

NEUROSYSTEMS

IQ-ArfGEF/BRAG1 is associated with synaptic ribbons in the mouse retina

Osamu Katsumata,¹ Naoki Ohara,¹ Hideaki Tamaki,¹ Tomoko Niimura,¹ Hideaki Naganuma,² Masahiko Watanabe³ and Hiroyuki Sakagami¹

¹Department of Anatomy, Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan

²Department of Otorhinolaryngology, Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Kanagawa 228-8555, Japan

³Department of Anatomy, Hokkaido University School of Medicine, Sapporo 060-8638, Japan

Keywords: ADP ribosylation factor, guanine nucleotide exchange factor, photoreceptor, retina, ribbon synapse

Abstract

IQ-ArfGEF/BRAG1 is a guanine nucleotide exchange factor for ADP ribosylation factors (Arfs), which are implicated in membrane trafficking and actin cytoskeleton dynamics. In this study, we examined the immunohistochemical localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the adult mouse retina using light and electron microscopy. IQ-ArfGEF/BRAG1 was distributed in a punctate manner and colocalized well with RIBEYE in both the outer and inner plexiform layers. Immunoelectron microscopic analysis showed that IQ-ArfGEF/BRAG1 was localized at the synaptic ribbons of photoreceptors. When heterologously expressed in HeLa cells, IQ-ArfGEF/BRAG1 was recruited to RIBEYE-containing clusters and formed an immunoprecipitable complex with RIBEYE. Furthermore, immunoprecipitation analysis showed that anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 antibody efficiently pulled down RIBEYE from retinal lysates. These findings indicate that IQ-ArfGEF/BRAG1 is a novel component of retinal synaptic ribbons and forms a protein complex with RIBEYE.

Introduction

The retina contains ribbon synapses that are specialized for the tonic release of neurotransmitters, a process mediated by continuous exocytosis of synaptic vesicles in response to graded changes in the presynaptic membrane potential (Parsons & Sterling, 2003; Sterling & Matthews, 2005; tom Dieck & Brandstatter, 2006). In the outer plexiform layer (OPL), photoreceptors make ribbon synapses with dendrites of bipolar cells and processes of horizontal cells, while bipolar cells make ribbon synapses with postsynaptic ganglion cells and amacrine cells in the inner plexiform layer (IPL). The anatomical hallmark of ribbon synapses is the presence of osminophilic plate-like structures, namely synaptic ribbons. They are located perpendicularly to the plasma membrane of presynaptic active zones and tether numerous synaptic vesicles (Rao-Mirotnik *et al.*, 1995). Recently, several ribbon-associated proteins have been identified, including KIF3A (Muresan *et al.*, 1999), RIM1 (Wang *et al.*, 1997), Bassoon (Brandstatter *et al.*, 1999), Piccolo (Dick *et al.*, 2001), RIBEYE (Schmitz *et al.*, 2000) and CtBP1 (COOH-terminal binding protein 1; tom Dieck *et al.*, 2005).

Small GTP-binding proteins of the ADP ribosylation factor (Arf) family function as molecular switches by cycling between GTP-bound and GDP-bound states, which are tightly regulated by two regulatory proteins: guanine nucleotide exchange factors (GEF),

which catalyse the exchange of GDP for GTP, and GTPase-activating proteins (GAP), which trigger the hydrolysis of GTP to GDP (D'Souza-Schorey & Chavrier, 2006; Casanova, 2007; Gillingham & Munro, 2007). Among the six Arf members (Arf1–6), the most intensively studied are Arf1 and Arf6: Arf1 regulates secretory membrane transport between the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum and between Golgi cisternae, while Arf6 regulates endocytotic and recycling membrane transport and the cortical actin cytoskeleton.

BRAG1 (brefeldin A-resistant ArfGEF1), also known as IQSEC2, is a member of the BRAG family of ArfGEF and was originally identified in the postsynaptic density (PSD) fraction by mass spectrometry (Walikonis *et al.*, 2000; Jordan *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2006). We have independently cloned its mouse counterpart by homology screening with synArfGEF, another member of the BRAG family (Inaba *et al.*, 2004), as bait (Sakagami *et al.*, 2008). We refer to it as IQ-ArfGEF/BRAG1 from now on. IQ-ArfGEF/BRAG1 is a multidomain protein composed of N-terminal coiled coil and IQ-like motifs, central Sec7 and pleckstrin homology (PH) domains, a C-terminal proline-rich sequence, and a type I PDZ (PSD-95/discs large/zona occludens-1)-binding motif (Murphy *et al.*, 2006; Sakagami *et al.*, 2008). In the rodent brain, IQ-ArfGEF/BRAG1 is exclusively localized at the PSD and forms a protein complex with *N*-methyl-D-aspartate-type glutamate receptors (NMDAR) possibly by interacting directly with PSD-95 and insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53 kDa (IRSp53; Dosemeci *et al.*, 2007; Sakagami *et al.*, 2008; Sanda *et al.*, 2009). It has been

Correspondence: Dr H. Sakagami, as above.
E-mail: sakagami@med.kitasato-u.ac.jp

Received 11 March 2009, revised 13 August 2009, accepted 15 August 2009

shown to act on Arf1 and Arf6 by *in vitro* (Murphy *et al.*, 2006) and *in vivo* pulldown assays (Sakagami *et al.*, 2008), respectively.

Here, we immunohistochemically demonstrated that IQ-ArfGEF/BRAG1 was associated with the synaptic ribbons of photoreceptors using both light and electron microscopy. Furthermore, we showed that IQ-ArfGEF/BRAG1 forms a complex with RIBEYE.

Materials and methods

All procedures involving animals were approved by the Animal Experimentation and Ethics Committee of the Kitasato University School of Medicine in accordance with the guidelines of the National Institutes of Health. All efforts were made to minimize the number of animals used in the experiments.

Antibodies

A guinea pig polyclonal anti-RIBEYE antibody was raised against the A-domain of RIBEYE (amino acids 1-304), which was bacterially expressed and purified as a glutathione S-transferase fusion protein. The antibody was affinity-purified with the A-domain, which was purified as a fusion protein combined with maltose-binding protein and immobilized on sepharose 4B (CNBr-activated sepharose 4B; GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). The specificity of the antibody was characterized by immunoblot and immunohistochemical analyses (Supporting information, Fig. S1). A rabbit polyclonal anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 antibody was raised against the carboxyl-terminal 116 amino-acid region of mouse IQ-ArfGEF/BRAG1. Its specificity has previously been characterized by immunoblot analysis (Sakagami *et al.*, 2008). The guinea pig polyclonal anti-PSD-95 antibody has previously been described (Fukaya & Watanabe, 2000).

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA (5 μ g), which was extracted from the adult C57BL/6N mouse retina and brain with Trizol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), was reverse-transcribed by using the Superscript III first-strand synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with oligo(dT) primers. The sequences of the PCR primers designed to amplify the unique N-terminal region of IQ-ArfGEF/BRAG1 were 5'-ATCTATCGGGATAAGGAGCG-3' and 5'-GAAGTATGCAGG-GTTCTGTG-3', as described previously (Sakagami *et al.*, 2008). The sequences of the primers for β -actin were 5'-CAGGAGATGCC-CACTGCCGCA-3' and 5'-CTCCTTCTGCATCCTGTGTCAGCA-3'. The PCR conditions for IQ-ArfGEF/BRAG1 and β -actin were 35 and 25 cycles, respectively, of 96°C for 15 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min, which gave a linear range of amplification as determined in our preliminary experiment. The PCR products were electrophoresed on a 1.2% agarose gel and photographed using an imaging analyser (ChemIDoc XRS; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). As a negative control, PCR was performed with samples without RT in the first-strand synthesis reaction.

Immunohistochemistry

C57BL/6N male mice at postnatal 10–12 weeks were purchased from Oriental Yeast (Tokyo, Japan) and maintained under 12 h light : dark cycles with free access to water and standard diet. Ten mice were used for light immunohistochemical analysis and six for immunoelectron

microscopic observation. During the light cycle, they were deeply anesthetized with diethyl ether and decapitated. After the cornea, lens and vitreous body had been quickly removed, the remaining eye cups were immersion-fixed overnight in 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4) and cryoprotected in 30% (w/v) sucrose in PB. The retinae were sectioned vertically with a cryostat at a thickness of 25 μ m and mounted onto slides. The sections were treated with 1 mg/mL of pepsin (DAKO, Carpinteria, CA, USA) in 0.2 N HCl at 37°C for 5 min, washed with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and solubilized in 0.3% Triton X-100 for 30 min. After being blocked with 5% normal goat serum in PBS for 30 min, they were incubated overnight with the antibody against IQ-ArfGEF/BRAG1 at a final concentration of 1 μ g/mL. For double-immunolabeling, the sections were incubated with rabbit polyclonal anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG and mouse anti-protein kinase C α (PKC α) IgG (#P16520, Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), mouse anti-Bassoon IgG (clone SAP7F407; Stressgen, Victoria, BC, Canada), guinea pig anti-RIBEYE IgG or guinea pig anti-PSD-95 IgG at a final concentration of 1 μ g/mL. Immunoreactions were visualized with Alexa488-conjugated anti-rabbit IgG and Alexa594-conjugated anti-mouse IgG or anti-guinea pig IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). The sections were counterstained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI). In the control experiment, the anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 antibody preincubated with the antigen (1 μ M) was used as a primary antibody. Immunofluorescent images (512 \times 512 pixels) were taken with a confocal laser scanning microscope (LSM 710, Zeiss, Germany) using \times 20 and \times 63 plan-apochromat objective lens. The brightness and contrast of the final images were adjusted using the Photoshop CS4 software (Adobe Systems).

For quantification of the colocalization of IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE in the IPL, square optical sections (15 \times 15 μ m), on which the immunoreactive intensities for both IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE were peaked, were taken from three retinal sections with a confocal laser scanning microscope using a \times 63 plan-apochromat objective lens at a resolution of 512 \times 512 pixels. Immunoreactive puncta for IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE beyond the background levels were identified by visual inspection, transferred onto transparent overhead projector sheets, and the number of overlapped puncta was counted. We counted 2380 and 1837 puncta immunoreactive for IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE, respectively, from three mice. As a control for random overlapping, two immunofluorescent images were superimposed after one of them had been turned by 180°, and the number of overlapping puncta was counted. The value of the colocalization of IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE was statistically compared with that of random overlapping using paired Student's *t*-test.

The procedure for the immunoelectron microscopy was basically the same, except for the omission of the pretreatment with Triton X-100. For the immunoperoxidase method, after incubation with the primary antibody, the sections were incubated with the Histofine Simple Stain MAX PO (R) kit (Nichirei, Tokyo, Japan), which contains an amino acid polymer labeled by peroxidase and goat anti-rabbit IgG [F(ab')₂ fraction], for 1 h at room temperature. Immunoreactions were visualized with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogenic substrate (Liquid DAB and Substrate Chromogen System, K3468; DAKO) and monitored microscopically for 5 min. For the pre-embedding immunoelectron microscopy with silver enhancement, nanogold-conjugated anti-rabbit IgG (1:100; Nanoprobes, Yaphank, NY, USA) was used as a secondary antibody. The immunoreaction was enhanced using a HQ Silver Enhancement kit (Nanoprobe, Stony Brook, NY, USA) according to the manufacturer's

instructions. The sections were post-fixed with 1% osmium tetroxide, before being incubated with 2% uranyl acetate. After dehydration, the sections were embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were examined with a JEM-1230 electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). To quantify the distribution of the immunogold particles for IQ-ArfGEF/BRAG1 along the synaptic ribbon, electron microscopic images were taken at a magnification of 30 000-fold. The length of the immunolabeled synaptic ribbons ($n = 37$) and the distance between immunogold particles ($n = 95$) and the base of the synaptic ribbon were measured using a slide caliper.

HeLa cell culture and immunostaining

For immunostaining, HeLa cells were plated onto thin low autofluorescent plastic coverslips in 35-mm dishes (Cell Desk, Sumitomo Bakelite, Japan) at a density of 1.5×10^6 per plate, and transfected with pCAGGS-FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 (Sakagami *et al.*, 2008) and Myc-RIBEYE/pcDNA (Schmitz *et al.*, 2000) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Fifteen hours after the transfection, the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB for 10 min and solubilized with 0.3% Triton X-100 for 30 min. The slides were incubated with rabbit polyclonal anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 and guinea pig anti-RIBEYE antibodies, followed by the incubation with Alexa488-conjugated anti-rabbit IgG and Alexa594-conjugated anti-guinea pig IgG as secondary antibodies. Immunoreactions were observed using a confocal laser-scanning microscope (LSM 710, Zeiss, Germany).

Immunoprecipitation

HeLa cells were plated onto 10-cm dishes at a density of 2.2×10^6 cells per plate and transfected with the combinations of expression vectors indicated in Fig. 5 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Immunoprecipitation was performed as described previously (tom Dieck *et al.*, 2005). Briefly, retinæ from adult C57BL/6N mice and transfected HeLa cells were lysed in the extraction buffer (50 mM TrisHCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate and protein inhibitor cocktail; 250 μ L per mouse and 500 μ L per dish). After being centrifuged to remove insoluble materials, the supernatants of the retinæ (500 μ g) and HeLa cells were incubated for 30 min with protein G-sepharose 4B (GE Healthcare) to block non-specific binding. They were subsequently incubated with 2 μ g of anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG, anti-RIBEYE IgG or normal IgG for 3 h at 4°C, followed by the incubation with protein G-sepharose 4B. The precipitates were extensively washed with the extraction buffer and boiled in the sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis sampling buffer. The lysates (10 μ g) and precipitates were subjected to immunoblot analysis with antibodies against RIBEYE, IQ-ArfGEF/BRAG1, Piccolo (MAB2226; Millipore, Temecula, CA, USA), RIM (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY, USA), kinesin II (Convance, Emeryville, CA, USA) and PSD-95 (Fukaya & Watanabe, 2000).

Results

Expression of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the mouse retina

Our previous RT-PCR analysis showed the expression of the IQ-ArfGEF/BRAG1 transcript at a substantial level in the mouse eye ball (Sakagami *et al.*, 2008). In this study, we further examined the expression of IQ-ArfGEF/BRAG1 at the mRNA and protein

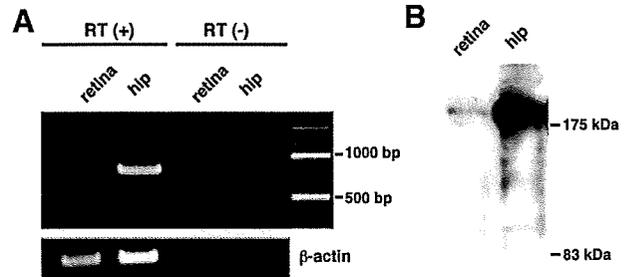


FIG. 1. Expression of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the mouse retina. (A) RT-PCR analysis. First-strand cDNAs from the mouse retina and hippocampus (hip) were subjected to RT-PCR analysis with specific primers for IQ-ArfGEF/BRAG1 (upper panel) and β -actin (lower panel). As a negative control, the samples, which were subjected to the first-strand synthesis reaction without reverse transcription (RT), were used as PCR templates. The right lane shows the electromobility of a 100-bp DNA marker. (B) Immunoblot analysis. Total lysates (20 μ g) of the mouse retina and hippocampus (hip) were subjected to immunoblot analysis with the antibody against IQ-ArfGEF/BRAG1 (0.5 μ g/mL).

levels in the mouse retina (Fig. 1). RT-PCR analysis with specific primers targeted to its N-terminal region showed the expression of the IQ-ArfGEF/BRAG1 transcript in both the retina and hippocampus, although the expression level in the former was much weaker (Fig. 1A). In the immunoblot analysis, the antibody against IQ-ArfGEF/BRAG1, which was raised against the C-terminal region of IQ-ArfGEF/BRAG1 (Sakagami *et al.*, 2008), detected an immunoreactive band at approximately 200 kDa in the lysates of both the retina and hippocampus (Fig. 1B). Consistent with the transcriptional level, the immunoreactive intensity in the retina was much lower than that in the hippocampus. These findings suggest the expression of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the retina and the specificity of the anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 antibody used in the present study.

Immunohistochemical localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the mouse retina

In vertical sections of the adult mouse retina, the antibody against IQ-ArfGEF/BRAG1 produced robust immunolabeling in the two synaptic layers, the IPL and OPL (Fig. 2A). In contrast, the immunoreactivity was negligible in the inner and outer nuclear layers and the ganglion cell layer. In the IPL, immunofluorescent puncta of 0.1–0.5 μ m in size were homogeneously distributed without apparent banding patterns, suggesting the synaptic localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 (Figs 2A and 4). In the OPL, the immunofluorescent puncta were located around the dendritic tips of PKC α -positive rod bipolar cells, and their appearance was elliptic or horseshoe-shaped (Fig. 2C). Because such a characteristic appearance was reminiscent of synaptic ribbons, double-immunolabeling was performed with antibodies against IQ-ArfGEF/BRAG1 and markers for the ribbon-associated proteins, RIBEYE and Bassoon (Fig. 2D–I). At a high magnification of the OPL, IQ-ArfGEF/BRAG1-immunoreactive structures clearly overlapped with those immunoreactive for both RIBEYE (Fig. 2D–F) and Bassoon (Fig. 2G–I). Most of the IQ-ArfGEF/BRAG1 immunolabeling was randomly distributed in the OPL, but some of it was clustered, suggesting its distribution in both rod and cone ribbon synapses (Fig. 2A). Pepsin pretreatment of sections was necessary for the immunohistochemical detection of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the retina and the brain (Sakagami *et al.*, 2008), suggesting that the epitopes of IQ-ArfGEF/BRAG1 may be buried in tight protein complexes. In the control experiment (Fig. 2B), the immunolabeling

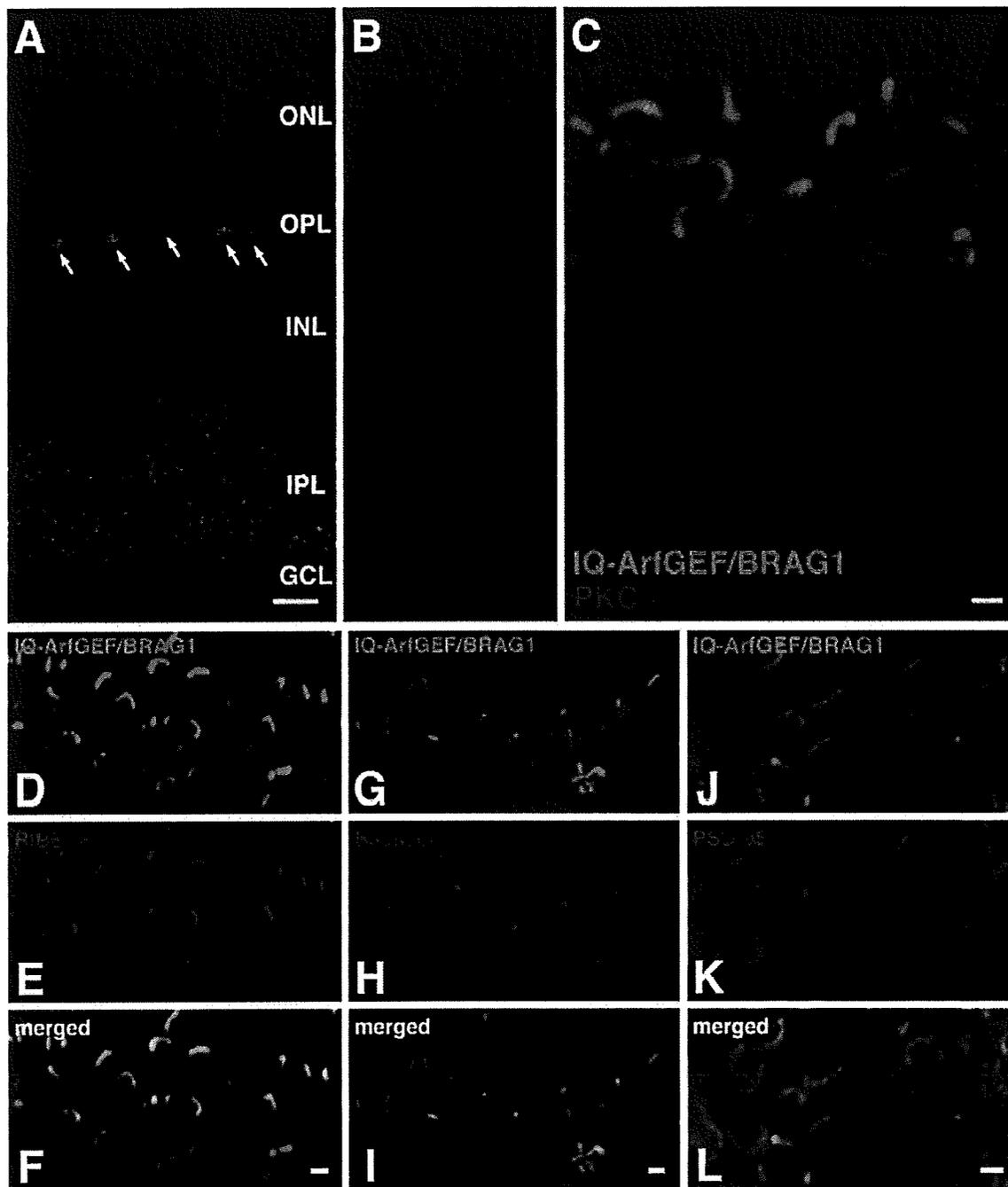


FIG. 2. Immunohistochemical localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the mouse retina. (A and B) Confocal micrographs of vertical sections of the mouse retina immunostained with anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG (A) or the antibody preabsorbed with 1 μ M antigen (B). Note the immunofluorescent puncta for IQ-ArfGEF/BRAG1 (green) in both the inner plexiform layer (IPL) and outer plexiform layer (OPL). The arrows in (A) indicate immunoreactive clusters that presumably corresponded to cone synapses. Also note the complete disappearance of the immunoreactivity for IQ-ArfGEF/BRAG1 (green) in the control experiment (B). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). (C) A confocal micrograph at a high magnification of the OPL double-immunostained with antibodies against IQ-ArfGEF/BRAG1 (green) and protein kinase C α (PKC α ; red). Note the close apposition of the IQ-ArfGEF/BRAG1-immunoreactive puncta to the tips of PKC α -immunoreactive rod bipolar dendrites. (D–L) Confocal micrographs at a high magnification of the OPL double-immunostained with antibodies against IQ-ArfGEF/BRAG1 (D, G, J) and RIBEYE (E), Bassoon (H) or postsynaptic density (PSD)-95 (K). Note the colocalization of IQ-ArfGEF/BRAG1 and the ribbon-associated proteins, RIBEYE and Bassoon. Also note that the distribution of IQ-ArfGEF/BRAG1 did not overlap with that of PSD-95. GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; ONL, outer nuclear layer. Scale bars: A (10 μ m); C, F, I and L (1 μ m).

described above was completely attenuated when the primary antibody was preabsorbed with the antigen, suggesting the specificity of the antibody against IQ-ArfGEF/BRAG1.

We have previously shown that IQ-ArfGEF/BRAG1 forms a protein complex with NMDAR, possibly through its direct interaction with PSD-95 and IRSp53 (Sakagami *et al.*, 2008; Sanda *et al.*, 2009).

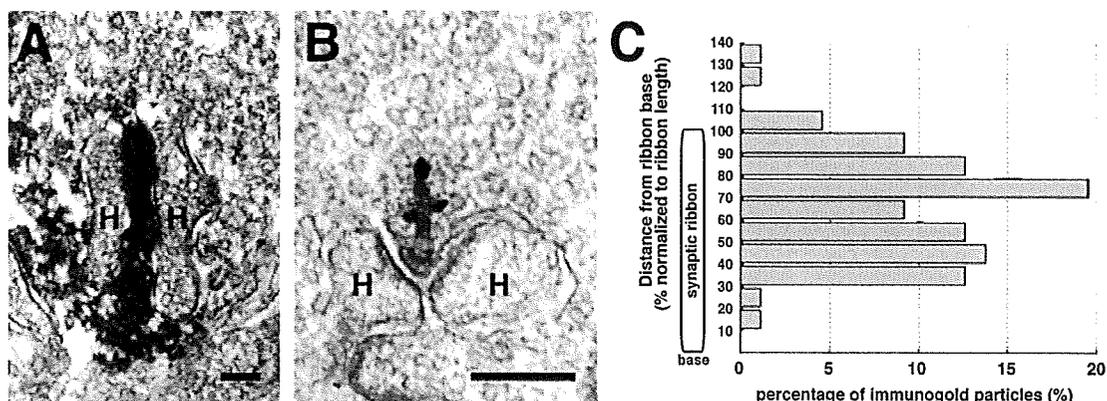


Fig. 3. Localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 at synaptic ribbons of photoreceptor cells. Electron micrographs of the photoreceptor terminals immunostained with anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG and visualized by peroxidase (A) or silver enhancement immunogold (B) methods. H, horizontal cell processes. Scale bars: 200 nm. (C) Quantification of the distribution of the immunogold particles for IQ-ArfGEF/BRAG1 along the synaptic ribbon. The distance of each immunogold particle ($n = 95$) from the base of the synaptic ribbon was normalized to the total length of the respective synaptic ribbon ($n = 37$).

To examine whether this is also the case in the retina, vertical sections of the adult mouse retina were doubly-immunostained for IQ-ArfGEF/BRAG1 and PSD-95 (Fig. 2J–L). In the OPL, IQ-ArfGEF/BRAG1-immunoreactive puncta were located inside PSD-95-immunoreactive structures, which corresponded to the plasma membrane of photoreceptor terminals (Koulen *et al.*, 1998), but the two immunofluorescences showed no overlapping (Fig. 2J–L). In contrast, anti-IRSp53 antibodies, which were raised against its full length in our previous study (Sanda *et al.*, 2009), did not yield obvious immunoreactivity above the background in the OPL (data not shown).

To examine the precise localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 at the ultrastructural level, we first performed pre-embedding immunoperoxidase microscopy. As shown in Fig 3A, immunoreactive products were distributed in the photoreceptor presynaptic terminals with particularly dense accumulation of DAB products at the ribbon structures located between horizontal processes. Because the diffusion of DAB products prevented precise molecular localization, we further performed pre-embedding silver-enhanced immunogold microscopy. Consistently, immunoreactive particles were found along the synaptic ribbons of photoreceptors (Fig. 3B). The quantification of the immunolocalization along the synaptic ribbon revealed that the immunogold particles for IQ-ArfGEF/BRAG1 were mainly distributed in the outer two-thirds of the synaptic ribbon (Fig. 3C).

Localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the IPL

Because the pepsin pretreatment required for the immunodetection had detrimental effects on morphological preservation, the precise localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the IPL could not be determined at the electron microscopic level. Therefore, we examined the colocalization of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIBEYE in the IPL using confocal laser-scanning microscopy (Fig. 4). The quantitative analysis showed that $92.6 \pm 4.8\%$ of RIBEYE-immunoreactive puncta (total 1837 puncta from three mice) colocalized with IQ-ArfGEF/BRAG1, and that $84.7 \pm 4.5\%$ of IQ-ArfGEF/BRAG1-immunoreactive puncta (total 2380 puncta from three mice) colocalized with RIBEYE (Fig. 4C). In the control in which two immunofluorescent images were superimposed after one of them had been turned by 180° , the colocalization values were significantly decreased to $15.2 \pm 4.5\%$ ($P = 0.00068$) and $12.9 \pm 2.4\%$ ($P = 0.0013$; Fig. 4C). These findings

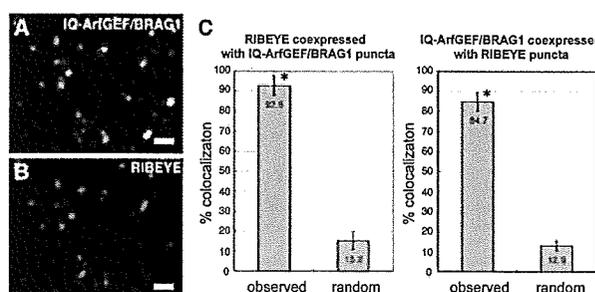


Fig. 4. Colocalization of IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE in the IPL. Confocal micrographs at a high magnification of the IPL double-immunostained with antibodies against IQ-ArfGEF/BRAG1 (A) and RIBEYE (B). Scale bar: 1 μ m. The quantitative data in (C) show the colocalization values in comparison with those when the images were superimposed after one of them had been turned by 180° ($*P < 0.005$; paired Student's *t*-test). Data are shown as the mean \pm SD from three mice.

suggest that IQ-ArfGEF/BRAG1 exists in close association with RIBEYE-positive ribbon synapses in the IPL as well.

Association of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIBEYE

RIBEYE is known to be a major component of synaptic ribbons and to provide the structural basis of a scaffold for various signaling molecules through multiple RIBEYE-RIBEYE self-associations. (Schmitz *et al.*, 2000; tom Dieck *et al.*, 2005; Alpaadi *et al.*, 2008; Magupalli *et al.*, 2008). To examine the subcellular localization of heterologously expressed IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE, FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 and Myc-RIBEYE were transfected into HeLa cells and visualized by immunostaining with antibodies against IQ-ArfGEF/BRAG1 and RIBEYE (Fig. 5A–F). When transfected alone, FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 exhibited diffuse cytoplasmic localization with a reticular pattern in HeLa cells (Fig. 5C), while Myc-RIBEYE was aggregated and exhibited a spot-like distribution as described previously (Fig. 5F; Schmitz *et al.*, 2000; Magupalli *et al.*, 2008). When cotransfected, a small but distinct population of FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 was recruited to hot spots where Myc-RIBEYE was aggregated (Fig. 5A and B). This prompted us to examine

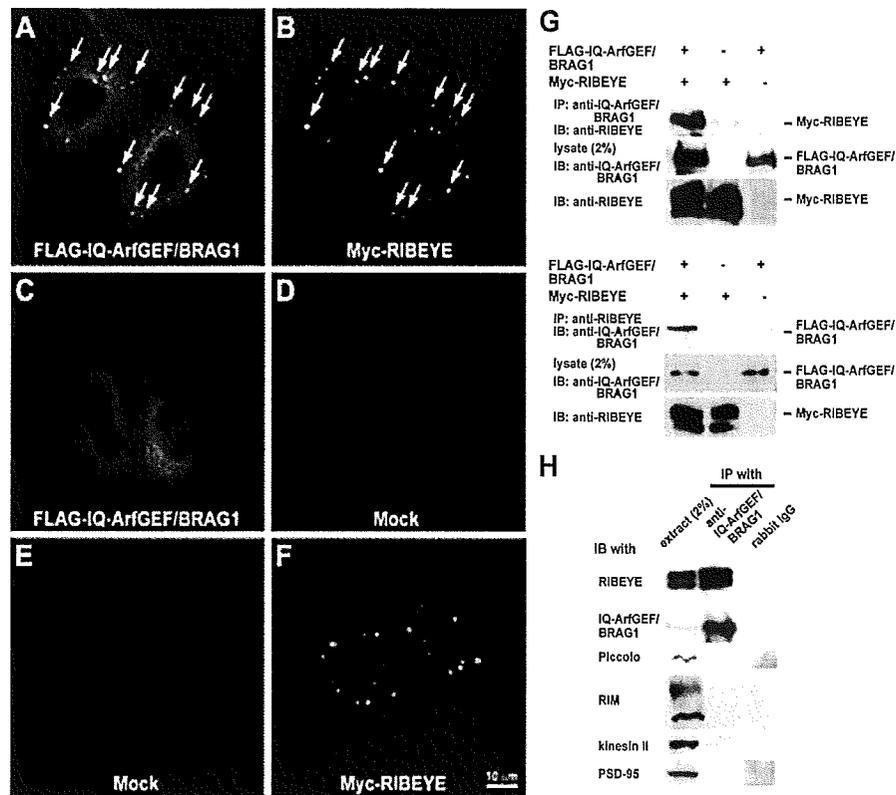


FIG. 5. Association of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIBEYE. (A–F) HeLa cells were transfected with the indicated combination of vectors for FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 and Myc-RIBEYE, and subjected to immunostaining. Note the colocalization of FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 at the hot spots where Myc-RIBEYE was aggregated (arrows) when HeLa cells were doubly transfected (A and B). Scale bar: 10 μ m. (G) HeLa cells transfected with the indicated combination of expression vectors were subjected to immunoprecipitation (IP) and immunoblot (IB) analyses with the indicated antibodies. Note the immunoprecipitation of the FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 and Myc-RIBEYE complex with both combinations of antibodies. (H) Retinal lysates (500 μ g) were immunoprecipitated with anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG or normal rabbit IgG. The precipitates and lysates (10 μ g) were immunoblotted with antibodies against RIBEYE, IQ-ArfGEF/BRAG1, Piccolo, RIM, kinesin II and postsynaptic density (PSD)-95. Note that anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG immunoprecipitated only RIBEYE.

whether IQ-ArfGEF/BRAG1 is able to form a protein complex with RIBEYE. In the immunoprecipitation experiment with the heterologous expression system, anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG was able to immunoprecipitate Myc-RIBEYE from HeLa cells transfected with both FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 and Myc-RIBEYE, but not from HeLa cells transfected with either of them alone (Fig. 5G). Conversely, anti-RIBEYE IgG was also able to immunoprecipitate FLAG-IQ-ArfGEF/BRAG1 from doubly-transfected HeLa cells (Fig. 5G).

Finally, we performed immunoprecipitation in the mouse retina to examine the possibility of the complex formation of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIBEYE *in vivo* (Fig. 5H). The retinal lysates extracted with 1% Triton X-100 and 0.5% sodium deoxycholate were immunoprecipitated with anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG, and the precipitates were immunoblotted with antibodies against RIBEYE and other ribbon-associated proteins (Fig. 5H). Anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG, but not control rabbit IgG, efficiently pulled down RIBEYE from the retinal lysates. In contrast, anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 IgG was not able to immunoprecipitate Piccolo, RIM, kinesin II or PSD-95 from the retinal lysates.

Discussion

IQ-ArfGEF/BRAG1 is a GEF for Arf1 and Arf6 (Murphy *et al.*, 2006; Sakagami *et al.*, 2008). In the brain, it is preferentially localized at the PSD of excitatory synapses and forms a protein complex with

PSD proteins, including NMDAR, PSD-95 family proteins and IRSp53 (Murphy *et al.*, 2006; Sakagami *et al.*, 2008; Sanda *et al.*, 2009). The major finding of this study is that in contrast to its postsynaptic localization in the brain, IQ-ArfGEF/BRAG1 was exclusively localized at the synaptic ribbons of presynaptic photoreceptor terminals in the OPL. Although the precise localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 in the IPL could not be determined at the ultrastructural level, the extremely high rate of its colocalization with RIBEYE in the IPL suggests its localization at the synaptic ribbons in bipolar terminals. Because ribbon synapses occur in other sensory neurons such as pinealocytes and the hair cells of the inner ear, it would be of interest to examine whether IQ-ArfGEF/BRAG1 is a ubiquitous component of synaptic ribbons.

We have recently reported that EFA6A, a specific Arf6-GEF, is also localized at photoreceptor terminals (Katsumata *et al.*, 2008). However, the subcellular location of EFA6A differs from that of IQ-ArfGEF/BRAG1: EFA6A was localized predominantly at the perisynaptic processes of photoreceptor terminals without association with synaptic ribbons (Katsumata *et al.*, 2008). Furthermore, in our unpublished observation, GEP100/BRAG2, another member of the BRAG family with specific GEF activity toward Arf6, was also found to be expressed in the photoreceptors and to exhibit distinct localization from IQ-ArfGEF/BRAG1 in photoreceptor terminals. The multiple existence and distinct subcellular localization of the Arf-GEF family suggest that the Arf pathway regulates various presynaptic

functions of the photoreceptor ribbon synapse in a fine-tuned manner through multiple Arf-GEF.

Retinal ribbon synapses continuously release glutamate in response to the graded changes in the presynaptic membrane potential (Parsons & Sterling, 2003; Sterling & Matthews, 2005; tom Dieck & Brandstatter, 2006). Compared with conventional synapses, ribbon synapses, therefore, require mechanisms to prepare and maintain a large pool of readily releasable vesicles and to release them rapidly. Synaptic ribbons are hypothesized to act as a 'conveyor belt' that transports attached readily releasable synaptic vesicles to their docking/release sites or to act as a 'safety belt' to tether vesicles in stable mutual contact to allow them to fuse serially by compound fusion (Parsons & Sterling, 2003). The first model is supported by the presence of KIF3A, a member of the kinesin motor protein family, along the ribbons (Muresan *et al.*, 1999). Interestingly, kinesins have been shown to physically interact with Arf proteins and their regulators: Arf proteins can interact with mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1; Boman *et al.*, 1999). BIG1, an Arf-GEF, and centaurin- α 1, an Arf-GAP, interact with KIF21A and KIF13B, respectively (Kanamarlapudi, 2005; Shen *et al.*, 2008). Although our immunoprecipitation analysis with anti-IQ-ArfGEF/BRAG1 did not support its direct complex formation with KIF3A (Fig. 5H), it can be still speculated that IQ-ArfGEF/BRAG1 may activate Arf proteins, thereby recruiting synaptic vesicles to ribbons or regulating the transport of synaptic vesicles along ribbons in a collaborative manner with KIF3A. However, recent accumulating evidence supports the safety belt/compound fusion model rather than the conveyor belt model (Parsons & Sterling, 2003). Arf proteins have been shown to regulate exocytosis in various neuroendocrine and endocrine cells, including adrenal chromaffin and PC12 cells (Galas *et al.*, 1997; Caumont *et al.*, 1998; Vitale *et al.*, 2002), pancreatic β cells (Lawrence & Birnbaum, 2003) and pituitary melanotrophs (Rupnik *et al.*, 1995). Previous studies on chromaffin cells emphasized the essential roles of Arf6 in Ca^{2+} -regulated exocytotic fusion of secretory vesicles: upon Ca^{2+} stimulation, Arf6 translocates to the plasma membrane from secretory vesicles (Caumont *et al.*, 1998) and is activated by ARNO, an Arf-GEF (Caumont *et al.*, 2000; Vitale *et al.*, 2002). Subsequently, Arf6 activates phospholipase D (PLD), which produces phosphatidic acid from phosphatidylcholine, thereby modifying the membrane lipid composition to make it fusogenic (Caumont *et al.*, 2000). In addition to PLD, Arf6 can directly activate another lipid-modifying enzyme, phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I (PIP5K), which produces phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Honda *et al.*, 1999). Arf6 has previously been shown to play a role in Ca^{2+} -regulated exocytosis by regulating the activity of PIP5K in PC12 cells (Aikawa & Martin, 2003). Together with our previous finding that IQ-ArfGEF/BRAG1 activates Arf6 *in vivo* (Sakagami *et al.*, 2008), it is thus reasonable to speculate that IQ-ArfGEF/BRAG1 may be involved in the fusion of synaptic vesicles docked to ribbons through Arf6-dependent activation of PLD and/or PIP5K.

The mechanism for the targeting of IQ-ArfGEF/BRAG1 to synaptic ribbons remains unclear at present. IQ-ArfGEF/BRAG1 contains various motifs that can interact with proteins and lipids, such as the coiled coil motif, IQ-like motif, Sec7 domain, PH domain, proline-rich sequence and PDZ-binding motif (Murphy *et al.*, 2006; Sakagami *et al.*, 2008). We have previously shown that IQ-ArfGEF/BRAG1 interacts with PSD-95 and IRSp53 through its different C-terminal motifs, PDZ-binding motif and proline-rich sequence, respectively, and that the C-terminal region is important for its targeting to dendritic spines (Sakagami *et al.*, 2008; Sanda *et al.*, 2009). In contrast, our present analyses showed that it did not colocalize with or form a protein complex with PSD-95 in the

retina. Furthermore, the immunoprecipitation analysis did not support the complex formation of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIM1 and Piccolo, PDZ domain-containing proteins that are localized at the synaptic ribbon (Dick *et al.*, 2001). Therefore, interactions with PDZ domain-containing proteins such as PSD-95, RIM1 and Piccolo seem to be unimportant for the localization of IQ-ArfGEF/BRAG1 at the synaptic ribbon. Intriguingly, our present immunoprecipitation experiment demonstrated the tight association of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIBEYE, a major component of synaptic ribbons (Schmitz *et al.*, 2000), in the retina. Furthermore, analyses with a heterologous expression system using HeLa cells demonstrated that IQ-ArfGEF/BRAG1 was partially recruited to the RIBEYE aggregates and that it formed an immunoprecipitable protein complex with RIBEYE. These findings strongly suggest the direct interaction of IQ-ArfGEF/BRAG1 with RIBEYE. Further studies using yeast two-hybrid and pulldown assays are necessary to clarify the precise mechanism of the interaction.

In summary, we immunohistochemically demonstrated that IQ-ArfGEF/BRAG1 is a novel component of the synaptic ribbons of photoreceptors and bipolar cells, shedding new light on the roles of the IQ-ArfGEF/BRAG1-Arf pathway in ribbon synapses in the retina.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Immunoblot analysis.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset by Wiley-Blackwell. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

Acknowledgements

We thank Dr Thomas C. Südhof (The University of Texas Southwestern Medical Center) for donating the expression vector for RIBEYE, and members of Research Center for Biological Imaging in Kitasato University School of Medicine for their technical assistance. This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Science, Sports and Technology, Japan (KAKENHI 19300119 and 21659049 for H.S.).

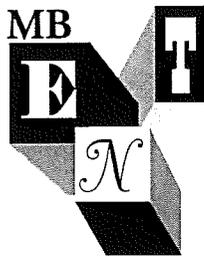
Abbreviations

Arf, ADP ribosylation factor; BRAG, brefeldin A-resistant ArfGEF; DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; GAP, GTPase-activating protein; GEF, guanine nucleotide exchange factor; IPL, inner plexiform layer; IRSp53, insulin receptor tyrosine kinase substrate of 53 kDa; NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate type glutamate receptors; OPL, outer plexiform layer; PB, phosphate buffer; PBS, phosphate-buffered saline; PDZ, PSD-95/discs large/zona occludens-1; PH, pleckstrin homology; PIP5K, phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type I; PKC α , protein kinase α ; PLD, phospholipase D; PSD, postsynaptic density; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

References

- Aikawa, Y. & Martin, T.F. (2003) ARF6 regulates a plasma membrane pool of phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate required for regulated exocytosis. *J. Cell Biol.*, **162**, 647–659.

- Alpadi, K., Magupalli, V.G., Kappel, S., Koblitz, L., Schwarz, K., Seigel, G.M., Sung, C.H. & Schmitz, F. (2008) RIBEYE recruits Munc119, a mammalian ortholog of the *Caenorhabditis elegans* protein unc119, to synaptic ribbons of photoreceptor synapses. *J. Biol. Chem.*, **283**, 26461–26467.
- Boman, A.L., Kuai, J., Zhu, X., Chen, J., Kuriyama, R. & Kahn, R.A. (1999) Arf proteins bind to mitotic kinesin-like protein 1 (MKLP1) in a GTP-dependent fashion. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **44**, 119–132.
- Brandstatter, J.H., Fletcher, E.L., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. & Wässle, H. (1999) Differential expression of the presynaptic cytomatrix protein bassoon among ribbon synapses in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci.*, **11**, 3683–3693.
- Casanova, J.E. (2007) Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. *Traffic*, **8**, 1476–1485.
- Caumont, A.S., Galas, M.C., Vitale, N., Aunis, D. & Bader, M.F. (1998) Regulated exocytosis in chromaffin cells. Translocation of ARF6 stimulates a plasma membrane-associated phospholipase D. *J. Biol. Chem.*, **273**, 1373–1379.
- Caumont, A.S., Vitale, N., Gensse, M., Galas, M.C., Casanova, J.E. & Bader, M.F. (2000) Identification of a plasma membrane-associated guanine nucleotide exchange factor for ARF6 in chromaffin cells. Possible role in the regulated exocytotic pathway. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15637–15644.
- D'Souza-Schorey, C. & Chavrier, P. (2006) ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **7**, 347–358.
- Dick, O., Hack, I., Altmann, W.D., Garner, C.C., Gundelfinger, E.D. & Brandstatter, J.H. (2001) Localization of the presynaptic cytomatrix protein Piccolo at ribbon and conventional synapses in the rat retina: comparison with Bassoon. *J. Comp. Neurol.*, **439**, 224–234.
- tom Dieck, S. & Brandstatter, J.H. (2006) Ribbon synapses of the retina. *Cell Tissue Res.*, **326**, 339–346.
- tom Dieck, S., Altmann, W.D., Kessels, M.M., Qualmann, B., Regus, H., Brauner, D., Fejtova, A., Bracko, O., Gundelfinger, E.D. & Brandstatter, J.H. (2005) Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J. Cell Biol.*, **168**, 825–836.
- Dosemeci, A., Makusky, A.J., Jankowska-Stephens, E., Yang, X., Slotta, D.J. & Markey, S.P. (2007) Composition of the synaptic PSD-95 complex. *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1749–1760.
- Fukaya, M. & Watanabe, M. (2000) Improved immunohistochemical detection of postsynaptically located PSD-95/SAP90 protein family by protease section pretreatment: a study in the adult mouse brain. *J. Comp. Neurol.*, **426**, 572–586.
- Galas, M.C., Helms, J.B., Vitale, N., Thierse, D., Aunis, D. & Bader, M.F. (1997) Regulated exocytosis in chromaffin cells. A potential role for a secretory granule-associated ARF6 protein. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2788–2793.
- Gillingham, A.K. & Munro, S. (2007) The small G proteins of the Arf family and their regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **23**, 579–611.
- Honda, A., Nogami, M., Yokozeki, T., Yamazaki, M., Nakamura, H., Watanabe, H., Kawamoto, K., Nakayama, K., Morris, A.J., Frohman, M.A. & Kanaho, Y. (1999) Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell*, **99**, 521–532.
- Inaba, Y., Tian, Q.B., Okano, A., Zhang, J.P., Sakagami, H., Miyazawa, S., Li, W., Komiyama, A., Inokuchi, K., Kondo, H. & Suzuki, T. (2004) Brain-specific potential guanine nucleotide exchange factor for Arf, synArfGEF (Po), is localized to postsynaptic density. *J. Neurochem.*, **89**, 1347–1357.
- Jordan, B.A., Fernholz, B.D., Boussac, M., Xu, C., Grigorean, G., Ziff, E.B. & Neubert, T.A. (2004) Identification and verification of novel rodent postsynaptic density proteins. *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 857–871.
- Kanamarlapudi, V. (2005) Centaurin-alpha1 and KIF13B kinesin motor protein interaction in ARF6 signalling. *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 1279–1281.
- Katsumata, O., Honma, T., Sanda, M., Kamata, A., Takeda, S., Kondo, H. & Sakagami, H. (2008) Predominant localization of EFA6A, a guanine nucleotide exchange factor for ARF6, at the perisynaptic photoreceptor processes. *Brain Res.*, **1234**, 44–49.
- Koulen, P., Fletcher, E.L., Craven, S.E., Brecht, D.S. & Wässle, H. (1998) Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina. *J. Neurosci.*, **18**, 10136–10149.
- Lawrence, J.T. & Birnbaum, M.J. (2003) ADP-ribosylation factor 6 regulates insulin secretion through plasma membrane phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **100**, 13320–13325.
- Magupalli, V.G., Schwarz, K., Alpadi, K., Natarajan, S., Seigel, G.M. & Schmitz, F. (2008) Multiple RIBEYE-RIBEYE interactions create a dynamic scaffold for the formation of synaptic ribbons. *J. Neurosci.*, **28**, 7954–7967.
- Muresan, V., Lyass, A. & Schnapp, B.J. (1999) The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J. Neurosci.*, **19**, 1027–1037.
- Murphy, J.A., Jensen, O.N. & Walikonis, R.S. (2006) BRAG1, a Sec7 domain-containing protein, is a component of the postsynaptic density of excitatory synapses. *Brain Res.*, **1120**, 35–45.
- Parsons, T.D. & Sterling, P. (2003) Synaptic ribbon. Conveyor belt or safety belt? *Neuron*, **37**, 379–382.
- Peng, J., Kim, M.J., Cheng, D., Duong, D.M., Gygi, S.P. & Sheng, M. (2004) Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **279**, 21003–21011.
- Rao-Mirotnik, R., Harkins, A.B., Buchsbaum, G. & Sterling, P. (1995) Mammalian rod terminal: architecture of a binary synapse. *Neuron*, **14**, 561–569.
- Rupnik, M., Law, G.J., Northrop, A.J., Mason, W.T. & Zorec, R. (1995) Brefeldin A and a synthetic peptide to ADP-ribosylation factor (ARF) inhibit regulated exocytosis in melanotrophs. *Neuroreport*, **6**, 853–856.
- Sakagami, H., Sanda, M., Fukaya, M., Miyazaki, T., Sukeyama, J., Yanagisawa, T., Suzuki, T., Fukunaga, K., Watanabe, M. & Kondo, H. (2008) IQ-ArfGEF/BRAG1 is a guanine nucleotide exchange factor for Arf6 that interacts with PSD-95 at postsynaptic density of excitatory synapses. *Neurosci. Res.*, **60**, 199–212.
- Sanda, M., Kamata, A., Katsumata, O., Fukunaga, K., Watanabe, M., Kondo, H. & Sakagami, H. (2009) The postsynaptic density protein, IQ-ArfGEF/BRAG1, can interact with IRSp53 through its proline-rich sequence. *Brain Res.*, **1251**, 7–15.
- Schmitz, F., Königstorfer, A. & Südhof, T.C. (2000) RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function. *Neuron*, **28**, 857–872.
- Shen, X., Meza-Carmen, V., Puxeddu, E., Wang, G., Moss, J. & Vaughan, M. (2008) Interaction of brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein (BIG) 1 and kinesin motor protein KIF21A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **105**, 18788–18793.
- Sterling, P. & Matthews, G. (2005) Structure and function of ribbon synapses. *Trends Neurosci.*, **28**, 20–29.
- Vitale, N., Chasserot-Golaz, S., Bailly, Y., Morinaga, N., Frohman, M.A. & Bader, M.F. (2002) Calcium-regulated exocytosis of dense-core vesicles requires the activation of ADP-ribosylation factor (ARF)6 by ARF nucleotide binding site opener at the plasma membrane. *J. Cell Biol.*, **159**, 79–89.
- Walikonis, R.S., Jensen, O.N., Mann, M., Provance, D.W. Jr, Mercer, J.A. & Kennedy, M.B. (2000) Identification of proteins in the postsynaptic density fraction by mass spectrometry. *J. Neurosci.*, **20**, 4069–4080.
- Wang, Y., Okamoto, M., Schmitz, F., Hofmann, K. & Südhof, T.C. (1997) Rim is a putative Rab3 effector in regulating synaptic-vesicle fusion. *Nature*, **388**, 593–598.



◆特集・訴えからみためまいの見分け方 単発性の回転性めまい

長沼英明*

Abstract 単発性の回転性めまいとは、自発性の回転性めまいで、めまいは比較的長い時間続くが、反復せず1回のみの発作で終わってしまうめまいのことである。前庭神経炎、めまいを伴う突発性難聴、Ramsay Hunt 症候群などがある。

前庭神経炎は、突発性に出現する通常1度のみでの激しい自発性の回転性めまいであり、蝸牛症状を伴わない。高度 CP を示し、ウイルスによる前庭神経障害が病因と考えられている。CP が残存する場合のめまいは代償されにくく、必ずしも予後良好ではない。

突発性難聴は、内耳障害と考えられるが原因を特定できない急性感音難聴である。循環障害説とウイルス感染が有力な病因として支持されている。めまいを随伴するものが、めまいを伴う突発性難聴である。めまいを伴う突発性難聴の難聴の予後は、めまいを伴わない場合と比べて不良である。一方、めまいの予後は難聴の程度によらず代償されやすく、比較的良好である。

Ramsay Hunt 症候群は、膝神経節に潜伏感染していた VZV の再活性化により、耳介帯状疱疹、顔面神経麻痺、めまいや難聴などの第Ⅷ脳神経症状を示す。CP が残存する場合のめまいは代償されにくく、めまいの予後は必ずしも良好ではない。

単発性の回転性めまい疾患を病因、病態から考えた場合、前庭神経炎と Ramsay Hunt 症候群は前庭神経の障害で共通点が多いが、内耳障害のめまいを伴う突発性難聴とは異なっている。

Key words 前庭神経炎 (vestibular neuronitis)、突発性難聴 (sudden deafness)、Ramsay Hunt 症候群 (Ramsay Hunt syndrome)、メニエール病 (Ménière disease)、良性発作性頭位めまい症 (benign paroxysmal positional vertigo ; BPPV)

はじめに

めまい症例を診断するとき、問診は改めて述べることもなく非常に重要であり、問診所見のみである程度めまい疾患を鑑別できる。

まず、患者さんの訴えるめまいが、誘発性のものか自発性のものかに注意する。誘発性のめまいとは、たとえば動作に伴った頭部の位置の変化により生じるめまいであり、動作を停止したりある頭位で固定すると数分でいったん回転性めまいは軽快、消失するが、再び動作を開始するとめまいが起こる。このような誘発性のめまいは、良性発

作性頭位めまい症や頸性めまいなどで認められる。一方、自発性めまいとは、動作などの誘引なしに静止状態にあっても生じるめまいで、メニエール病、前庭神経炎などで認められる。回転性めまいは数十分以上続くことが多く、嘔気、嘔吐を伴うことが多い。

本稿で述べる単発性の回転性めまいとは、自発性の回転性めまいで、めまいは比較的長い時間続くが、反復せず1回のみの発作で終わってしまうめまいのことである。前庭神経炎、めまいを伴う突発性難聴、Ramsay Hunt 症候群などの鑑別について述べる。

* Naganuma Hideaki, 〒228-8555 神奈川県相模原市北里1-15-1 北里大学医学部耳鼻咽喉科・神経耳科、専任講師

表 1. 前庭神経炎診断の手引き

- 1) めまいを主訴とする大きな発作は通常一度である。
- 2) 温度刺激検査によって、半規管機能の一侧または両側の高度低下ないしは消失を認める。
- 3) めまいと直接関連をもつ蝸牛症状および中枢神経症状を認めない。

解説

- (1) めまいの発現に先行して感冒様症状などを示すことがある。
- (2) めまいの原因と推定される既存の疾患や、投与薬・処置・手術などを認めない。
- (3) 直流電気刺激検査で眼振あるいは身体動揺反応が微弱または消失を示す事がある。
- (4) 両側前庭神経炎の例は、「両側前庭機能高度低下」にも所属する事が考えられる。

厚生省前庭機能異常調査研究班

表 2. めまいの持続期間

前庭神経炎発症後の期間	めまい症状がある割合
発症後1週	94.7(%)
1か月	71.0
3か月	36.8
6か月	10.5
1年	7.8
2年	5.2
3年	2.6
5年以上	2.6

(文献2より引用)

前庭神経炎

前庭神経炎とは、突発的に出現する通常1度のみの激しい自発性の回転性めまいで、蝸牛症状を伴わない疾患である。回転性めまいは1~3日で軽快する場合が多いが、その後は誘発性のめまいや体動時の平衡障害を認めたり、経過中に良性発作性頭位めまい症(BPPV)様の眼振(BPPN)を認める場合もある。病態は前庭神経障害と推定されているが、内耳前庭障害も含まれると考えられている。病因としてウイルス感染説、循環障害説などが考えられている。厚生省前庭機能異常調査研究班による診断の手引きを表1に示す。

診断には、症状に加えて温度刺激検査で半規管機能の一侧または両側の高度低下ないしは消失を認める必要がある。しかし、外側半規管または上前庭神経の障害が軽度で温度刺激検査で半規管麻痺(CP)を認めない場合には、前庭神経炎とは診断できない。武田ら¹⁾は、突発性に発症する単発性のめまい発作を主症状とする疾患を突発性めまいと診断し、温度刺激検査でCPを認める場合に前庭神経炎と診断することを提唱した。同様に池上ら²⁾も、単発性のめまい発作を主症状とする疾患には突発性前庭障害という症候名を使用すべきであると報告している。

1. 検査所見

1) 聴力検査

原則として聴力障害は認められず、めまい発作時において、既存の難聴の増悪も認められない。

2) 眼振検査

めまい発作時には、麻痺性すなわち健側に向かう水平または水平回旋混合性の定方向性眼振を認める。一側性の末梢前庭障害が高度の場合は、Ⅲ度の定方向性注視眼振に加え、非注視下の頭位眼振・頭位変換眼振検査において頭位・頭位変換に影響を受けず麻痺性の眼振を示す。麻痺性の自発眼振は、平衡障害が自覚的に軽快した後も長期間持続する場合がある(表2)。

経過中に患側向きの眼振を認める症例が存在する。回復期眼振と呼ばれ、前庭代償が進行した時期に患側の前庭機能が回復したことを意味しており、予後良好と考えられている。一旦、めまい症状がおさまった後の経過中に、BPPN様の眼振を認めることもある。

3) 体平衡検査(立ち直り、偏倚検査)

めまい発作発症時は、激しいめまいのため本検査を行うことは困難であるが、数日後起立、歩行が徐々に可能になって本検査を行った場合、Romberg検査ではRomberg現象が陽性で、足踏み検査では患側に著明に偏倚する。

4) 温度刺激検査

患側耳または両側耳で高度CPまたは無反応を示す。

5) 視標追跡検査

一般に正常所見を示すが、自発眼振が眼振の方向へ視標を追跡するときに重畳する場合がある。

6) 視運動性眼振検査

一般に正常所見を示すが、自発眼振の方向へのDPを示す場合がある。

7) 電気性身体動揺検査(GBST)^{3)~6)}, 電気性眼振検査

患側の反応低下を示す。

2. 鑑別診断

1) 良性発作性頭位めまい症(BPPV)

良性発作性頭位めまい症は頭位によって誘発されるめまい疾患で、めまいと関連する蝸牛症状を認めない。誘発される眼振は後半規管型であれば純回旋眼振、外側半規管型であれば方向交代性上向性または下向性の頭位眼振を認め、眼振に潜時や減衰を認める。

前庭神経炎のめまいは、回転性めまいに引き続く浮動性めまいも含めると36.8%の症例においてめまいが3か月続く²⁾。一方、良性発作性頭位めまい症のめまいは頭位によって誘発されるめまいであり、持続時間は多くの場合10分以下で、前庭神経炎とは異なる。ただし、前庭神経炎の自発性めまいがおさまった後に、頭位変換時の回転性めまいとBPPNを認める場合があり鑑別に注意を要する。

2) 前庭型メニエール病の初回発作⁷⁾⁸⁾

前庭型メニエール病とは、蝸牛症状を示さずめまい発作を反復するメニエール病の非定型例である。めまい発作は自発性の回転性めまいであるが、めまいの持続時間が数時間~1日程度であり、前庭神経炎のそれに比して短い。回転性めまい発作がおさまった後に浮動性めまいがみられることは共通である。ただし前庭型メニエール病では回転性めまい発作が反復するため、2回目の発作があれば鑑別は容易である。

フロセミドテスト⁹⁾などにより内リンパ水腫が推定される場合がある。眼振は水平回旋混合性眼振で共通であるが、前庭型メニエール病の発作期の眼振は刺激性の患側向き眼振で数日以内に麻痺性の健側向き眼振に変化する。

3) 中枢性前庭障害によるめまい

中枢性前庭障害(腫瘍、血管障害など)では、めまいに伴う中枢神経症状を認め、注視眼振、非注視頭位眼振検査、視標追跡検査や視運動性眼振検

査などで異常を認める。画像検査などにより鑑別する。

4) 心因性めまい

問診により、発症に関連する心理・社会的ストレスの有無や生活歴を聴取し、心理的要因の関与を明らかにする。めまいをきたす器質的障害の有無により鑑別する。

3. 予後

前庭神経炎のめまいの予後は前庭代償により良好であるとされているが、2年後の温度刺激検査でCPが残存する症例では麻痺性の頭振後眼振が持続していた。これらの症例では日常生活において誘発性めまいを自覚しており、CPが残存する場合のめまいは代償されにくい。すなわち、前庭神経炎の予後は必ずしも良好ではない¹⁾。

めまいを伴う突発性難聴

急性感音難聴の中で、原因を特定できず内耳障害と考えられるものが突発性難聴と診断される。そのため診断は除外診断となり単一疾患ではない。

突発性難聴の原因は不明であるが、現時点では循環障害説とウイルス感染説が最も有力な病因として支持されている。したがって、それらを想定しながら診断・治療を考える必要がある。小川¹⁰⁾は、患者個々の持つ特殊性を細かく観察して、それぞれの症例でその病因まで掘り下げていくような診断が必要であると報告している。

発症までの数か月前、数週間前、数日前の生活習慣、ストレスの状況を詳細に問診していくことは、病態解明の大きな手がかりになると思われる。また、突発性難聴の発症を患者は全く予期せぬ突発の発症と述べる場合も多いが、詳しい問診によって非常に軽微の蝸牛症状の反復を自覚している場合も散見され、このような症例も存在することを把握することもまた病態解明につながるものと考えられる。

突発性難聴の側頭骨の病理学的所見はYoonら¹¹⁾の報告によれば、コルチ器の萎縮、外有毛細

表 3. 突発性難聴診断の手引き

I. 主症状の特徴	
1. 突然に難聴が発生すること。	(説明) 文字通り即時的な場合もあるが、朝、目がさめて難聴に気付く例もある。これが就寝中に突発的に起ったのか、或る程度の時間がかかったかは不明であるが、要するに、その時、自分がどうしていたかを明言出来るもの。
2. 難聴の性質は高度の感音難聴である。	(説明) ① 必ずしも「高度」である必要はないが、実際問題としては「高度」でないと突然に難聴になったことに気が付かないことが多い。② Recruitment 現象の有無は一定せず。③ 聴力の改善・悪化の繰返しは無い。④ 一側性の場合が多いが、両側同時罹患例もある。
3. 難聴の原因が不明であること(原因が不確実なものも含む)。	(説明) 即ち、当時カゼ気味であったという例や、ビールス感染を疑わせる例などがあるが、難聴との因果関係が明瞭でないものは総て含める。
II. 随伴症状の特徴	
1. 耳鳴が、難聴の発生と同時に、または前後して生じる例が多い。	
2. めまい(嘔気、嘔吐を伴うことがある)が、難聴の発生と同時に、または前後して生じることがあるが、めまい発作を繰返すことは無い。	
3. 第八脳神経以外に顕著な神経症状を伴うことはない。	
(診断の基準)	
1. 確実例	1 および 11 の全条件を充たすもの。
2. 疑い例	1 の 1. と 2. を充たすもの。

厚生省特定疾患突発性難聴調査研究班

胞の脱落、血管条の萎縮、蓋膜の変性、蝸牛神経細胞・線維の脱落、内リンパ水腫所見、ライスネル膜の破裂などが報告されている。しかし、突発性難聴の発症から死亡までの時間は10か月～65年まで様々であることから、これらの所見には、二次的な病変も含まれている可能性が高い。

突発性難聴の診断は、厚生省研究班の診断の手引き(表3)¹²⁾を基にして行う。めまいを伴う突発性難聴は、診断の手引きの随伴症状の2を伴うものである。突発性難聴の聴力低下と同じく、めまい発作も繰返すことはないとされている。回転性めまい、あるいは浮動性めまいを示して急性末梢前庭障害の経過をとるが、前庭神経炎に比して軽度のことが多く、数日～数週間で軽快する。ただし、一旦自発性めまいが軽快した後に頭位性めまいを認める場合もある。

1. 検査所見

1) 聴力検査

一側性の高度の感音難聴を認めるが、めまいを伴う突発性難聴の聴力障害は高度になりやすい。

必ずしも内耳性難聴の所見を示すとは限らない。

2) 眼振所見

発症時には、麻痺性すなわち健側に向かう水平または水平回旋混合性の定方向性眼振を認める。自発眼振の持続は前庭神経炎に比して短く、数週間以内に消失することが多い。前庭神経炎と同様に、回復期眼振を認めることもある。また、一旦めまい症状がおさまった後に、BPPNを認める場合もある。

3) 体平衡検査(立ち直り、偏倚検査)

めまい症状がおさまり検査が可能な状態になった時点で行うと、足踏み検査では患側に偏倚(麻痺期)、その後、回復期では健側に偏倚する。Romberg現象は陽性である。

4) 温度刺激検査

一般に患側の反応低下(CP)を認めるが、必ずしも前庭神経炎のように高度のCPではない。

5) 視標追跡検査

一般に正常所見を示すが、前庭神経炎の場合と同様に自発眼振が重畳する場合がある。

6) 視運動性眼振検査

一般に正常所見を示すが、前庭神経炎と同様に自発眼振の方向へDPを示す場合がある。

2. 鑑別診断

1) メニエール病

メニエール病の初回発作との鑑別は困難である。仮にメニエール病が強く疑われたとしても、めまいを伴う突発性難聴として治療を開始し、経過を観察してメニエール病との鑑別を進める。めまいと難聴を反復すれば、メニエール病と診断する。

2) 聴神経腫瘍

聴神経腫瘍の約10～20%は、突発性の難聴で発症するため¹³⁾、聴性脳幹反応(ABR)やMRIにより鑑別する。

3) 外リンパ瘻

力み、重いものを持ち上げた、鼻かみなどの誘引の有無などの問診が鑑別にきわめて重要であり、瘻孔症状検査も有用である。鑑別が困難な場

表 4. ムンプス難聴診断基準 昭和 62 年度改訂

<p>1. 確実例</p> <p>(1) 耳下腺・顎下腺腫脹など臨床的に明らかなムンプス症例で、腫脹出現 4 日前より出現後 18 日以内に発症した急性高度難聴の症例。 (この場合、必ずしも血清学的検査は必要ではない)</p> <p>(2) 臨床的にはムンプスが明らかでない症例で、急性高度難聴発症直後から 2~3 週間後にかけて血清ムンプス抗体価が有意の上昇を示した症例。 注 1：(1)においては、はじめの腫脹側からの日をいう。 注 2：(2)において有意とは、同時に、同一キットを用いて測定して 4 倍以上になったものをいう。 注 3：難聴の程度は必ずしも高度でない症例もある。</p> <p>2. 準確実例</p> <p>急性高度難聴発症後 3 か月以内にムンプス IgM 抗体が検出された症例。</p> <p>3. 参考例</p> <p>臨床的にムンプスによる難聴と考えられた症例。 注 1：家族・友人にムンプス罹患があった症例など。 注 2：確実例(1)における日数と差のあった症例。</p>

厚生省特定疾患高度難聴調査研究班

合には、まず突発性難聴に準じて治療を開始する。治療にもかかわらず聴力が悪化する場合は、外リンパ瘻を考慮し、鼓室試験開放術を行って鑑別する。

4) ムンプス難聴

厚生省研究班の診断基準を表 4 に示す。血清ムンプス抗体価の上昇が確認されれば、ムンプス感染症による急性感音難聴として鑑別される。

3. 予 後

めまいを伴う突発性難聴の予後は、めまいを伴わない場合と比べて不良である。一方、めまいの予後は難聴の程度によらず、比較的良好である。特に CP が残存していてもめまいの予後は良好であり、前庭神経炎とは異なっている。内耳前庭障害の方が後迷路性前庭障害と比べて中枢性の代償が起こりやすいためと考えられている¹⁴⁾。

Ramsay Hunt 症候群

Ramsay Hunt 症候群は、①外耳道、耳介周囲の帯状疱疹、②顔面神経麻痺、③耳鳴、難聴、めまいなどの第Ⅷ脳神経症状をきたす症候群である。膝神経節に潜伏感染していた水痘帯状疱疹ウイルス(varicella-zoster virus; VZV)が、宿主の免疫能の低下などにより、再活性化して症状を示す。

①~③の 3 主徴のいずれか一つの症状を欠くものは不全型である。病理組織学的には、一側性の外側半規管神経、前半規管神経の障害と外側半規管感覚細胞、支持細胞の障害などが報告されている¹⁵⁾。

第Ⅷ脳神経症状で最も多いのは耳鳴であり、次いでめまい、難聴であり、聴覚過敏もみられる¹⁶⁾。また、第Ⅷ神経症状の自覚と他覚的検査所見との不一致もみられるので、検査による検討が必要である。

1. 検査所見

1) 聴力検査

純音聴力検査で、一側の高音障害型感音難聴を認める。難聴は軽度~中等度のものがほとんど

で、高度難聴の頻度は少ない¹⁶⁾¹⁷⁾。

2) 眼振所見

自発眼振は、健側に向かう麻痺性の水平、または水平回旋混合性定方向性眼振を認める。しかし、発症初期には患側向き眼振を認めることもある。

3) 体平衡検査(立ち直り、偏倚検査)

めまい発作の後、起立が可能になった時期に行うと、Romberg 検査では Romberg 現象が陽性で、足踏み検査では患側に偏倚する。

4) 温度刺激検査

めまいを自覚しない症例でも CP を認め、高度の CP を示す場合も存在する。

5) 視標追跡検査

一般に正常所見を示すが、眼振の方向へ視標を追跡するときに重畳する場合が存在する。

6) 視運動性眼振検査

一般に正常所見を示すが、自発眼振の方向への DP を示す場合がある。

2. 鑑別診断

1) 側頭骨骨折

不全型 Hunt 症候群で、帯状疱疹を伴わない場合に問題となる。ただし、外傷の既往の有無、側頭骨の画像診断にて鑑別は可能である。

2) 真珠腫性中耳炎に伴うめまい

前述と同様、不全型 Hunt 症候群で、帯状疱疹を伴わない場合に問題となるが、鼓膜所見、側頭骨の画像診断にて鑑別は可能である。

3. 予 後

Ramsay Hunt 症候群のめまいの予後は前庭代償により良好であるとされているが、温度刺激検査で高度 CP が残存する症例のめまいは代償されにくい。これらの症例では麻痺性の頭振後眼振が持続し、日常生活において誘発性めまいを自覚するため、めまいの予後は必ずしも良好ではない。Ramsay Hunt 症候群のめまいの予後は前庭神経炎のめまいの予後と類似しており、VZV の再活性化による前庭神経障害の可能性が考えられる。一方、Ramsay Hunt 症候群の難聴の予後は比較的良好である。軽度から中等度の高音障害型感音難聴であるが、めまいの有無にかかわらず回復しやすい。しかし、高度難聴をきたした場合は予後不良である¹⁷⁾。

まとめ

以上、単発性の回転性めまいを示す疾患として、前庭神経炎、めまいを伴う突発性難聴、Ramsay Hunt 症候群の概略を述べ、各々の鑑別診断と鑑別方法を記載した。単発性の回転性めまい疾患はこのように一見多彩であるが、病因、病態から考えると前庭神経炎と Ramsay Hunt 症候群は前庭神経の障害で共通点が多い。一方、めまいを伴う突発性難聴は内耳障害と考えられ、前 2 者とは異なっている。

参考文献

- 1) 武田憲昭, 肥塚 泉, 河野幹子ほか: 前庭神経炎の診断および治療における問題点—突発性めまい症例の臨床的検討からの考察. 日耳鼻, 98: 951-958, 1995.
Summary 突発性に発症する単発性のめまい発作を主症状とし、めまいと関連を持つ蝸牛症状、中枢症状を認めない疾患を突発性めまいと診断し、CP の有無と臨床症状との関連を検討

した結果、CP の有無で臨床経過や臨床的背景には大きな差を認めなかったと報告。前庭神経炎の診断上の問題点を指摘した。

- 2) 池上彰博, 徳増厚二, 藤野明人ほか: 前庭神経炎の臨床的検討—自験例 38 症例を中心として. 耳鼻臨床, 79: 547-556, 1986.
Summary 臨床的に前庭神経炎と診断された 58 例を検討し、本症の診断を前庭神経炎という診断名より、前庭に突発的に障害が起こる一群の疾患として突発性前庭障害という症候名を使用すべきと指摘した。
- 3) 関谷 透: Galvanic Test の研究—加速度記録図法による電気性頭部動揺の観察と Galvanogram の表現. 日耳鼻, 68: 996-1015, 1965.
- 4) 渡辺行雄, 水越鉄理, 大橋直樹ほか: Galvanic Body Sway Test のコンピュータによる分析. 耳鼻臨床, 75: 2350-2354, 1982.
- 5) 渡辺行雄, 沢 昌代, 水越鉄理: Galvanic Body Sway Test の新たな刺激法. Equilib Res, 43: 55-59, 1984.
- 6) Watanabe Y, Mizukoshi K, Ohi H, et al: Retrolabyrinthine disorders detected by galvanic body sway responses in routine equilibrium examination. Acta Otolaryngol Suppl (Stockh), 468: 343-348, 1989.
- 7) 北原正章: メニエール病の基礎と臨床. 第 82 回日耳鼻宿題報告: 1353-1361, 1981.
- 8) 北原正章, 児玉 章: 蝸牛型内リンパ水腫. JOHNS, 8(1): 27-30, 1992.
- 9) 二木 隆, 北原正章: Furosemide (Lasix) test—メニエール病に対する新検査法—. 耳鼻臨床, 64: 373-389, 1971.
- 10) 小川 郁: 急性感音難聴. JOHNS, 10: 1025-1030, 1994.
- 11) Yoon TH, Paparella MM, Schachern PA, et al: Histopathology of sudden hearing loss. Laryngoscope, 100: 707-715, 1990.
Summary 突発性難聴の側頭骨の病理学的所見にてコルチ器の萎縮、外有毛細胞の脱落、血管条の萎縮、蓋膜の変性、蝸牛神経細胞・線維の脱落、内リンパ水腫所見、ライスネル膜の破裂などを報告。
- 12) 三宅 弘: 総括研究報告. 厚生省特定疾患突発性難聴調査研究班昭和 48 年度研究報告書突発性難聴の疫学・病因・治療に関する研究: 1-3, 1974.
- 13) Higgs WA: Sudden deafness as the presenting

- symptom of acoustic neurinoma. Arch Otolaryngol, 98 : 73-76, 1973.
- 14) 北原 糺, 近藤千雅, 武田憲昭: めまいを伴う突発性難聴の平衡障害長期予後. 耳鼻臨床, 93 : 449-454, 2000.
- 15) Proctor L, Perlman H, Maryland B, et al : Acute vestibular paralysis in herpes zoster oticus. Ann Otol Rhinol Laryngol, 88 : 303-310, 1979.
- Summary** 免疫能の低下に伴い, 耳痛, 小胞性皮疹, 高度前庭機能障害, 軽度一時的聴力低下を認めた症例の前庭機能と前庭組織所見を報告. 一側の外側半規管機能高度低下と外側半規管感覚細胞, 支持細胞の消失などを認めた.
- 16) 村上信五, 羽藤直人, 堀内譲治ほか: Ramsay Hunt 症候群の臨床像と予後に関する検討. 日耳鼻, 99 : 1772-1779, 1996.
- Summary** めまいは難聴を合併する例が多く, また高度難聴群ほどめまいを合併する頻度は高かったと報告.
- 17) 戸田直紀, 中村克彦, 東 貴弘ほか: ハント症候群の難聴とめまいの長期予後. 耳鼻臨床, 96 : 405-409, 2003.

9 検査の準備と検査刺激装置

d. 回転刺激検査

目的と適応

回転椅子に坐り速眼の被検者に回転角加速度刺激を負荷すると、前庭眼反射 (vestibulo-ocular reflex: VOR) によって回転眼振と回転角速度が誘発される。本検査では異なる様式で回転角速度を与えて出現する眼振の観察、記録、解析から、半規管機能を調べる。

右回転で頭部水平面に回転角加速度を加えると、慣性で右外側半規管の内リンパに向膨大部流、左外側半規管の内リンパに背膨大部流が起こり、その右促進性、左抑制性の興奮は、左右前庭神経核に伝わり、右向き水平性眼振が誘発される。これを回転中眼振 (perrotatory nystagmus) とい

う。等角速度回転へ移行すると、やがて眼振は消失する。等角速度回転から急停止すると、左向き回転後眼振 (postrotatory nystagmus) が一過性に現れる。左回転の回転中眼振は左向き、回転後眼振は右向きである。すなわち、回転中眼振の方向は右回転で右向き、左回転では左向きである (図1)。次の場合、本検査の適応となる。

- ① 眼振方向優位性 (directional preponderance: DP) の検出。一側半規管機能低下 (canal paresis: CP) の患側決定に通さないが、両側迷路機能廃絶で回転眼振は消失。
- ② 被検者が先天性・後天性外耳道閉鎖症、中耳炎など外耳、中耳疾患を有する場合。
- ③ 中枢代償過程、訓練、回転学習の評価。
- ④ 前半規管、後半規管の検査 (耳石器機能の影響も含む)。
- ⑤ 回転刺激入力と眼振振幅相速度の出力による半規管の動特性、周波数応答を求める場合。

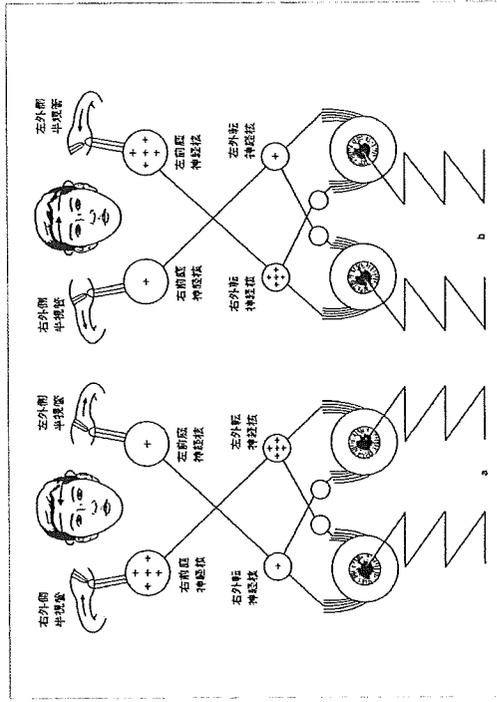


図1: 回転刺激と回転眼振 (Frenzel図を修正) 眼所開眼振 (本文参照)

手技

1. 刺激装置

手動的パラニー式回転椅子、捻れ振子式装置、電動式回転室などがあるが、通常はコンピュータ制御による電動式回転椅子が使用される。

2. 頭位の固定

被検者を回転椅子に着座させ、水平面回転では、左右外側半規管平面が回転軸に直交する頭部前屈30°とする (図2)。矢状面回転では、水平面から右または左へ90°傾斜、前頭面回転では、頭部後屈60°に固定する。一側前半規管と他側後半規管平面の回転では頭部前屈を30°とし、さらに右ま

たは左へ45°傾斜し固定する。左右外耳道孔を結ぶ直線の中点を想定し、その点を回転軸が通るよう調整する。

3. 被検者への説明と前庭刺激以外の外部刺激遮断

被検者に検査の概要を説明し、不安感や過度の緊張を和らげる。検査室は静寂に、室内の明るさを減じ、ENG電極を装着し眼を遮蔽する。検査中は覚醒状態を維持させる。

4. 眼振の観察・記録

眼振をENGで記録する。回旋性眼振では赤外線 CCDカメラによる眼球運動の3次元解析を行う。記録時には誘導線の電氣的ノイズを防止する。

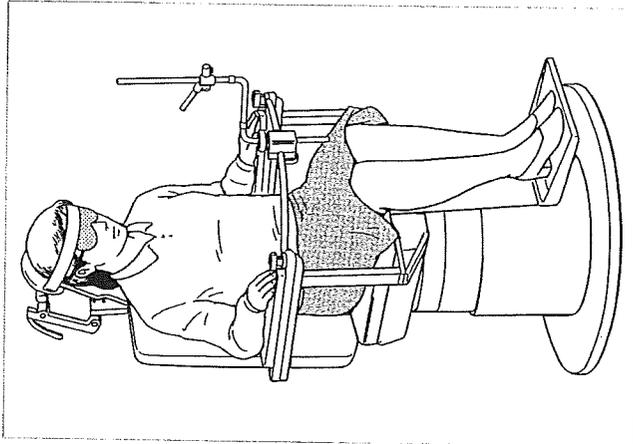


図2: 電動式回転椅子に坐る被検者 頭部前屈30°で外側半規管刺激

5. 振り様回転検査 (pendular rotation test: PRT)

水平面回転で、振幅 45°、周波数 0.2 ~ 0.3Hz (周期 5 ~ 3.3 秒) の正弦波刺激を加え、水平性眼振を記録する。反応の定常状態を確認し、DP では左右方向の眼振平均打数の差が 2 打以上であり、眼振緩徐相速度の基線が DP 側へ移動する。入力椅子回転速度、出力を眼振緩徐相平均速度として入出力比 (VOR ゲイン) を求める。明視下回転で、回転椅子に取り付けた前方の視標を注視させた場合の回転眼振緩徐相平均速度と、運眼時のそれとの比は visual suppression を示す。

コントロール方式では周波数 0.01 ~ 0.16Hz の範囲で 0.01Hz ステップの刺激を加え、VOR ゲイン、位相、ポット線図を求め、前庭補充現象 (vestibular recruitment) では、角加速度の増加で左右差が減少し、末梢性障害では低周波回転で位相差が増大する。

検査上の注意

検査中の被検者に覚醒状態の維持に暗算負荷が有効である。検査室の明るさ、騒音や外部からの電気的ノイズに注意する。自発眼振を認める場合、回転眼振緩徐相速度に自発眼振緩徐相平均速度を加減する。

臨床的意義

振り様回転検査 (図 3A) では回転椅子を正弦波で駆動し、眼振緩徐相の最大速度の左右差、左右方向の眼振平均打数の差で DP を検出する。等角加速度回転検査 (図 3B) では椅子の等角加速度刺激で眼振緩徐相速度は指数関数で増加し定常状態に達する。定常状態の眼振緩徐相平均速度、過渡反応の時定数、眼振緩徐相振幅を求める。回転眼振検査 (図 3C) では後眼振緩徐相速度の時定数、眼振緩徐相打数、持続時間、総振幅を求める (図 3, 4)。

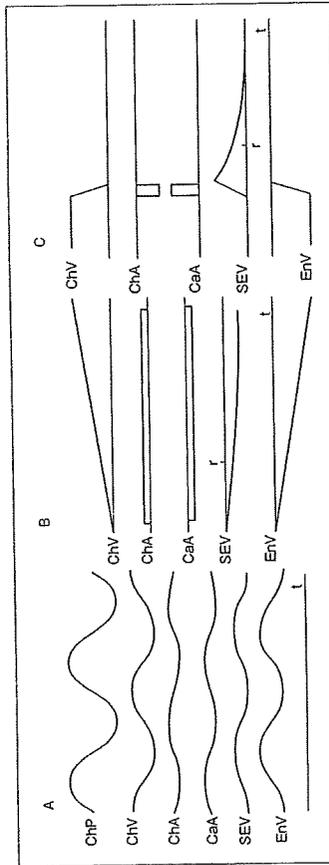


図 3 回転眼振検査の原理
 A: 振り様回転検査 (PRT)。ChP: 回転椅子位置。ChV: 椅子回転速度。ChA: 椅子回転加速度。CaA: 半規管に加わる加速度。SEV: 眼振緩徐相速度。EnV: 回転後の外半規管速度。振幅は時間 t。
 $ChP: y = A \sin(\omega t)$
 $ChV: \dot{y} = A \omega \cos(\omega t)$
 $ChA: \ddot{y} = -A \omega^2 \sin(\omega t)$
 $CaA: z = B \omega^2 \sin(\omega t)$
 $SEV: \dot{z} = -B \omega \cos(\omega t)$
 $EnV: \dot{z} = -A \omega \cos(\omega t)$
 B: 等角加速度回転検査。ChV: 椅子回転速度。ChA: 椅子回転加速度。CaA: 半規管に加わる加速度。SEV: 眼振緩徐相速度。EnV: 回転後の外半規管速度。振幅は時間 t。
 $ChV: y = at$
 $ChA: \dot{y} = a$
 $CaA: \ddot{y} = -a$
 $SEV: z = -B(1 - e^{-\tau t})$
 $EnV: \dot{z} = -ae^{-\tau t}$
 τ は時定数。B は定常状態における VOR ゲイン。e は 2.718
 C: 回転後検査。ChV ~ EnV は等角加速度回転検査と同じ。回転停止後の後眼振緩徐相速度 SEV は B e^{-t/τ} で減衰し、消失する。B は回転停止後の眼振緩徐相最大速度。τ は時定数。e は 2.718。

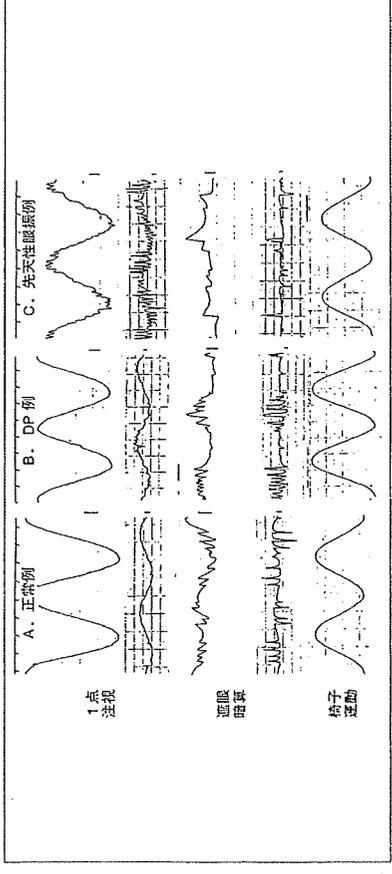


図 4 振り様 (水平面の正弦波刺激) 回転検査の ENG 記録
 A: 正常型。一点注視で椅子の動きと反対方向へスムーズな眼振運動がみられる。遠視で右左方向へ向かう眼振に差はない。
 B: 偏位神経症型。右向き自動眼振と遠視検査で左半規管低下を認めた。一点注視でスムーズな眼振運動を示し、遠視で右向き眼振は増強し、左向き眼振は弱めて振幅が左右差が大きい。
 C: 先天性眼振型。一点注視で右左方向に弱眼振の眼振を認め、遠視で右左方向とも眼振が弱縮 (ENG 記録の時定数は正弦波 0.03 秒、微分波形 0.03 秒)。

解説

検査の特徴は①回転椅子の回転軸に直交する平面の両側半規管の同時刺激、②回転軸に対する頭位を選び、すべての半規管刺激が可能な、③正確な回転角加速度負荷と眼振記録による定量的検査が可能。④検査では被検者の体に直接触れることがない、⑤ DP の検出に優れ、平衡機能の代償過程、反復迷路刺激や訓練効果を反映、などである。

(北里大学名誉教授 徳増厚二)
 (北里大学医学部耳鼻咽喉科 長沼英明)

日常臨床に役立つ

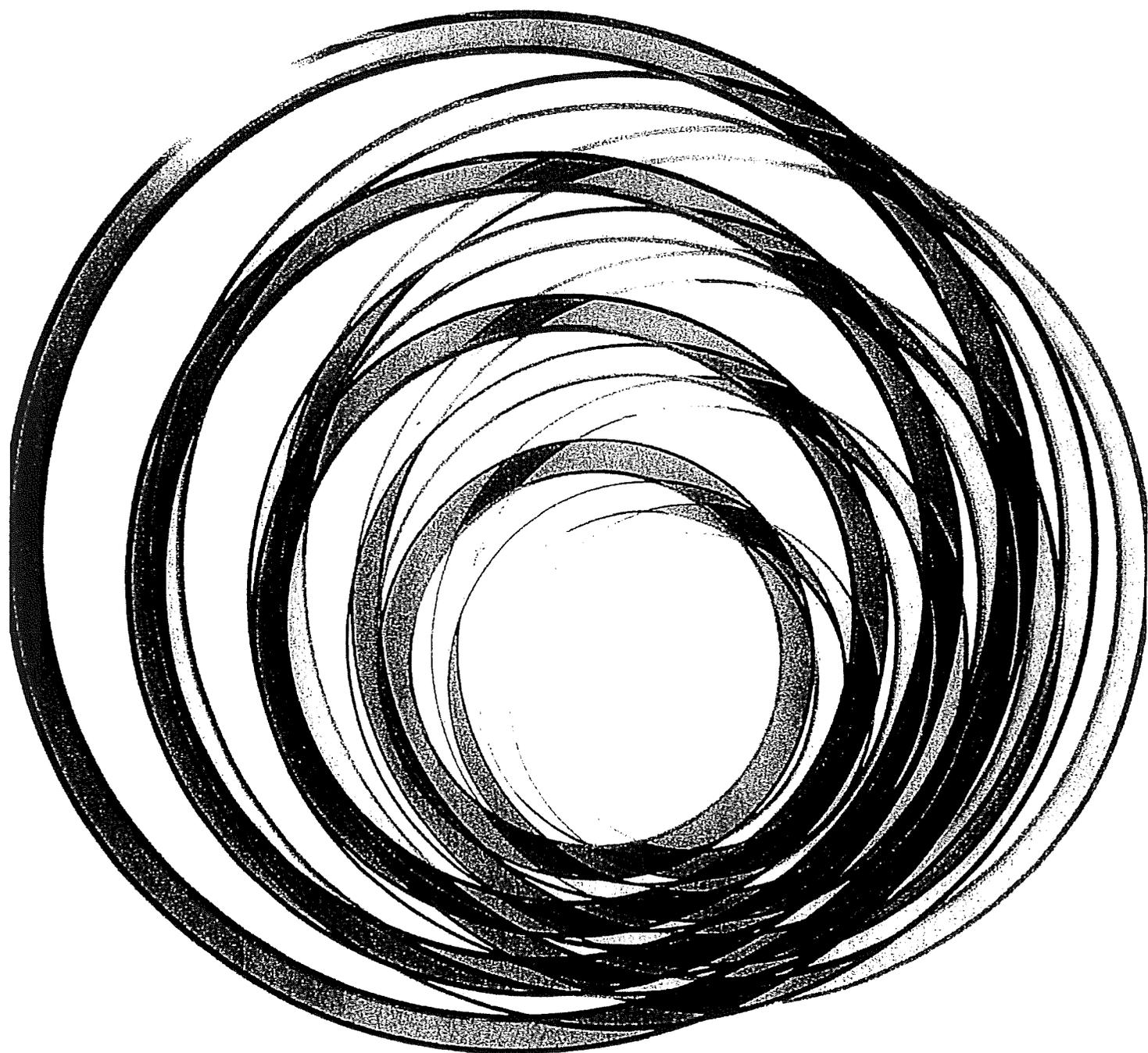
めまいと平衡障害

編 東京医科大学名誉教授
介護老人保健施設グリーンビレッジ安行施設長

内野 善生

群馬大学大学院医学系研究科耳鼻咽喉科・頭頸外科学教授

古屋 信彦



金原出版

- 19** 前庭系の代償 ————— 武田憲昭、北原 糺、宇野敦彦 139
- a 前庭代償とは? …… 139
 - b 前庭代償の神経メカニズム …… 139
 - c 前庭神経核間の交連線維抑制系と前庭代償 …… 139
 - d 前庭小脳-前庭神経核抑制系と前庭代償 …… 140
 - e 前庭代償に関与する前庭小脳-前庭神経核抑制系の神経伝達物質 …… 141
 - f 前庭代償に関与する前庭小脳プルキンエ細胞における細胞内シグナル伝達 …… 142
 - g 静的前庭代償の後期過程 …… 142
 - h 動的前庭代償 …… 143
- 20** 内耳ドラッグデリバリーと薬物療法 ————— 山下裕司、下郡博明 145
- a 経正円窓的アプローチ …… 145
- 21** 高齢者の前庭系・眼運動系 ————— 北原 糺 150
- a 高齢者の前庭系 …… 150
 - b 高齢者の中枢前庭代償 …… 154
- 22** 前庭系のリハビリテーション ————— 伊藤八次、出原啓一 156
- a 前庭障害に対するリハビリテーションの意義 …… 156
 - b 対象疾患 …… 157
 - c 訓練の実際 …… 157
 - d 症 例 …… 159
- 23** 乗物酔における視覚の役割 ————— 井須尚紀 162
- a 乗物酔の原因 …… 162
 - b 乗物酔における視界の影響 …… 163
 - c 視覚-前庭感覚の相互作用 …… 164
 - d 視覚性動揺病 …… 165
 - e シミュレータ酔・VR酔 …… 166
 - f 車載ディスプレイ …… 167
- 24** 宇宙と前庭系 ————— 肥塚 泉 170
- a 宇宙酔いと前庭系 …… 170
 - b 宇宙酔いの発症機序 …… 171

■ 山下裕司, 下郡博明

はじめに

内耳障害に対する治療法としては、従来より内服、あるいは静脈内投与といった、いわゆる全身投与法が行われてきた。しかし、内耳には内耳血管関門が存在し、血液中の薬物が内耳に到達しうるのか、到達した薬物が内耳でどれほどの濃度を維持できるのかはまったく不明であり、ヒトを対象とした臨床研究として内耳への薬物移行を研究することも、まず不可能である。薬物の種類によっては、内耳へほとんど移行しないものもあるであろう。それでは、全身投与が不確実であれば局所投与はどうであろうか。

内耳への薬物局所投与という考え方は決して新しいものではなく、数十年前から行われていた鼓室内投与法がこれにあたる。そして、最近注目されてきたのがドラッグデリバリー概念である。局所投与法の利点は、①有効な濃度の薬物を効率よく投与できる、②薬物の全身に与える影響を最小限にとどめる、この2つが挙げられる。しかし、薬物の至適濃度は、ヒトを用いた基礎研究のデータがとれない以上は動物実験に頼る以外に方法がない。

中耳、内耳の解剖学的特徴を考えると、両者を境するものは、卵円窓、正円窓の2つの内耳窓であり、また、迷路骨胞で最も中耳に突出するものは、外側半規管隆起である。また、乳突削開を行えば、内リンパ囊も近づいてくる。これらの中で、最も簡便にアプローチができる部位は正円窓である。本章では、鼓室内投与を含めたドラッグデリバリーによる経正円窓的薬物療法を中心に、内耳局所投与法について概説する。

a 経正円窓的アプローチ

1) 正円窓の解剖学的位置

鼓室内側壁は、迷路の外側で鼓室岬角という凸部をなし、後上部に卵円窓、後下部に正円窓があり内耳と接する。正円窓は、正円窓窩内において正円窓膜で閉じられている。坐位で経外耳道的に観察すると、左耳であれば正円窓窩は3時から4時の方向に位置している(図20-1)。

2) 鼓室内投与法

a) 投与方法の実際

鼓室内投与法は、内耳へ直接的に薬物を投与する簡便な方法である。しかしながら、嚥下により鼓室内に投与された薬液は容易に上咽頭に流出さ

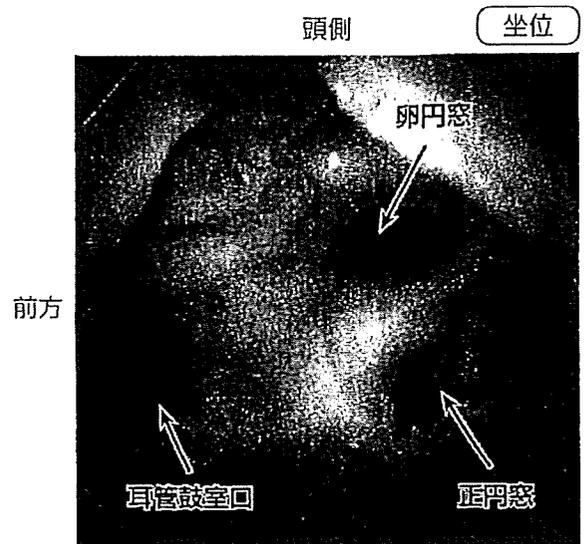


図20-1 ヒト側頭骨で、坐位外側より鼓室を観察した所見
正円窓、耳管鼓室口の位置関係がよくわかる。