成における水チャネルの役割に関する

臨床的・基礎的研究

分担研究者 竹田 泰三 高知大学教授

研究要旨 内リンパ水腫疾患の病態を臨床的、および実験的に検討した。臨床調査では、長期的に見れば陳旧性突発性難聴の約半数に遅発性内リンパ水腫（DEH）様発作が発現すること、若年性片側聾の2割がDEHに移行することが判明した。特に、若年性片側聾ではDEH発症の有無にかかわらず血漿ADH値の上昇が見られ、内リンパ水腫形成のバックグラウンドになっていると考えられた。実験的検討では、水チャネルとイオンチャネルの2つの特性を持つアクアポリン6（AQP-6）が内リンパ腔を囲む膜迷路の全域に分布していることが分かった。内・外リンパ腔で活発な水・イオンの交換が行われていることを反映しているものと理解された。血管条では基底細胞にAQP2, 3, およびバズプレッシン2型レセプター（V2-R）の局在が確認された。一方、AQP4はHensen, Claudius細胞に発現することが確認された。よって、これらの水チャネルが相互に関連して内耳水代謝に関与しており、その制御の一旦はバズプレッシンによってなされていることが推測された。AQP2,3,4, およびV2-R蛋白はヒトより採取した内リンパ嚢でも発現することが確認され、実験動物で得られた結果はヒトにも普遍することが可能と考えられた。従来、内リンパ嚢閉塞による内リンパ水腫動物はめまい発作を生じず、メニエール病のモデル動物にならないと考えられてきたが、赤外線 CCD カメラによる眼球運動の観察により自発眼振を有する動物がいることを見だした。将来、内リンパ水腫によるめまい発作を解明する重要なモデル動物となりうることを示した。

A. 研究目的

メニエール病をはじめとする内リンパ水腫疾患の発症メカニズム検討する目的で、2つの臨床調査と3つの実験的研究を施行した。臨床調査では、内リンパ水腫の形成課程を把握する目的で陳旧性突発性難聴と若年性片側聾が遅発性内リンパ水腫に移行する率および時期について検討した。若年性片側聾の調査では血漿ADH値についても検討した。実験的研究では水チャネルの局在と制御機構についての検討と内リンパ嚢閉塞による内リンパ水腫動物がメニエール病のめまい発作モデル動物として用いられるかどうかについて検討した。

B. 研究方法

臨床調査1：少なくとも2年間の経過観察がおこなえた1側性の陳旧性突発性難聴61症例について、めまい発作、患耳の難聴・耳鳴の変動の有無などの自覚症状に加えて、聴力検査データより症状固定時の患耳の聴力閾値および健耳の低音障害

型難聴の有無を検討した。

臨床調査2：若年性片側聾81例について、血漿ADH値と純音聴力閾値の経過観察を行った。血漿ADH値の計測はSRL社に委嘱した。これらの経過観察を出来るだけ長期に行い、血漿ADH値の経時的変化と遅発性内リンパ水腫（DEH）の発症率を検討した。

実験1：Wistar系ラットを用い、内耳を摘出し、凍結切片を作成、免疫組織学的にAQP6の局在について検討した。用いた一次抗体はChemicon社製、二次抗体はAlexa 546 anti-rabbit IgGを用い、共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss, LSM410）にて鏡検した。

実験2：Wister ratを用い、V2-R, AQP2, 3, 4の局在をRT-PCR法と免疫染色で検討した。PCRはHot star Taq（Qiagen）を用い、免疫組織学的検討は10 μ m薄切凍結切片を一次抗体Chemicon社製、二次抗体Alexa546を用いて共焦点レーザー顕微鏡で鏡検した。

実験3：内リンパ囊減荷術中に採取した内リンパ囊を資料として AQP2, 3, 4 および V2-R の局在を免疫組織学的に検討した。

実験4：有色モルモットを用い、内リンパ囊閉塞による内リンパ水腫動物の HVOR 測定を行った。HVOR 測定は、振り子様回転中の眼球運動を暗所で赤外線 CCD カメラにて記録、眼球緩徐相をコンピューターにて分析し、VOR gain を求めた。回転刺激は振り子用回転刺激とし、周波数 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 Hz, 最大角速度 45 度毎秒に設定した。なお、HVOR 記録中に必ず自発眼振の有無を確認し、自発眼振が観察している場合は十分長く記録を続行した。この実験に用いた動物は、内リンパ水腫動物 10 匹と sham 手術のコントロール動物 3 匹であった。

C. 研究結果

臨床調査1：陳旧性突発性難聴 6 1 例中 3 1 例 (50.8%) にめまい発作の反復又は難聴・耳鳴の変動の既往がみられた。この DEH 様発作の発症は、突発性難聴罹患後平均 8.4 年に生じた。DEH 様発作を有する症例は全聾例に有意に多いが、比較的難聴が軽度の例にもみられた。健側耳の聴力は、DEH 発症の有無にかかわらず約半数に低音障害型難聴が認められた。その発症率は DEH 発症例に多い傾向があったが、有意差は認められなかった。

臨床調査2：若年性片側聾 8 1 例中 1 7 例 (21%) に DEH の発症が認められた。発症平均年齢は、19.5 才 (10-50 才) であった。DEH 症例の血漿 ADH 値は高値を示したが、DEH 発症の有無にかかわらず、血漿 ADH 値は 20 才前後まで異常高値を示した。

実験1：AQP6 は蝸牛においては、コルチ器および血管条に、内リンパ囊においては内腔上皮に分布していた。前庭においては、平衡斑感覚上皮に明瞭な分布がみられた。

実験2：血管条では基底細胞に AQP2, 3, および V2-R の局在が確認された。一方、AQP4 は Hensen, Claudius 細胞に局在することが確認された。RT-PCR でも、AQP2, 3, および V2-R の mRNA

が蝸牛に発現し、免疫組織の結果を支持した。

実験3：AQP2, 3, 4 および V2R はヒト内リンパ囊の内腔上皮に強い発現が認められた。

実験4：内リンパ囊閉塞動物では、HVOR gain は術後 1 週目で最低値となり、2 週目から回復傾向を示した。4 週目以降は術前と差を認めなかった。Sham 手術動物では HVOR gain の低下は認められなかった。内リンパ囊閉塞動物の 2 例で自発眼振が観察された。

D. 考察

成因が特定できない内リンパ水腫は特発性内リンパ水腫と定義され、その代表的疾患はメニエール病である。一方、内リンパ水腫形成の原因となる疾患が特定できる場合は二次的内リンパ水腫として定義され、異なる疾患概念に分類されている。その中で、突発性難聴、若年性片側聾、側頭骨外傷、アブミ骨置換術後などによる高度難聴が原因となる場合は、DEH として 1 疾患群にまとめられている。今回は、突発性難聴と若年性片側聾について DEH 様発作の発症率について検討した。若年性片側聾では 21% の症例に、陳旧性突発性難聴では 50% の症例に DEH 様発作の発現をみた。前者の発症率は亀井の報告とも一致し、DEH の発症率の正確な数を表していると考えられるが、陳旧性突発性難聴症例の DEH 様発作の発症率は側頭骨病理所見を考慮するとかなり高い発症率である。内リンパ水腫由来でない反復性めまいや聴力変動が含まれているものと考えられ、今後の検討が必要である。

若年性片側聾の検討で、血漿 ADH 値が DEH 発症の有無にかかわらず異常高値を示した事実は注目される。この血漿 ADH 値の異常高値は若年性片側聾の DEH 発症に深く関与する可能性がある。実際、内耳の水代謝は今回の実験動物の内耳やヒト内リンパ囊の免疫染色の結果が示すように ADH-AQP 系水代謝機構によって制御されており、長期にわたる ADH の上昇が内リンパ水腫形成に関わったものと考えられる。

メニエール病のめまい発作の機序は未解明である。内リンパ囊閉塞による内リンパ水腫動物がめ

まい発作モデル動物になりうることを見出したのは大きな収穫である。めまい発作の治療開発に大きな手掛かりを与えてくれるものと期待される。

E. 結論

内耳水代謝が ADH-AQP 系の水代謝機構によってなされていることが実験的に解明された。この ADH-AQP 系の水代謝機構の亢進が DEH の発症に関与している可能性があることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Kakigi A, Okada T, Takeda T, Taguchi D, Zinchuk V. Endocytosis of cationized feritin in the marginal cells of the stria vascularis. *Acta Histochem Cytochem* 2005; 38: 373-380.
- ・ Fukushima K, Takeda T, Kakigi A, Takeda S, Sawada S, Nishioka R, Azuma H, Taguchi D. Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally induced endolymphatic hydrops. *ORL* 2005; 67: 282-288.
- ・ Takeda T, Takeda S, Kakigi A. Meniere's disease & Inner Ear Homeostasis Disorders (ed. by David Lim). Hormonal role on the formation of endolymphatic hydrops in Meniere's disease. House Ear Institute. 2005. pp45-46.
- ・ Fukushima K, Kakigi A, Sawada S, Takeda T, Takeda S. Meniere's disease & Inner Ear Homeostasis Disorders (ed. by David Lim). The effects of lithium on the expression of aquaporin-2 in the inner ear. House Ear Institute. 2005. 167-168.
- ・ Kakigi A, Fukushima K, Takeda T, Takeda S, Sawada S. Meniere's disease & Inner Ear Homeostasis Disorders. Ed by David Lim. The effects of lithium on cochlear fluid volume. House Ear Institute. 2005. 165-166.
- ・ Kakigi A, Salt AN, Takeda T. Meniere's disease & Inner Ear Homeostasis Disorders (ed. by David Lim). Effect of artificial endolymph injection into the cochlear duct on perilymph potassium. House Ear Institute. 2005. 175-176.
- ・ 竹田泰三. 遅発性内リンパ水腫. *ENTONI* 2005; 47: 60-66
- ・ 竹田泰三. メニエール病の病態と治療. *日医雑誌* 2005; 134: 1471-1474
- ・ 竹田泰三. 内リンパ水腫における最近の知見. *Equilibrium Res* 2005; 64: 115-122.

2. 学会発表

- ・ Takeda T, Takeda S, Kakigi A. Mini-Symposium 1: Endolymph Regulation and Mechanism of Hydrops : Hormonal Role on the formation of Endolymphatic Hydrops in Meniere's Disease. 5th International Symposium of Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disease.
- ・ Fukushima K, Kakigi A, Sawada S, Takeda T, Takeda S. The effects of lithium on the expression of aquaporin-2 in the inner ear. 5th International Symposium of Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disease
- ・ Kakigi A, Fukushima K, Takeda T, Takeda S, Sawada S. The effects of lithium on cochlear fluid volume. 5th International Symposium of Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disease.
- ・ Kakig A, Salt AN, Takeda T. Effect of artificial endolymph injection into the cochlear duct on perilymph potassium. 5th International Symposium of Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disease.
- ・ Takeda T. Round Table Treatment of Meniere's Disease (Moderator: Anniko M): Aquaporin-mediated inner ear fluid homeostasis and its role in the formation of endolymphatic hydrops. XVIII World Congress of International Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies.

- Takeda T, Kakigi A, Takeda S, Nishioka R, Sawada S, Azuma H, Fukushima K. Effects of lithium on endolymph homeostasis and experimentally-induced endolymphatic hydrops. 42nd Workshop on Inner Ear Biology
- Kakigi A, Taguchi D, Takeda T. Vestibular function of experimental endolymphatic hydrops in guinea pig. 42nd Workshop on Inner Ear Biology
- Takeda T. Symposium 10: Vertigo, recent progress of evaluation (Modulator: J Thomsen). The treatment of Meniere's disease and inner ear homeostasis. 25th

Politzer Society Meeting.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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

めまいを伴う遺伝性難聴（DFNA9）の病因遺伝子 COCH に関する

基礎的・臨床的調査研究

分担研究者 池園 哲郎 日本医科大学講師

研究要旨 本研究の目的はメニエール病の病態解明，メニエール病の重要な鑑別疾患である外リンパ瘻の確定診断法の確立である。

COCH 遺伝子はめまいを伴う遺伝性難聴（DFNA9）の病因遺伝子である。DFNA9 の臨床症状，所見はメニエール病診断基準と合致しており，メニエール病研究の観点からも近年非常に注目されている疾患である。我々は内耳プロテオーム解析を用いて COCH 遺伝子の発現メカニズム，蛋白レベルでのアイソフォーム解析を報告してきた。今回は内耳発達過程における COCH 遺伝子の発現を蛋白レベルから明らかにした。また，Cochlin アイソフォーム C T P の外リンパ発現特異性を利用し外リンパ瘻確定診断法を開発中で，今回の検討により厳密な検査の精度管理が可能になった。臨床例の検討から外リンパ瘻，とりわけ慢性外リンパ瘻が遅発性内リンパ水腫の重要な鑑別診断となることを示した。

メニエール病，遅発性内リンパ水腫を特異的に診断する診断法はいまだ開発されていない。これらの疾患が除外診断であることに常に留意する必要がある。

A. 研究目的

本研究の目的はメニエール病の病態解明，ならびにメニエール病の重要な鑑別疾患である外リンパ瘻の確定診断法の確立である。

COCH 遺伝子はめまいをきたす遺伝性難聴（DFNA9）の病因遺伝子である。DFNA9 の臨床症状，検査所見は診断基準上メニエール病と診断されることから近年注目されている疾患である。我々は内耳プロテオーム解析を用いて COCH 遺伝子の発現メカニズム，蛋白レベルでのアイソフォーム解析を報告してきた。我々は，今回は内耳発達過程における COCH 遺伝子の発現を蛋白レベルから検討する。また C T P 検出法による外リンパ瘻の臨床診断法を確立させ，メニエール病，遅発性内リンパ水腫の鑑別診断のエビデンス構築に寄与する事を目的とする。

B. 研究方法

1. COCH 遺伝子発現について

今回は Cochlin の発育過程における発現を検討した。4つのアイソフォーム，p63，p44，p40 全てを認識する抗 Cochlin 抗体を使用した。

免疫染色には Wister 系ラット 生後 6 日目，16

日目，成獣，ウェスタンブロットには Wister 系ラット 生後 6 日目，13 日目，17 日目，20 日目，24 日目を使用して検討した。

2. C T P 検出法について

C T P 検出法の精度管理について下記項目を検討した。

A 検査条件の設定

B. 標準品蛋白（標品）としてのリコンビナント C T P 蛋白の作製

C. 検体検出限界の測定および再現性の検討

D. 臨床例における検討

3. 慢性外リンパ瘻の診断治療について

遅発性内リンパ水腫と誤診されていた「外傷性」外リンパ瘻症例の検討を行い，診断基準について考察を加えた。

C. 研究結果

1. COCH 遺伝子発現について

Cochlin は蝸牛ではラセン靭帯やラセン板縁，神経線維周囲の結合組織に，前庭では Stroma や感覚細胞下の結合組織に発現を認めた。一方，蝸牛のコルチ器や血管条，ラセン神経節は染色されず，同様に前庭の感覚細胞や暗細胞は染色されなかつ

た。また蝸牛、前庭ともラットの成長につれて、Cochlin の染色性が増強する傾向がみられた。また染色部位を細かくみると、Cochlin が細胞外マトリックスとして存在していることが明らかとなった。ウェスタンブロットでは生後 6 日目ではほとんど Cochlin の発現は認められなかったが、成長するにつれて Cochlin の発現が増強することが明らかとなった。

2. CTP 検出法の様々な条件設定をした結果、リコンビナント CTP 標品の検出下限(a)と、その 1/2 量(b)を毎回サンプルとともに泳動し、(a) が陽性でかつ (b) が陰性であった検査を採択し、その条件を満たさない場合は再検査とすることで、検査の精度管理が可能になった。

3. 慢性外リンパ瘻の診断治療について

慢性外リンパ瘻は遅発性内リンパ水腫の重要な鑑別診断の一つであることを示した。今回検討した症例では瘻孔閉鎖術後めまいは完全に消失した。

D. 考察

我々は 1998 年より、内耳に発現する遺伝子を蛋白レベルで解析するためウシ内耳を用いたプロテオーム解析を開始した。発現蛋白の種類、量は各臓器に特異的なパターンを呈する事が知られている。我々は内耳蛋白の中でも特に Cochlin に着目しそのアイソフォーム、p63, p44, p40 を同定、遺伝子発現の多様性を明らかにした。今回の結果から、発現部位はカリウムイオンサイクルなどに密接に関係しているとされているラセン板縁、ラセン靱帯に発現を認めることが明らかとなった。また成獣レベルに到達する発現時期についてみても、connexin26 の生後 12 日目や、NA-K ATPase の生後 11 から 14 日目に比べるとやや遅いものの、生後 13 日から 17 日にかけて増加して生後 24 日目に成獣レベルに到達することから、イオンサイクルなど内耳のホメオスタシスに関係している蛋白である可能性が示唆された。

外リンパ瘻の診断マーカーについては β2-トランスフェリンや β トレースプロテイン、GM1, AP30, 蛍光物質髄注などの報告があるが、いずれもアブミ骨手術中に採取した外リンパでさえ陽

性率はいずれも 0~29%と非常に低く、臨床応用に至っていない。我々は CTP に着目し、今まで外リンパ瘻の診断マーカーとしての可能性を報告してきた。そして検査法を改良し症例数を増やした本報告において、実際に臨床応用可能な感度、特異度、再現性を実現し得たと考えている。また非特異的反応の少ない抗体の作成を計画するなど、検査法の改良を追求し、更なる検査の精度管理を進めていく予定である。

メニエール病や遅発性内リンパ水腫を特異的に診断する方法は未だ見いだされていない。特異的診断法が確立していない現状では、器質的疾患、原因既知の疾患が含まれていないか十分鑑別する必要がある。なかでも慢性外リンパ瘻はメニエール病や遅発性内リンパ水腫に臨床経過、検査所見が類似しており、なおかつ的確な診断と内耳窓閉鎖術、瘻孔閉鎖術などで著明な治療効果が望める疾患であることが示された。

E. 結論

めまいを伴う遺伝性難聴（非症候性優勢遺伝性難聴 DFNA9）の病因遺伝子、COCH 遺伝子に関する分子生物学的・基礎的研究を進めることで、メニエール病や遅発性内リンパ水腫の臨床の現場で実際に役立つ成果が期待される。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Li L, Ikezono T, Watanabe A, Shindo S, Pawankar R, Yagi T: Expression of full-length Cochlin p63s is inner ear specific. *Auris Nasus Larynx*. 32(3): 219-23, 2005.
- ・ Ikezono T, Shindo S, Ishizaki M, Li L, Tomiyama S, Takumida M, Pawankar R, Watanabe A, Saito A, Yagi T: Expression of cochlin in the vestibular organ of rats. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 67(5): 252-8, 2005.
- ・ Robertson NG, Cremers CW, Huygen PL,

Ikezono T, Krastins B, Kremer H, Kuo SF, Liberman MC, Merchant SN, Miller CE, Nadol JB, Jr, Sarracino DA, Verhagen WI, Morton CC.: Cochlin immunostaining of inner ear pathologic deposits and proteomic analysis in DFNA9 deafness and vestibular dysfunction. Hum Mol Genet, 2006.

- 池園哲郎: 外リンパろうの診断マーカーとしての Cochlin-Tomoprotein(CTP). 臨床検査 49(11): 1259-1263, 2005.
- 池園哲郎: 「末梢前庭器から前庭神経核へ-最近の知見-」1.COCH 遺伝子とめまい. Equilib Res 64 (1) : 1-11, 2005.
- 池園哲郎: 聴力改善手術 7.外リンパろう. 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 77, No.(5): 162-173, 2005.
- 池園哲郎 メニエール病と外リンパ瘻 内耳窓閉鎖術で改善する慢性外リンパ瘻を見逃さないために めまい診療のコツと落とし穴 p30-31 中山書店 2005.5.30 発行
- 池園哲郎 良性発作性頭位めまい症 診療アップデート p132-135 日経メディカル編 日経BP社 2005.11.14 発行

2. 学会発表

- Ikezono T: Round table discussion "Treatment of Meniere's Disease" The importance of differential diagnosis of Meniere's disease, especially versus PLF. The 18th World Congress of the International Federation of Otorhinolaryngological Societies (IFOS) (2005.6.25-6.30, Rome, Italy)
- Ikezono T: Inner Ear Proteomics and its Application as a Novel diagnostic test for PLF -Impact on the treatment of inner ear diseases. Nippon Medical School-Soul National University Joint Meeting (2005.6.4, Tokyo, Japan)
- 池園哲郎 新藤晋 李麗淑 相田瑞恵 杉崎一樹 後藤裕一 馬場俊吉 八木聡明: 頭部

外傷と内耳障害. 第 106 回日本耳鼻咽喉科学会総会 (2005.5.19-21. 大阪)

- 池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑, 松田帆, 小泉康雄, 齋藤明彦, 馬場俊吉, 八木聡明. 本当にメニエール病か 慢性外リンパ瘻との鑑別診断. 第 2 回東京メニエール病カンファレンス (2005.6.11, 東京)
- 池園哲郎, 新藤晋, 李麗淑, 関根久遠, 八木聡明: CTP 検出法を臨床検査として確立するためのクオリティーコントロール. 第 63 回日本平衡神経科学会総会(2005.11.24-11.25, 東京)
- 新藤晋, 池園哲郎, 李麗淑, 八木聡明: 発生過程における Cochlin 発現の検討-ウェスタンブロッティングを用いて-. 第 63 回日本平衡神経科学会総会(2005.11.24-11.25, 東京)
- 加藤政利, 野原秀明, 緒方たつ子, 斉藤公一, 本間博, 新藤晋, 池園哲郎, 八木聡明: エアーカーリックテストの検討. 日本医科大学医学会 (2005. 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

国内出願中

発明の名称: 外リンパ瘻の検出方法

出願番号: 特願 2003-182860

出願日: 平成 15 年 6 月 26 日

出願人: 日本医科大学, 三菱化学株式会社

外国出願中

国際出願番号: PCT/JP03/08123

出願日: 2003 年 6 月 26 日

指定国: 全指定

特許出願

国内出願中

発明の名称: 眼振誘発装置

出願番号: 特願 2005-179515 号

出願日: 平成 17 年 6 月 20 日

出願人: 日本医科大学

研究要旨 高度難聴障害，高度平衡機能障害の人に対する新しい治療として，幹細胞移植治療に関し研究をおこなってきた．内耳に投与した幹細胞は各種神経栄養因子を放出するが，その量は内耳保護には必ずしも十分ではない．これらの幹細胞移植による内耳障害治療効果をさらに高めるべく，内耳に種々の栄養因子を投与して内耳障害を防ぐ方法も併用する必要がある．メニエール病などを含めた内耳障害の治療が困難な理由に，内耳への薬物投与の困難性が挙げられる．動物実験ではミニポンプを使用する方法やウイルスを薬物の担体として使用する方法があるが，いずれも内耳への侵襲という問題点もある．我々はこれまで生体吸収性徐放ゲルを用いた薬物投与方法を報告してきた．今回は，内耳保護薬物を用い，ゲルや高分子ポリマーを利用した内耳薬物投与方法と内耳障害保護への有効性を確認した．その結果，内耳保護効果があると考えられている神経栄養因子などを生体吸収性徐放ゲルなどを用い投与すると機能的，組織学的に内耳を保護する結果が得られた．

A. 研究目的

高度難聴障害，高度平衡機能障害の人に対する新しい治療として，幹細胞移植治療に関し研究をおこなってきた．幹細胞移植治療は障害を受けた内耳再生に有力な治療法と考えられるが，その一方幹細胞移植のみでは現時点では障害を受けた内耳を完全に再生することは困難である．これらの移植治療の補助となる治療法の開発も必要である．これまで動物実験の段階で，特に *in vitro* の系では内耳の感覚細胞の保護や再生に有用な薬物などは多種報告されている．しかし *in vivo* の系ではこれらの薬物を内耳に効果的に投与する方法は確立されていない．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．また実際の臨床応用を考えるに，逆に内耳の障害を助長する危険性もある．理想的には内耳に侵襲を与えず内耳保護に有用な薬物を投与するのが理想である．われわれはこれまで徐放性のハイドロゲルに内耳保護作用のある薬物を組み込み，内耳に薬物が投与できるかを研究してきた．今回は実際内耳保護効果があると考えられる薬物をこの徐放性ハイドロゲルに組み込み，内耳障害動物モデルに投与し，

内耳障害が軽減されるかを検討した．

B. 研究方法

内耳保護作用があると考えられる薬物として，BDNF (brain-derived neurotrophic factor)，IGF (insulin like growth factor)を用いた．ゲンタマイシンとエタクリン酸で内耳に障害を与えたモルモットを実験動物として用いた．動物に上記薬物で障害を与えた後，BDNF または IGF を組み込んだ徐放性ハイドロゲルをモルモットの正円窓に留置した．留置後7日後，14日後，21日後に動物を屠殺し，内耳を摘出し，コルチ器内の有毛細胞の障害の度合い，またラセン神経節細胞の障害の度合いをコントロール（内耳障害を与え，神経栄養因子を投与しなかった群）のものと比較検討した．なお，動物を屠殺する前に，聴覚機能検査を聴性脳幹反応（ABR: auditory brain stem response）または電気刺激聴性脳幹反応（EABR: electrically stimulated auditory brain stem response）にて検討した．

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．

C. 研究結果

徐放性ハイドロゲルハイドロゲルに BDNF 組

み込み内耳に投与すると、投与後 7 日、14 日、21 日の時点で内耳ラセン神経節細胞の障害はコントロールに比べ有意に減少した。これは蝸牛各回転を支配するラセン神経節細胞全てで同様の結果であった。また EABR の結果では、投与後 7 日、14 日、21 日の時点でコントロールに比べ閾値上昇が抑えられた。一方徐放性ハイドロゲルハイドロゲルに IGF 組み込み内耳に投与すると、投与後 7 日、14 日、21 日の時点で内耳有毛細胞の障害はコントロールに比べ有意に減少した。これは蝸牛全回転で同様の結果であった。また ABR の結果では、投与後 7 日、14 日、21 日の時点でコントロールに比べ閾値上昇が抑えられた。

D. 考察

内耳の各細胞を保護する可能性のある薬物はこれまでもいくつか報告されている。しかしこれまで内耳に薬物を投与する場合は絶えずその投与経路が問題であった。全身投与の際は、血液内耳関門の存在のため、有効に内耳に薬物が到達しない。また内耳への局所投与を行っても、ポンプなどの器具を使用する場合は内耳への侵襲が問題となり、結果的に内耳障害を助長する。今回我々は徐放性ハイドロゲルに薬物を組み込み、内耳へ薬物を投与した。その結果この薬物が内耳障害を保護することが組織学的、機能的に証明された。これにより内耳の有効に薬物を投与する方法が開発されたと考えられる。

E. 結論

BDNF、IGF などの神経栄養因子は内耳保護作用を有する。また徐放性ハイドロゲルは内耳に有効に薬物を投与する手段として有用である。これまで幹細胞移植により内耳再生を目指してきたが、内耳への有効な薬物投与方法が開発されたことにより障害を受けた内耳再生の可能性が高まるものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・伊藤壽一 内耳への新しい薬物投与方法 - 徐放性ドラッグデリバリーシステム - 耳鼻臨床 98,1-4, 2005
- ・伊藤壽一 内耳の再生医療 Drug Delivery System 20, 96-104, 2005

2. 学会発表

- ・ Ito J : Cell Therapy for Inner Ear Diseases. The 5th International Symposium Meniere's Disease & Inner Ear Homeostasis Disorders April 1, 2005 (Los Angeles, USA)
- ・ Ito J : A Novel Method to Inner Ear Drug Delivery - Experimental Study The 18th World Congress of International Federation of Otorhino Laryngological Societies June 30, 2005 (Rome, Italy)
- ・ Ito J : Local drug delivery to the cochlea by the biodegradable polymer and gel. 42nd Workshop on Inner Ear Biology Sept. 20, 2005 (Tubingen, Germany)
- ・ Ito J : Transplanting stem cells in rat/mouse IE(replacement therapy) The Mouse as an Instrument for Ear Research II Oct. 1, 2005 (Bar Harbour USA)
- ・ Ito J : Regeneration Medicine in the field of Otolaryngology The 25th Politzer Society Meeting Oct. 5, 2005 (Seoul, Korea)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべき点なし

研究要旨 めまいや動揺病の病態に関する研究，治療に関する研究として次の3つを行った。

①動揺病動物モデルである過重力負荷ラットの血漿 ACTH, corticosterone(CORT)値を測定し，血漿 ACTH, 血漿 CORT 値の上昇がみられストレス状態を反映しているものと考えられた。また，電気刺激あるいは温度刺激を加えた直後に採血を行い，血漿 AVP 値が上昇していることより，前庭刺激が AVP 神経系を賦活化していることがわかった。

②メニエール病確実例と聴神経腫瘍例の内リンパ嚢で，発現する遺伝子を網羅的に観察することが可能なDNAマイクロアレイ法を用いて解析した。その結果，メニエール病症例の内リンパ嚢では，その発現量が低下する遺伝子群が多数確認された。

③めまい患者を SSRI のひとつであるフルボキサミンを用いて治療した。SSRI はめまい患者に合併している精神疾患に作用し，めまいを軽減することが推察された。

A. 研究目的

ラットで過重力負荷あるいは前庭刺激（電気刺激と温度刺激）を加え，そのストレス状態を血漿 ACTH, corticosterone(CORT)値の変動で評価し，ヒトの末梢前庭障害や動揺病で起こる全身的なストレス反応の基礎実験を行う。

メニエール病確実例の内リンパ嚢に発現する多数の遺伝子の動態を，同時に網羅的に観察することが可能なDNAマイクロアレイ法を用いて解析し，メニエール病の遺伝的素因について検討を加える。

めまい患者に SSRI のひとつであるフルボキサミンを投与し，治療前後のめまいの自覚症状をアンケート法を用いてうつ／不安障害を Hospital Anxiety Depression Scale (HADS)を用いて評価し，器質疾患の有無とこれらの指標の変化を検討する。

B. 研究方法

①過重力負荷あるいは前庭刺激（電気刺激と温度刺激）を加え採血し，直ちに遠心分離し血漿を凍結保存した。血漿 ACTH 値は IRMA kit（三菱化学ヤトロン），血漿 CORT 値は RIA kit (Amersham)にて測定した。

②ヒト内リンパ嚢より total RNA の抽出を行った

後，電気泳動にて 18S rRNA および 28S rRNA の 2つのピークがあることを確認し，さらに cRNA を 1000~2000 倍に増幅した上で，2種類の Affymetrix 社製 Gene chip とのハイブリダイゼーションを行った。得られたデータは，解析ソフト Gene Spring を使用して処理を行った。

③めまい患者 60 人で，フルボキサミン 200mg を 8 週間投与し，その前後でめまいアンケート，HADS アンケート，ストレスホルモン（バゾプレッシン，コルチゾール）の測定を行った。60 人の内訳は器質疾患のある group I 30 例（メニエール病 14 例，前庭型メニエール病 2 例，前庭神経炎 3 例，遅発性内リンパ水腫 1 例，その他の末梢性めまい 10 例）と器質疾患を認めない Group II 30 例である。

C. D. 研究結果，考察

①過重力負荷によりラットの血漿 ACTH, 血漿 CORT 値が上昇した。また，前庭電気刺激により血漿 AVP が上昇した。4℃の前庭冷水刺激では血漿 AVP 値の有意な上昇，45℃の温水刺激では上昇傾向を認めた。

②今回の DNA マイクロアレイを用いた解析から，聴神経腫瘍症例の内リンパ嚢における各遺伝子の発現量を基準とすると，メニエール病症例の内リ

ンパ囊では、その遺伝子発現量が低下する遺伝子群が多数確認された。逆に、遺伝子発現量が増加する遺伝子群も確認されたが、その数は比較的少なかった。

③治療前後ともに HADS と自覚症状の強さに相関があり、HADS 低下群ではめまいも改善し、逆にめまい改善群では HADS も低下していることから、めまい疾患と精神疾患の間には両方向性の (bidirectional な) 関連があり、いわゆる vicious cycle (悪循環) を形成するものと思われる。ストレスはめまいに関連する精神疾患の発症に大きく関わっていると想像されるが、めまいの改善した群でもストレスホルモンは低下せず、めまい疾患による症状のみがストレス源になっているわけではないと思われる。

E. 結論

①本実験で見られた血漿 ACTH, 血漿 CORT 値の上昇は、動揺病によって惹起されたストレス状態を反映していると考えられる。前庭電気刺激では刺激電流の増加に応じて、また温度刺激ではより強い冷水刺激でラットの血漿 AVP 値が上昇していることより、前庭刺激が AVP 神経系を賦活化していることがわかった。

②聴神経腫瘍例に比べるとメニエール病例の内リンパ囊では、その遺伝子発現量が低下する遺伝子群が多数確認された。これらの遺伝子群の内リンパ囊における質的・量的変化が、内リンパ囊における水・イオン輸送における機能的変化を惹起することで、内リンパ水腫の形成やメニエール病発症の遺伝的素因となる可能性が推察された。

③めまいを訴える患者では器質疾患の有無にかかわらず精神疾患を合併している比率が高く、合併する精神疾患がめまい治療の妨げになっている場合が多い。これは、めまい疾患と精神疾患の間には両方向性の関連(vicious cycle)があるためであり、SSRI は精神疾患に作用しこの悪循環を断ち切ることにより、めまいを軽減する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・花本 敦, 北原 紘, 堀井 新, 久保 武. 一侧メニエール病の内リンパ囊開放術後, 対側耳に発症した突発性難聴例. *Equilibrium Res.* 64: 83-87, 2005
- ・北原 紘, 久保 武. 総説: 前庭神経系の化学的神経機能解剖. *Equilibrium Res.* 64: 123-134, 2005.
- ・北原 紘, 三代康雄, 久保 武. 難治性メニエール病に対する手術治療—内リンパ囊高濃度ステロイド挿入術を中心に— *頭頸部外科* 15: 11-15, 2005
- ・堀井 新. 難治性 Meniere 病に対するゲンタマイシン鼓室内投与. めまい診療のコツと落とし穴. pp124-125, 高橋正紘編, 中山書店 2005
- ・Kitahara T, Takeda N, Nishiike S, Okumura S, Kubo T. Prognosis of inner ear periphery and central vestibular plasticity in sudden deafness with vertigo. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114: 786-791, 2005.
- ・Doi K, Sato T, Kuramasu T, Hibino H, Kitahara T, Horii A, Matsushiro N, Fuse Y, Kubo T. Meniere's disease is associated with single nucleotide polymorphisms in the human potassium channel genes, KCNE1 and KCNE3. *ORL* 67: 289-93, 2005.
- ・Kubo T, Kitahara T, Horii A, Oshima K, Yasuoka E. Two kinds of drug delivery systems applied for Meniere's patients and deafened animal model. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders proceedings, 18-20, 2005.
- ・Kitahara T, Mishiro Y, Okumura S, Kubo T. Endolymphatic sac drainage and steroid-instillation surgery: long-term results of 50 operations. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders proceedings, 234-235, 2005.

- ・ Doi K, Sato T, Kuramasu T, Nishinmura M, Sugiyama Y, Nishiike S, Kubo T. Early effects of the endolymphatic sac-mastoid shunt operation on the dominant-SP/AP ratio in Meniere's disease. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders proceedings, 248-249, 2005.
 - ・ Doi K, Sato T, Kuramasu T, Hibino H, Kitahara T, Matsushiro N, Fuse Y, Kubo T. Single nucleotide polymorphisms (SNP) analysis of gene encoding KCNE potassium channels in Meniere's disease. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders proceedings, 302-303, 2005.
2. 学会発表
- ・ 堀井 新, 北原 糺, 久保 武. 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: 聴力に対する影響. 第 64 回めまい平衡医学会総会 (平成 17 年 11 月 24, 25 日東京)
 - ・ 北原 糺, 堀井 新, 久保 武, 武田憲昭, 肥塚 泉, 西池季隆, 宇野敦彦, 荻野 仁. 前庭型メニエール病の臨床的検討と病態に関する考察. 第 64 回めまい平衡医学会総会 (平成 17 年 11 月 24, 25 日東京)
 - ・ 三谷健二, 堀井 新, 増村千佐子, 久保 武. 重力変化による空間認知障害と海馬 CA1 領域における遺伝子発現について. 第 64 回めまい平衡医学会総会 (平成 17 年 11 月 24, 25 日東京)
 - ・ 土井勝美, 佐藤 崇, 倉増俊宏, 西村 洋, 北原 糺, 久保 武. メニエール病の遺伝子解析—KCNE カリウムチャネル遺伝子上の SNP と PHENOTYPE の相関—. 第 64 回めまい平衡医学会総会 (平成 17 年 11 月 24, 25 日東京)
 - ・ Kubo T, Kitahara T, Oshima K. Two kinds of drug delivery systems applied for Meniere's patients and deafened animal model. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders in Los Angeles, April, 2005
 - ・ Doi K, Sato T, Kuramasu T, Hibino H, Kitahara T, Matsushiro N, Fuse Y, Kubo T. Single nucleotide polymorphisms (SNP) analysis of gene encoding KCNE potassium channels in Meniere's disease. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders in Los Angeles, April, 2005
 - ・ Doi K, Sato T, Kuramasu T, Nishinmura M, Sugiyama Y, Nishiike S, Kubo T. Early effects of the endolymphatic sac-mastoid shunt operation on the dominant-SP/AP ratio in Meniere's disease. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders in Los Angeles, April, 2005
 - ・ Kitahara T, Mishiro Y, Okumura S, Kubo T. Endolymphatic sac drainage and steroid-instillation surgery: long-term results of 50 operations. 5th international symposium Meniere's disease & inner ear homeostasis disorders in Los Angeles, April, 2005
 - ・ Kitahara T, Horii A, Mishiro Y, Kondoh K, Okumura S, Kubo T. Changes in the plasma vasopressin level after endolymphatic sac drainage and steroid-instillation surgery. 25th Politzer Society Meeting in Seoul, October, 2005
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

研究要旨 メニエール病と診断された49例と対照100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。POMSスコアによるメニエール病患者のストレスの程度と自覚症状とを比較した。HSP70遺伝子のプロモーター領域のSNPはメニエール病に深く関与すると考えられた。良性発作性頭位めまい症(BPPV)における半規管機能と病態について実験した。摘出後半規管に振子様用回転を加え、後半規管神経活動電位を記録した。半規管内に耳石塊を挿入し、半規管結石症とクプラ結石症モデルを作成した。両モデルにおいて回転刺激に対する電位は抑制されたが、クプラ結石症において抑制の程度は著明であった。また、抑制度は半規管内の耳石塊の大きさに比例していた。ゲンタマイシン内耳内注入による半規管クプラと感覚上皮の変化を検索した。ゲンタマイシンにより両者とも種々の程度に障害された。感覚上皮障害が高度でもクプラの障害が軽度の場合があり、クプラの障害への支持細胞の関与が推定された。このようなクプラの変化がある種のBPPVの病因になりうると考察した。

A. 研究目的

- 1) メニエール病において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) 良性発作性頭位めまい症(BPPV)における半規管機能とクプラの形態を検索し、その病態生理を明らかにする。

B. 研究方法

- 1) メニエール病と診断された49例と対照100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。POMSスコアによるメニエール病患者のストレスの程度と自覚症状とを比較した。同時にHSPA1A遺伝子のSNP解析を行った。
- 2) 両生類摘出後半規管に振子様用回転刺激を加え、発生する活動電位を半規管結石症、クプラ結石症両モデルにおいて測定した。
- 3) 内耳にゲンタマイシンを注入し、惹起されるクプラと膨大部感覚上皮の形態学的変化を観察した。

C. 研究結果

1) HSPA1A遺伝子の5'上流、すなわち発現調節領域に相当する部位のSNP解析を行ったところ、HSP70遺伝子のプロモーター領域である-110, 190にSNPがみられた。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) 半規管結石症とクプラ結石症両モデルにおいて回転刺激に対する電位は抑制されたが、クプラ結石症において抑制の程度は著明であった。また、抑制度は半規管内の耳石塊の大きさに比例していた。

3) ゲンタマイシンによる半規管クプラと感覚上皮の観察では、ゲンタマイシンにより両者とも種々の程度に障害された。感覚上皮障害が高度のものほどクプラの障害も高度になることが多かった。一方、感覚上皮障害が高度でもクプラの障害が軽度の場合があった。

D. 考察

1) HSP70の遺伝子はHSPA1A, HSPA1B, HSPA1Lの3つの遺伝子から構成されており、今回、HSPA1A遺伝子の5'上流にあたる部位のSNP解析を行ったところ、健常者と比べて有意に多い

SNP190Cが見出された。HSPA1A遺伝子の190Cはメニエール病の発症に関与する一因であると考えられる。しかし、HSPA1A遺伝子の190Cは、めまい発作や聴力などの臨床所見において有意差がなかったため、メニエール病の重症度との関連は明らかにならなかった。

HSPは様々なストレスによって誘導されるタンパクである。そしてHSPは細胞が様々なストレスに曝された時にストレス応答を引き起こし、ストレスによって障害された細胞を修復する働きがある。HSPA1A遺伝子のSNP190Cがあることから、HSP70の発現量に異常が起こり、ストレス刺激に対するストレス応答が適切になされず細胞が障害されることが、メニエール病の発症の一因になっていると推察した。

2) BPPVのモデルにおいて回転刺激に対する反応が低下したことは、BPPVの温度眼振反応やVORが低下するとの臨床所見を裏付けるものとなった。反応低下の程度は半規管内に介在する耳石塊の量に依存することから、これがめまい症状や治癒率を左右する要因となることがうかがわれた。

3) ゲンタマイシンによってクプラが容易に形態的变化をきたすことから、内耳の環境の変化、感覚細胞や支持細胞の障害がクプラの障害を起こし、ある種の内耳性めまい、とくにBPPVを発症させている可能性が示唆された。

E. 結論

1) HSP70遺伝子のプロモーター領域のSNPはメニエール病の発症に関与すると考えられた。

2) BPPVにおける半規管機能低下にクプラ結石症や半規管結石症が関与し、クプラ自体の形態的变化がある種のBPPVを引き起こす可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ 鈴木 衛: 短期間で画像所見が変化した小脳腫瘍例. 高橋正紘編 めまい診療のコツと落とし穴 (中山書店) 2005: 66-67
- ・ 鈴木 衛: BPPV理学療法後のめまいへの留意点. 高橋正紘編 めまい診療のコツと落とし穴 (中山書店) 2005: 112
- ・ Takenouchi T, Suzuki M, Furuya M, Otsuka K: Contribution of endolymphatic fluid shift to caloric response in plugged semicircular canals. ORL 2005, 67: 266-271
- ・ 鈴木 衛: 良性発作性頭位性めまい症の病態と治療. 日本医師会雑誌 2005, 134: 1477-1480
- ・ 大塚康司, 鈴木 衛, 古屋正由, 小川恭生, 萩原 晃, 竹之内 剛: 微細刺激によるクプラの偏移の観察. Equilibrium Research 2005, 64: 100-105
- ・ 北島尚治, 鈴木 衛: BPPVの理学療法. J O H N S 2005, 21: 1107-1109

2. 学会発表

- ・ Yukawa K, Suzuki M, Hagiwara A, et al: Statistics on vestibular emergencies, peripheral and central disorders. Round Table Discussion: Vestibular emergencies. XVII IFOS World Congress. 2005年6月, Rome
- ・ Otsuka K, Suzuki M, Furuya T, Inagaki T, et al: Model experiment of semicircular canal function of BPPV by using sinusoidal stimuli. XVII IFOS World Congress. 2005年6月, Rome
- ・ Suzuki M: Physiological properties of BPPV studied using models of semicircular canal and utricle. International Symposium in Otolaryngology. 2005年7月, Venice
- ・ 大塚康司, 鈴木 衛, 稲垣太郎, 北島尚治, 竹之内 剛, 小川恭生, 長谷川剛: BPPVの病態と半規管の反応性に関するモデル実験. 第106回日本耳鼻咽喉科学会総会 2005年5月, 大阪市
- ・ 河口幸江, 萩原 晃, 林 賢, 古瀬寛子, 鈴木

- 衛：メニエール病患者における HSP70 の遺伝子解析. 第 15 回日本耳科学会総会 2005 年 10 月, 大阪市
- ・大塚康司: 実験的 B P P V よりみた難治例の病態. シンポジウム「難治性 B P P V への対応」第 64 回日本めまい平衡医学会総会 2005 年 11 月, 東京
 - ・金林秀則, 小川恭生, 鈴木 衛: 3 次元モデルで計測した半規管の湾曲について. 第 64 回日本めまい平衡医学会総会 2005 年 11 月, 東京
 - ・長谷川剛, 大塚康司, 稲垣太郎, 許斐氏元, 清水 顕, 鈴木 衛: ゲンタマイシンによるクプ

ラと半規管感覚上皮の形態学的変化. 第 64 回日本めまい平衡医学会総会 2005 年 11 月, 東京

- ・北島尚治, 市村彰英, 萩原 晃, 小川恭生, 稲垣太郎, 許斐氏元, 鈴木 衛: 外側半規管型 B P P V 症例における頭位変換療法後の経過について. 第 64 回日本めまい平衡医学会総会 2005 年 11 月, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

メニエール病の病因と治療に関する研究

分担研究者 高橋 正紘 東海大学教授

研究要旨 1)メニエール病と低音障害型感音難聴の違いを調べた。性、年齢、日常の過ごし方で違いはないが、メニエール病で罹病期間がより長く、進行例の割合がより高かった。地域住民に比べ両群ともに熱中行動が強いが、メニエール病は勝気、自己抑制が強く、低音障害は時間切迫行動が強かった。いずれも奉仕行動に対する報酬不足がストレスの実体であり、メニエール病は生得的要因が強く、低音障害は環境的要因が強いといえる。2)次年度より関連施設で、メニエール病患者のストレス調査を実施する予定である。これまでの調査内容、ストレス調査の目的、調査すべき内容、留意すべき点を考察した。ストレス源の調査よりも、行動に当たっての対処様式（行動特性）の調査が重要であること、専門家（精神科医）の意見を入れて調査すること、人口動態的事象の調査を同時に実施することが確認された。3)「メニエール病診断の手引き」が現状にそぐわないことを取り上げ、その理由、社会状況が求めるガイドラインの備えるべき要件を考察した。4) 平衡制御の仮説を検証するために実施した、1Gと μ Gにおけるコリオリ刺激実験の解析結果を報告した。いわゆる前庭反射が脳内に再現される外界座標を介した反応であることが立証された。

A. 研究目的

1) 特発性内リンパ水腫には、メニエール病とめまい発作を欠く低音障害型感音難聴がある。両疾患の何が共通で何が異なるかは、いまだ不明の部分が多い。データベースに登録されている資料から、これらを調べた。

2) メニエール病の発症とストレスの関わりについて、これまでどのような調査が実施され、何が判明しているか、われわれの調査から何が判明したか、今後多施設で実施する予定のストレス調査はどうあるべきかを検討した。

3) 平成12年度にメニエール病の診断基準の見直しを提案したが、大勢は反対であった。今回改めて、「診断の手引き」の問題点、時代が要請するガイドラインの内容を提示した。

4) μ Gにおけるコリオリ刺激実験の結果の一部を平成14、15年度で報告してきたが、全ての記録の解析が終了したので報告した。実験の目的は「脳内の外界基準（座標）が姿勢や眼球運動、移動感覚を画一的に制御する」を μ Gで立証することにある。

B. 研究方法

1) データベースに登録されている特発性内リンパ水腫患者で3ヶ月以上フォローされたメニエール病186名（男性62名、女性124名）、低音障害型感音難聴145名（男性58名、女性87名）である。両群の発症年齢、罹病期間、病態進行度と聴力予後、ライフスタイルのアンケート調査（日常の過ごし方、行動特性）の結果を比較した。これらから総合的に、メニエール病と低音障害型難聴の類似点、相違点を明らかにした。

2) まず次の事項を明らかにした。①1974年の厚生省の疫学調査で調べられた項目、②web searchで過去50年余のメニエール病の病因論文の内容を調査し、ストレス研究がどの程度実施されてきたか、③我々が厚労省研究班で実施してきたアンケート調査の内容、④これらの調査から判明した事実。これらの資料を元に、ストレス調査のあり方を模索した。最終的にはこの方面の専門家（精神科医）の意見を入れ、多施設のストレス調査の具体的内容の試案を提示した。

3) 厚生省研究班で1974年に「手引き」が作られた経緯を明らかにし、現時点でのメニエール病の予後、治療方法の変遷を明らかにした。これらの資料とわれわれの最新の知見を元に、「手引

き」の問題点とこれに代わるガイドラインの備えるべき要点を示した。

4) 実験記録の対象は従来の報告と同様のものであるが、新たに次の事項を報告した。①被験者5名全てについて、1Gと μ Gの直線加速度記録から刺激開始1秒間の身体移動距離を求める、②被験者5名全てについて、赤外線 CCD カメラによるビデオ記録から眼球運動の水平、垂直、回旋成分を再現し(3D解析)、最大眼球緩徐相速度を求める、③コリオリ刺激に対する1Gと μ Gの身体移動所見と眼球運動所見から、前庭反射に占める外界知覚の役割を解明する。

C. 研究結果

1) メニエール病と低音障害型難聴の、男女比はそれぞれ1:2.0と1:1.5、発症年齢は16-72歳(平均45歳)と15-75歳(平均44歳)、罹病期間は3ヶ月から24年5ヶ月(平均4年8ヶ月)と3ヶ月から14年1ヶ月(平均2年3ヶ月)であった。性差や発症年齢に両群で違いはないが、罹病期間はメニエール病がはるかに長かった。聴力正常と低音障害が占める割合は、メニエール病と低音障害型難聴の割合は発症1年以内で77.3%と92.7%、1-3年で53.8%と72.7%、3-10年で38.1%と68.2%であった。低音障害型難聴がメニエール病よりも軽症例の多いことがわかる。

ライフスタイルのアンケート調査の日常の過ごし方では、両群で明らかな違いはなかった。行動特性が地域住民と危険率1%で有意差を示す項目の割合は、男女で少し異なるがメニエール病で37.5%-58.3%、低音障害型難聴で25%-29.2%と大きな違いがあった。メニエール病では自己抑制行動と熱中行動、勝気が強いのにに対し、低音障害型難聴では熱中行動と時間切迫行動が強く、自己抑制行動は弱かった。

2) 1974年の疫学調査のストレス関連項目としては、発症誘因と発症時の動作、生活環境、宮城音弥の性格調査が実施されている。精神的、肉体的疲労が発症に関わり、患者は几帳面、神経質な傾向があるとされた。病因に関連する論文919編が過去50年余に報告されたが、病因としてス

トレスを調査した論文はほとんどない。われわれは過去8年間に、ライフスタイルのアンケート調査(日常の過ごし方8項目、行動特性24項目、ストレス源22項目、気分発散手段11項目)で患者群と地域住民群を比較し、患者群で発症とストレスとの関わり、発症や増悪要因となった事象を調査してきた。これらより、患者の日常生活は対照群と違わないこと、行動特性が特異なこと、患者の80%が発症にストレスの関わりを自覚していることが判明した。

総合すると、メニエール病患者は周囲の期待に応えるために自分を抑えて頑張る像が浮かぶ。この行動に対し十分な報酬が与えられないことがストレスの実体と示唆された。これらの結果から、ストレス調査では日常のストレス事象ではなく、行動に当たっての対処様式(行動特性)の調査が重要であることがわかる。専門家(精神科医)のアンケート調査の具体案もこれに沿った内容であった。

3) 「手引き」は1974年当時、全国規模の疫学調査のために作成されたものである。その後の調査によっても、メニエール病の症状や予後が多様なことが確認され、治療方法も変遷してきたが、治療成績の向上は見られない。治癒の可能性は発症早期の再発予防以外にはないが、病因が不明のため再発予防の決め手を欠く。幸い、最近の調査から、患者の日常生活に有害要因のあることが示唆されている。これらを総合すると、「手引き」に代わるガイドラインでは、次の事項を盛り込むべきであろう。①耳鳴、耳閉塞感、音の不快、難聴などが突然発症し、しばしば回転性めまいを伴う。②発症早期、聴力検査で低(中)音部の感音難聴を示し、他の疾患を否定できる。③初期は数日-数週で軽快するが、症状の反復や長期化で難治となる。④日常行動や習慣がストレスを生み、発症に関わる可能性がある。⑤発症早期に、有害要因に適切に対処すれば、再発や進行を予防できる可能性がある。

4) 100度/秒右回転中の前屈(コリオリ刺激)で、1Gでは上体が慣性入力方向(左方)に1秒間に約10cm移動したが、 μ Gでは慣性力方向(右

方)に約4cm移動した。移動感覚も μG では例外なく著しく減弱した。眼球運動は1Gと μG で類似した反応を示し、慣性入力に忠実な反応が得られた。水平、垂直、回旋成分それぞれの最大眼球緩徐相速度にも違いは見られず、両条件とも眼球回転軸で最大緩徐相速度36度/秒であった。これらの結果から、 μG では周囲外界を対象に制御される現象すなわち、姿勢や移動感覚は消失すること、眼球は外界基準が消失しても頭部枠基準を元に慣性入力が出力されることが判明した。

D. 考察

今回の調査から、低音障害型難聴はメニエール病と比較し、患者の性や発症年齢に違いはないが、軽症例が多く、予後良好なことが確認された。さらに行動特性にも違いのあり、メニエール病が勝気や我慢強さなど生得的な要因が強いのに対し、低音障害型難聴は時間切迫行動など環境的要因の強いことが示唆された。メニエール病患者でよりストレスが蓄積しやすいこと、低音障害型難聴は一時的な多忙など環境的要因に影響されやすいことがうかがわれる。今回の調査から、両群で奉仕行動に対する報酬不足の共通していることが注目される。低音障害型難聴はメニエール病の軽症群と理解することもできる。

次年度からメニエール病患者でストレス調査が予定されている。いかなる方針で調査を実施するかは難しい問題である。研究者間でストレスの解釈が異なるためである。筆者らも研究の当初は睡眠不足や多忙、対人関係トラブルなどがストレスと理解していた。これに沿ってアンケート調査でもストレス事象の多寡や程度を調べたが、患者群と対照群で大きな違いはなかった。しかし行動特性では大きな違いが発見され、ストレスを生むのが行動に当たったの対処様式であることを裏付けた。この方面の専門家の意見もこの見解であり、今後のストレス調査の内容もこれに沿ったものになる予定である。今後、対照群をいかに選定調査するか、他にどのような項目を平行して調査すべきか、などの課題が残る。

姿勢や眼球運動の制御は従来、複数のニューロ

ンを介する反射系を上位中枢が修飾することで達成される、と考えられてきた。しかし、脳内に外界基準を想定すると、空間座標から身体座標への画一的な座標変換で、能動制御と受動制御を単純に説明できることが判明した。脳内の外界座標は仮説の域を出ないが、もし重力軸を座標Z軸として利用しているのであれば、無重力では外界基準が消失し、姿勢や眼球運動の制御が異なる可能性がある。この仮説を立証するために、同一装置・刺激条件で1Gと μG で実験を行った。この結果、 μG では姿勢は慣性入力(前庭刺激)に反応せず、眼球運動は反応する、という明快な結果が得られた。姿勢と眼球運動の乖離は、前者が外界空間に対し制御されるので、外界基準の消失で消失するが、後者は大部分頭部内の眼球運動で制御されるので、頭部基準の有効な μG では維持される、と説明できる。

E. 結論

1) 種々の調査から、低音障害型感音難聴はメニエール病の軽症型と考えられる。行動特性の結果はメニエール病がより生得的要因が強く、低音障害型難聴が環境的要因の強いことを示唆している。

2) ストレスは、日常の表面的なストレス事象で生まれるのではなく、行動に当たったの対処様式(行動特性)から生まれる、ことが確認された。ストレス調査に当たっては、患者群と対照群でこれらの内容ならびに人口動態的項目を調べることになる。

3) 1Gと μG で100度/秒中のコリオリ刺激(前庭刺激)に対する身体移動方向と移動距離、最大眼緩徐相速度を報告した。 μG では慣性入力に対する姿勢と移動感覚が消失し、眼球運動は1Gと同様に維持された。これらは慣性入力外界基準を介して出力されることを立証した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Onuki J, Takahashi M, Odagiri K, Wada R, Sato R. Comparative study of the daily lifestyle of patients with Meniere's disease and controls. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2005;114:927-933.
- ・ Takahashi M, Odagiri K, Sato R, Wada R, Onuki J. Personal factors involved in onset or progression of Meniere's disease and low-tone sensorineural hearing loss. *ORL* 2005;67:300-304.
- ・ 高橋正紘. 身体平衡における視覚と前庭覚の統合. *Vision* 2005;17:11-22.
- ・ 高橋正紘. めまいとストレス. *日本医師会雑誌* 2005;134:1467-1470.

2. 学会発表

- ・ 小田桐恭子, 高橋正紘, 佐藤梨里子, 和田涼子. 生活指導構造化による内リンパ水腫患者治療効果の試み. 第106回日耳鼻 2005.5.
- ・ 和田涼子, 高橋正紘, 小田桐恭子, 佐藤梨里子. 内リンパ水腫群と対照群の性, 年齢をそろえた比較. 第106回日耳鼻 2005.5.
- ・ 和田涼子, 高橋正紘, 小田桐恭子, 佐藤梨里子. メニエール病と低音障害型感音難聴の違い—予後と行動特性. 第15回日本耳科学会 2005.10.
- ・ 高橋正紘, 和田涼子, 小田桐恭子, 佐藤梨里子. 第15回耳科学会 2005.10.
- ・ 高橋正紘, 小田桐恭子, 和田涼子, 佐藤梨里子, 関根基樹. 生活指導によるメニエール病の治療. 第64回日本めまい平衡医学会 2005.11.
- ・ 和田涼子, 高橋正紘, 小田桐恭子, 佐藤梨里子, 関根基樹. 生活指導によるメニエール病患者のめ

まい, 聴力の予後. 第64回日本めまい平衡医学会 2005.11.

- ・ 小田桐恭子, 高橋正紘, 和田涼子, 佐藤梨里子, 関根基樹. メニエール病発症の社会的背景—地域住民の男女間, 世代間の比較. 第64回日本めまい平衡医学会 2005.11.
- ・ 佐藤梨里子, 高橋正紘, 小田桐恭子, 和田涼子, 関根基樹. メニエール病の発症要因としての報酬不足. 第64回日本めまい平衡医学会 2005.11.
- ・ Takahashi M, Sekine M. Posture and gait are easily changed to ataxic in normal subjects. XVIIth Conference of International Society for Postural and Gait Research. 2005.5-6. Marseille.
- ・ Takahashi M, Sekine M. Posture and gait are skillfully controlled through a uniform casting in spatial framework. XVIIth Conference of International Society for Postural and Gait Research. 2005.5-6. Marseille.
- ・ Takahashi M, Sekine M. Uniform regulation of posture, gait, and eye movement through perception of the outer world. Motor Control Conference MCC 2005.9. Sofia.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究要旨 メニエール病の病態の解明と新しい治療薬剤の開発を目的として、内耳での侵害受容体の局在ならびに抗酸化剤の臨床応用について検討した。その結果、内耳には TRPV1 ならびに TRPV4 が存在し、感覚細胞の興奮の調節や内耳での浸透圧の調節に関与することが明らかとなった。また、抗酸化剤による新しい治療はメニエール病の治療に有効であり、これまでの治療に追加する形で、作用機序の異なる複数の抗酸化剤を併用する形での使用が望ましいことが明らかとなった。

A. 研究目的

メニエール病の病態の解明と新しい治療法の開発を目的に、基礎的には侵害受容体(TRPV)の内耳での局在を明らかにし、その機能についての検討を行なった。また、臨床的には抗酸化剤のメニエール病に対する治療効果のまとめを行い、抗酸化剤の有効性、使用方法、今後の展開について検討した。

B. 研究方法

1) モルモット内耳での TRPV1, TRPV4 の局在
プライエル反射正常の成熟、ハートレー系モルモット（体重 250-300g）をネンブタールによる深麻酔下に 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、断頭、蝸牛、末梢前庭器、内リンパ嚢を摘出した。試料は 1.5% Triton X-100 にて処理した後、抗 TRPV1 抗体（トランスジェニック, (株)）、抗 TRPV4 抗体（Alomone Labs Ltd）を用いて、LSAB 法により免疫染色を行い JB-4 にて包埋後、4 μ m の厚さで切片を作製し顕微鏡にて観察した。

低浸透圧刺激による細胞内カルシウムの変化について、対象には TRPV4 の発現が確認された血管条を用い、5 μ g/ml の fluo4-AM を 37 $^{\circ}$ C で 45 分間ローディングし、低浸透圧刺激による細胞内カルシウム濃度の変化を経時的に蛍光顕微鏡にて観察した。

2) 抗酸化剤によるメニエール病の治療

今回、対象とした疾患はメニエール病、老人性難聴、シスプラチン難聴、突発性難聴とした。使用した抗酸化剤は、レバミピド（ムコスタ $\text{\textcircled{R}}$ ）

300mg/日、ビタミン C（シナール $\text{\textcircled{R}}$ ）600mg/日、グルタチオン（タチオン $\text{\textcircled{R}}$ ）600mg/日、ポラプレジック（プロマック $\text{\textcircled{R}}$ ）150mg/日、などであり、これらを症例に応じて原則として 8 週間以上経口投与した。メニエール病、老人性難聴ならびにシスプラチン難聴に対する成績はすでに報告したものをもとに検討した。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。

C. 研究結果

1) モルモット内耳での TRPV1, TRPV4 の局在
TRPV1 の発現はコルチ器では内外有毛細胞、支持細胞、蝸牛神経節細胞に認められたが、血管条での発現は殆ど認められなかった。前庭器では感覚細胞、前庭神経節細胞に発現が認められ、移行上皮、暗細胞での発現は弱く、前庭支持細胞、内リンパ嚢では殆ど認められなかった。

TRPV4 の発現はコルチ器では内外有毛細胞、支持細胞で発現が認められ、加えて血管条でも強い発現が認められた。前庭器では感覚細胞に加えて、前庭神経節細胞のほか、移行上皮、暗細胞、内リンパ嚢上皮細胞で強い発現が認められた。

血管条のカルシウム濃度は低浸透圧刺激により経時的に上昇し、40-60 秒後にピークに達した。

2) 抗酸化剤によるメニエール病の治療

①抗酸化剤の治療効果

難治性、すなわち通常の内服治療によりコントロール不良であったメニエール病症例の検討で 1 年経過した時点でめまいは著明改善：16/25、改