

	S1DC	S1	S1C	S4D	S4DC	S4	S4C
S1D	N. S.	N. S.	N. S.	0.01	N. S.	N. S.	N. S.
S1DC		N. S.	N. S.	0.01	N. S.	N. S.	N. S.
S1			N. S.	0.01	N. S.	N. S.	N. S.
S1C				0.01	N. S.	N. S.	N. S.
S4D					0.01	N. S.	0.01
S4DC						N. S.	N. S.
S4							N. S.

表1 蝸牛中央階の面積増加率の比較

Tukey testにて有意検定を施行。危険率5%未満を有意差ありと設定した。N. S. :有意差なし。0.01 : $p < 0.01$ 。

球形囊の膜迷路に対する面積比の比較

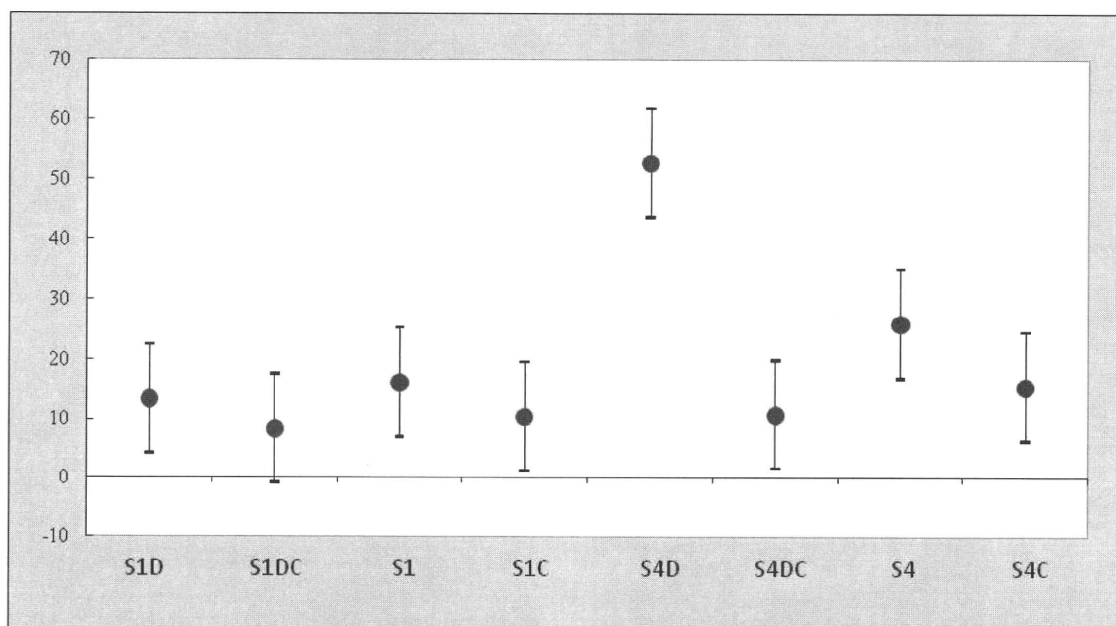


図3 球形囊の膜迷路に対する面積比の比較

	S1DC	S1	S1C	S4D	S4DC	S4	S4C
S1D	N. S.	N. S.	N. S.	0.001	N. S.	N. S.	N. S.
S1DC		N. S.	N. S.	0.001	N. S.	N. S.	N. S.
S1			N. S.	0.001	N. S.	N. S.	N. S.
S1C				0.001	N. S.	N. S.	N. S.
S4D					0.001	0.01	0.001
S4DC						N. S.	N. S.
S4							N. S.

表2 球形嚢の膜迷路に対する面積比の比較

Tukey testにて有意検定を施行。危険率5%未満を有意差ありと設定した。N. S. :有意差なし。0.01 : $p < 0.01$ 。
0.001 : $p < 0.001$ 。

4. 実験的 Arg-Vasopressin 投与動物モデルにおける蝸牛血管条の形態変化 -Vasopressin V2-receptor 拮抗薬の影響-

長沼英明¹⁾, 河原克雅²⁾, 徳増厚二¹⁾, 佐藤亮平²⁾, 落合 敦¹⁾, 岡本牧人¹⁾

1. 北里大学医学部耳鼻咽喉科・神経耳科 2. 北里大学医学部生理学

[はじめに]

近年、メニエール病の発生に Arg-Vasopressin (AVP) の関与が示唆されている^{1)~8)}。これまでの我々の報告で、AVP の投与動物モデルで聴力が低下すること⁹⁾、血管条中間細胞に細胞内浮腫と考えられる所見を認められ、AVP の効果を増大させるために脱水負荷後に同量の AVP を投与した場合はその細胞内浮腫が著明になることなどを報告してきた。今回我々は、AVP の効果を抑制させるために AVP の V2-receptor 拮抗薬投与後に同量の AVP を投与した場合の血管条中間細胞の細胞内浮腫の変化を定量的に検討した。

[方法]

100-200g の Wistar 系ラット (n = 6, 3 匹) を使用し、V2-receptor 拮抗薬: OPC-31260 大塚製薬提供、100mg/kg を経口投与し、1hr 後に Arg-Vasopressin Daiichi-sankyo, 0.02units/g を腹腔内に投与、その 1hr 後に深麻酔下に断頭し側頭骨を採取した (V2-receptor 拮抗薬群)。2.5%グルタルアルデヒドを注入する蝸牛還流固定と浸透固定の後、型どおりの方法で超薄切片を作製し電子顕微鏡下に観察した。観察面は蝸牛軸を含む平面とし、検討部位は第 2 回転の鼓室側の血管条とした。観察倍率は 2000 倍とし、血管条全体を分割して撮影し、各画像をソフトウェア上で統合、血管条全体を 1 つの画像にし、存在する液胞の面積を合計して各群で比較した。また観察面に差があると血管条、液胞の断面積が変化する可能性があるため、血管条あたりの液胞の合計面積の血管条面積に対する比 (液胞の合計面積/血管条面積) を求めた。参考として昨年本研究報告会で報告したコントロール群 (AVP と同量の生理食塩水投与)、AVP 群 (同 AVP, 0.02units/g 投与)、脱水後 AVP 群 (24hr の完全飲水制限の後、同量の AVP を投与) (各 n = 10, 5 匹) と比較した。

[結果]

血管条全体の面積は 4 群では差を認めなかった (図 1)。4 群の代表的な中間細胞の所見を図 2 に示す。中間細胞や周皮細胞には細胞内浮腫と考えられる液胞が、主に AVP 群・脱水後 AVP 群に認められた。液胞面積は脱水後 AVP 群で最も増大した。V2-receptor 拮抗薬群では中間細胞や周皮細胞の AVP による細胞内浮腫は抑制された。一つの血管条に認められた液胞の合計面積 (μm^2) はコントロール群: 30.7 ± 16.1 、AVP 群: 91.0 ± 49.2 、脱水後 AVP 群: 207.8 ± 149.9 、拮抗薬群: 38.7 ± 21.4 であり各群間にそれぞれ有意な差を認めた ($P < 0.01$) (図 3)。液胞面積比はコントロール群: 0.011 ± 0.006 、AVP 群: 0.031 ± 0.014 、脱水後 AVP 群: 0.062 ± 0.043 、拮抗薬群: 0.012 ± 0.008 であり各群間で同様に有意な差を認めた ($P < 0.01$) (図 4)。

[考察]

これまでに我々は AVP 投与動物モデルで聴力が低下することなどを報告してきたが⁹⁾、その聴力低下のメカニズムは不明である。今回の検討でも AVP 投与動物モデルで血管条中間細胞における細胞内浮腫と考えられる液胞が認められた。細胞内浮腫は組織局所の酸素供給不全を生じさせ、その結果中間細胞の機能低下をもたらし、蝸牛内リンパ電位 (EP) を低下させる可能性が示唆される。Mori ら¹⁰⁾は、AVP の投与で EP が低下しそのメカニズムは血管条の電気抵抗の増加であると報告している。またこれまでに AVP はメニエール病の発症に関連していることが報告されており⁵⁾、メニエール病の聴力の低下と、血管条中間細胞の細胞内浮

腫に伴う組織酸素分圧の低下が関連していると推測される。今回の研究で、V2-receptor拮抗薬が血管条中間細胞のAVPによる浮腫を軽減させたことにより、今後メニエール病の聴力低下の治療薬として同拮抗薬の有効性が期待される。

[結論]

本研究とこれまでの結果より、脱水によるAVPの効果を増大させる処置で主に中間細胞にみられた細胞内浮腫は著明になり、またAVPの効果を抑制させる処置で同浮腫は軽減したことにより、同浮腫はAVPと強く関連し、V2-receptorを介した反応であることが確認された。またメニエール病の治療薬としてV2-receptor拮抗薬の有効性が期待される。

[参考文献]

1. Takeda T, Takeda S, Kitano H, et al. Endolymphatic hydrops induced by chronic administration vasopressin. *Hear. Res.* 2000; 140: 1-6.
2. Sawada S, Takeda T, Kitano H, et al. Aquaporin-2 regulation by vasopressin in the rat inner ear. *Neuro Report* 2002; 13: 1127-1129.
3. Takeda T, Sawada S, Takeda S, et al. The effects of V2 antagonist (OPC-31260) on endolymphatic hydrops. *Hear. Res.* 2003; 182: 9-18
4. Kitano H, Suzuki M, Kitanishi T, et al. Regulation of inner ear fluid in the rat by vasopressin. *Neuro Report* 1999; 10: 1205-1207.
5. Takeda T, Kakigi A, Saito H, Antidiuretic hormone (ADH) and endolymphatic hydrops. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 1995; Suppl 519: 219-222.
6. Kumagami H, Loewenheim H, Beitz E, et al. The effect of anti-diuretic hormone on the endolymphatic sac of the inner ear. *Pflügers Arch.* 1998; 436: 970-975
7. Naganuma H, Kawahara K, Tokumasu K, Okamoto M. Water May Cure Patients With Meniere Disease. *Laryngoscope* 2006; 1455-1460.
8. Mhatre AN, Jero J, Chiappini I, Bolasco G, Barbara M, Lalwani, AK. Aquaporin-2 expression in the mammalian cochlea and investigation of its role in Meniere's disease. *Hear. Res.* 2002; 170: 59-69.
9. 長沼英明、河原克雅、鈴木善郎、岡本牧人、徳増厚二、山科正平、橋本晋一郎. 実験的内リンパ水腫動物モデルにおける聴覚の経時的変化の検討. *Otology Japan* 12(4): 402, 2002.
10. Mori N, Ohya A, Shugyo A, Matsunaga T: The change in the electrical resistance of the scala media produced by vasopressin. *Acta Otolaryngol (Stockh)*;104: 66-70, 1987.

血管条面積 μm^2

$p > 0.05$

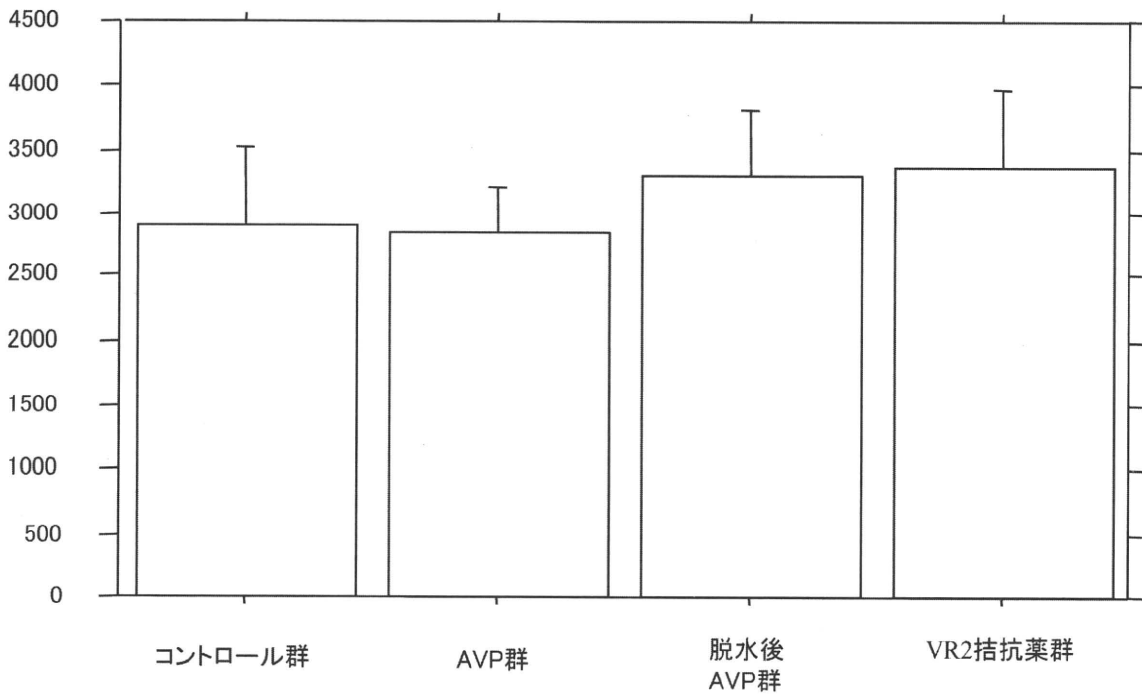


図1：血管条全体の面積の比較

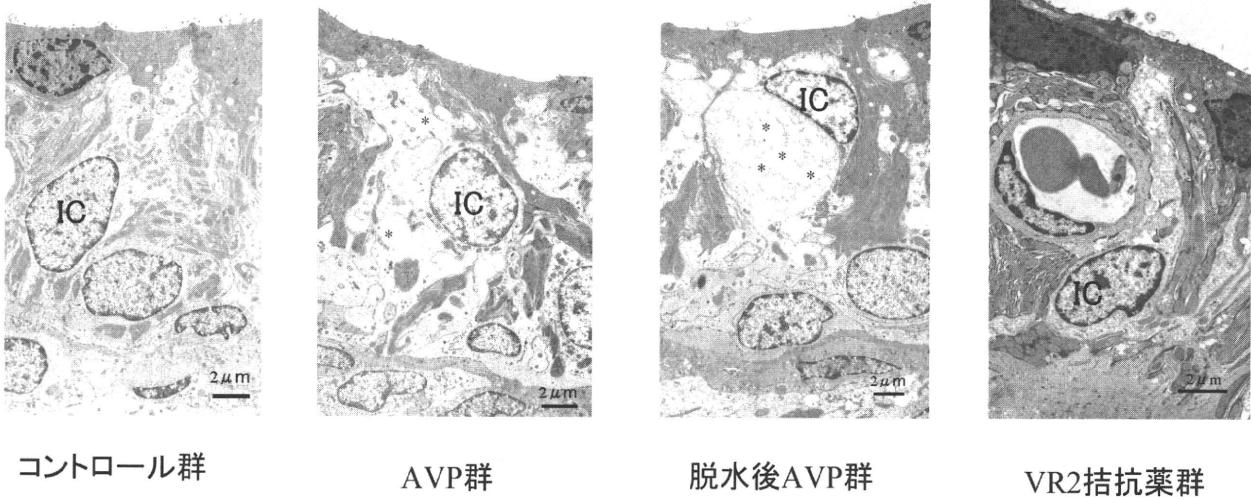


図2：3群の代表的な中間細胞の所見

IC: 中間細胞

*: 液胞

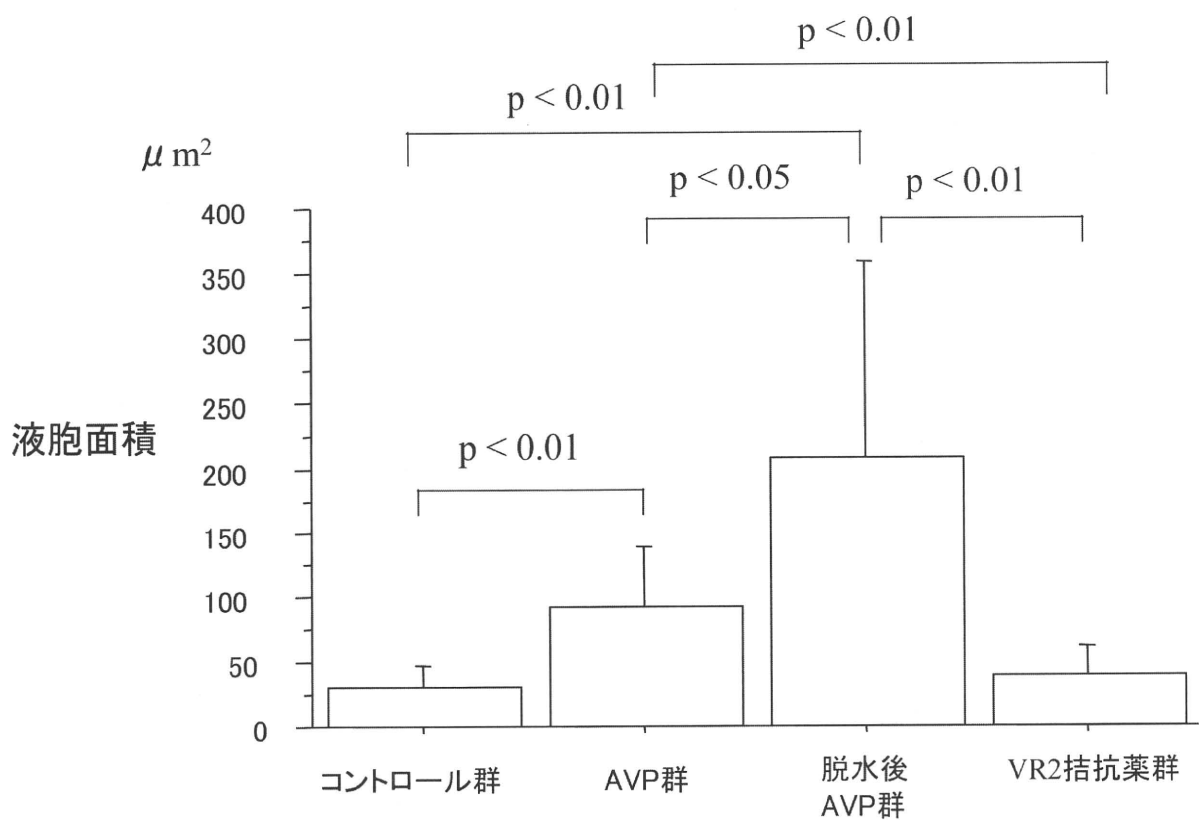


図3：液胞面積の比較

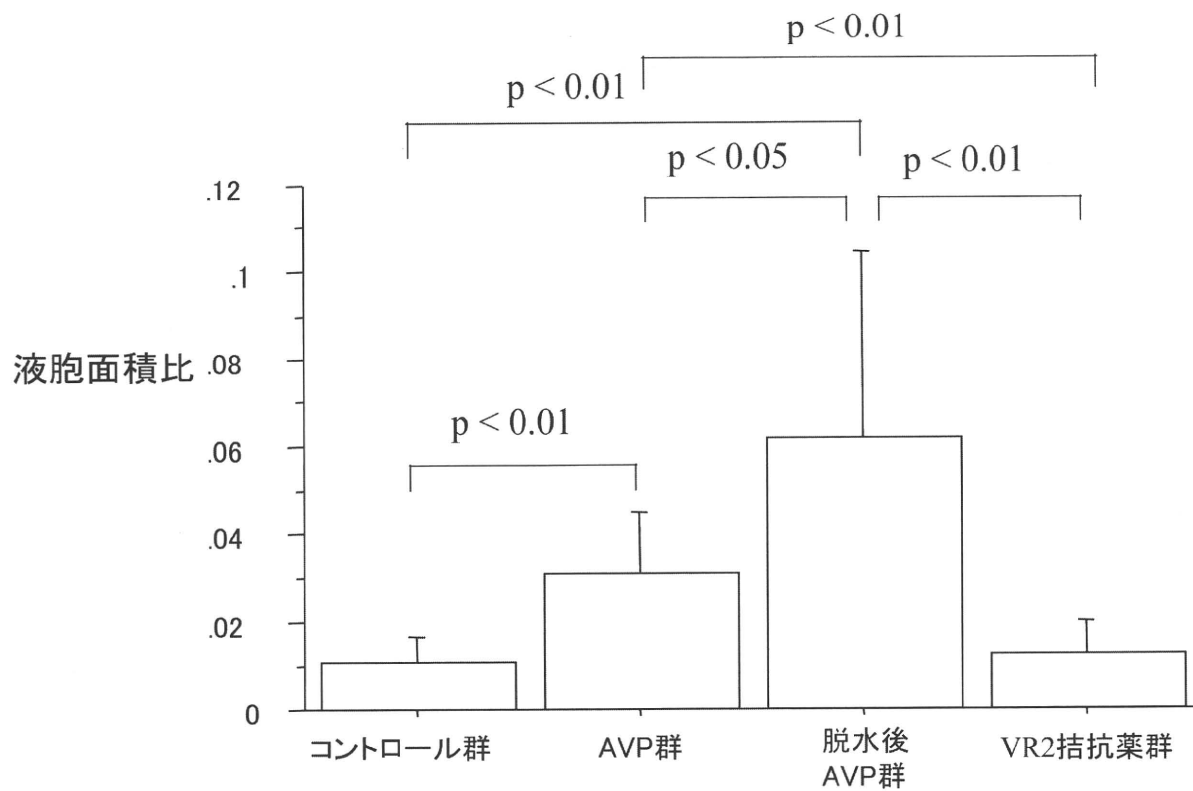


図4：液胞面積比の比較

5. 高齢者剖検例の内耳における micro RNA の発現

関根久遠¹, 池園哲郎¹, 木村百合香³, 片岡遼平², 椎葉恭子¹,
新藤 晋¹, 喜多村 健¹, 八木聰明⁵, 大久保公裕¹

1. 日本医科大学 医学部 耳鼻咽喉科
2. 国立大学法人 総合研究大学院大学
3. 地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター 耳鼻咽喉科
4. 東京医科歯科大学 医学部 耳鼻咽喉科
5. 千葉・柏リハビリテーション学院

[はじめに]

マイクロ RNA(miRNA)は20 から 25 塩基ほどの小さな非翻訳 RNA で、翻訳レベルで遺伝子発現を制御することで、発生、分化の制御や腫瘍の発生、ウイルス感染など様々な生命活動にかかわることが明らかになってきており、近年、非常に注目されている。耳科学領域においても2006年にWestonらによってマウス内耳のmiRNAの発現についての報告以来、様々な検討がされており、いくつかのmiRNAが内耳有毛細胞に特異的に発現し、有毛細胞の分化や機能維持に重要な役割を果たすことが示唆されている(Weston et al. 2006)。特にmiR-183グループは、哺乳類を含む様々な脊椎動物やショウジョウバエの感覚毛細胞、さらに線虫の感覚器の支持細胞に発現しており、感覚器の分化や機能維持に重要であることが示されている(Pierce et al. 2008)。また、その中でもmiR-96はその変異によって非症候性の進行性感音難聴DFNA50を生じることが報告されている(Mencia A et al. 2009)。このように、miRNAの機能解明は内耳の発生や機能維持、また様々な難聴遺伝子の発現制御(Sekine K et al. 2009)に関与している可能性も考えられ、メニエール病を含む内耳性疾患の疾患概念を根本的に変える可能性も考えられる。しかし、これまでヒト内耳でのmiRNAについての報告は極めて少ない。今回我々は高齢者剖検例の内耳組織を用いてmiRNA arrayによる、ヒト内耳miRNA発現の網羅的解析を行ったのでこれを報告する。

[対象と方法]

検体は、他疾患で死亡した60歳以上の高齢者9人の剖検時に側頭骨を切り出しその内耳組織から抽出した、total RNAを用いた。5例は75歳未満の高齢者群、4例は90歳以上の超高齢者であった。また、男性4例、女性5例であった。Megaplex™ RT Primer Pools および、TaqMan® MicroRNA RT Kit を用いて逆転写し、TaqMan® Universal Master Mix を用いて TaqMan® Array MicroRNA Card 上でリアルタイム PCR を行った。リアルタイム PCR には Applied Biosystems 7900HT を用い、解析には SDS v2.3、RQ manager を用いた。これらの解析結果を t-statistic ($p < 0.05$) かつ FC (≥ 2)、SAM ($p < 0.05$)、Rank products (FDR < 0.1) の3種の解析法を用いて、高齢者・超高齢者間、男女間の比較を行った。

[結果]

今回解析した60歳以上の高齢者9人のmiRNAの発現状況について検討した。このうち75歳未満の男性の1サンプルは他のサンプルと比較し、内在性コントロールの発現が極端に少なく解析から除外した。アレイで解析できるmiRNA713種のうち最少の検体で191種、最多の検体で227種の発現を認めた。このうち、8サンプル全てで検出されたものは130種あった。75歳未満の高齢者4例と90歳以上の超高齢者4例を比較したところ、t-statistic ($p < 0.05$) かつ FC (≥ 2)、SAM ($p < 0.05$) の二つの解析法において hsa-miR-30b、hsa-miR-374a の二つのmiRNAが高齢者群で超高齢者群に比して発現量が増加していた。また、男性3例、女

性5例を比較したところ、t-statistic ($p < 0.05$) かつFC (≥ 2)、SAM ($p < 0.05$)の二つの解析法において hsa-miR-183、hsa-miR-135a、hsa-miR-338-3p が男性で発現量が増加しており、hsa-let-7g、hsa-miR-532-3p、hsa-miR-28-3p が女性で増加していた。また、これまでマウスにおいて内耳に発現していることが報告されている miRNA について検討したところ、miR 30b、miR 99a、miR 100、miR 183、miR 199a3p など全てのサンプルで発現しているものも認められたが、miR 130b のように全てのサンプルで発現を認めないものもあった。さらに DFNA50 の原因遺伝子であり、内耳有毛細胞の機能維持に重要とされる miR-96 は一部で測定限界以下を示すなど発現の低下を認めた。

[考察]

今回の解析の結果、いくつかの miRNA において、高齢者群と超高齢者群の間、男女間で発現量に有意な差を認めるものがあった。また、マウスにおいて内耳での発現が報告されている miRNA についても高齢者では発現を認めないものがあり、また DFNA50 の原因遺伝子であり、内耳有毛細胞の機能維持に重要とされる miR-96 は一部のサンプルで測定限界以下であり、高齢者の内耳疾患との関連が示された。これらの結果からは加齢性難聴はのみならず、メニエール病のように、その発症に年齢の偏りや性差を認める内耳性疾患との関連性も考えられる。現在、一部の癌や神経疾患において血清や髄液中の特定の miRNA の発現状況がそれらの疾患の生化学的マーカーになることが報告されており、今後はメニエール病を含む内耳疾患の生化学的マーカーの検索においても今回の解析で得られたデータが重要な意味を持つものと考えられる。

[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 遺伝子に関する臨床的、分子生物学的・基礎的研究を進めた。これまでほとんど研究されていない内耳 miRNA についての研究は、メニエール病を含む内耳疾患への関与の可能性があり、本研究成果は、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ことが期待される。

[参考文献]

- 1) Weston MD, Pierce ML, Rocha-Sanchez S, Beisel KW, Soukup GA. MicroRNA gene expression in the mouse inner ear. *Brain Research*. 2006; 1111(1):95-104
- 2) Pierce ML, Weston MD, Fritzsche B, Gabel HW, Ruvkun G, Soukup GA. MicroRNA-183 family conservation and ciliated neurosensory organ expression. *Evolution & Development*. 2008; 10(1):106-113
- 3) Mencía A, Modamio-Høybjør S, Redshaw N, Morín M, Mayo-Merino F, Olavarrieta L, Aguirre LA, del Castillo I, Steel KP, Dalmy T, Moreno F, Moreno-Pelayo MA. Mutations in the seed region of human miR-96 are responsible for nonsyndromic progressive hearing loss. *Nature Genetics*. 2009; 41(5):609-913
- 4) Sekine K, Ikezono T, Matsumura T, Shindo S, Watanabe A, Li L, Pawankar R, Nishino T, Yagi T. Expression of cochlin mRNA splice variants in the inner ear. *Audiol Neurootol*. 15(2): 88-96, 2009.

6. メニエール病における神経内分泌ホルモン動態の検討

青木光広, 若岡敬紀, 林 寿光, 久世文也, 水田啓介, 伊藤八次 (岐阜大)

[はじめに]

メニエール病をはじめ内耳性疾患に伴う不完全治癒による難聴や耳鳴りで悩んでいる症例は多い。しかし、その治療法は確立されたものがなく、患者は妥協するしかないのが現状である。我々はいままでに、メニエール病症例では下垂体ホルモンであるバズプレッシンの分泌制御機構に異常があり、そうしたホルモンの上昇が聴力予後や耳鳴りの悪化に影響することを報告してきた^{1) 2)}。メニエール病ではめまいの制御はある程度可能であるのに対し、聴力予後は必ずしも良好ではない。そこで、メニエール病症例における神経内分泌ホルモンと聴力レベルの関連性を検討した。

[対象と方法]

対象は当大学倫理委員会の承認のもと、本研究に同意を得たメニエール病 (厚生省メニエール病調査研究班の診断基準による) 確実例 20 名である (以下、メニエール病群)。AAO-HNS による Stage I が 1 名、Stage II が 5 名、Stage III が 12 名、Stage IV が 2 名で、平均年齢は 60 ± 11 歳、男女比は 17:3 であった。なお、耳鳴の罹病期間は 47 ± 24 ヶ月であった。対照群として、耳鳴りを伴う一側感音難聴症例 (急性感音難聴例は除く) 21 名 (以下、耳鳴症群) と比較した。内訳は突発性難聴後遺症症例 7 名、それ以外の原因不明な感音難聴: 14 名である。平均年齢は 62 ± 11 歳、男女比は 18:3、耳鳴り罹病期間は 53 ± 49 ヶ月であった。

初回と 12 ヶ月後の 2 回、標準純音聴力検査、耳鳴り問診として Tinnitus Handicap Inventory (THI) と Visual Analog Scale (VAS) にて耳鳴りの大きさを質問した³⁾。また、めまい問診として Dizziness Handicap Inventory (DHI) とめまい支障度を VAS で記載してもらった。また、ホルモン検査として、午前 10 時~11 時において、座位にて採血を行い、コルチゾール (CORT)、バズプレッシン (AVP)、アルドステロン (ALD)、プロラクチン (PRL)、エストラジオール (E2)、テストステロン (FT)、デヒドロエピアンドロステロンサルフェート (DHEAS) を測定した。すべての検査はめまい間歇期に行った。

[結果]

メニエール病群では初回と 12 ヶ月後では、高音部聴力レベル (2000、4000、8000Hz)、特に 2000Hz では有意な聴力レベルの悪化を認めた。一方、耳鳴症群では変化はみられなかった。両群ともに THI、VAS とともに初回と 12 ヶ月後で有意な変化はみられなかった (表 1)。

両群において、すべての神経内分泌ホルモン平均値は正常範囲内であり、初回と 12 ヶ月後において有意な変化はみられなかった。両群間比較でも有意な差を認めたものはなかった (表 2)。

メニエール病群では初回、12 か月ともにコルチゾール値と高音部聴力レベルの間に有意な正の相関がみられた。耳鳴症群では相関はみられなかった (図 1)。なお、初回、12 か月後とともに聴力レベルとホルモン値の間に有意な差を認めたものは、コルチゾール以外は認めなかった。

CORT/DHEAS はうつ病や認知症症例で高く、抑うつ状態の指標としての有用性が報告されている⁴⁾。このことから CORT/DHEAS と THI との相関を検討すると、メニエール病群では両者の間に有意な正の相関がみられた。特に、THI が 40 以下の症例では全例において、CORT/DHEAS が 0.2 以下であった。耳鳴症群ではそうした傾向はみられなかった (図 2)。

[考察]

難聴や耳鳴りは他人には理解されにくく、悩んでいる方の割合は多く、とくに高齢者ではその有症率が高い。

とくに感音難聴、いわゆる内耳や聴神経レベルの機能障害でおきた難聴は一旦固定してしまうと回復は難しいとされる。様々な治療が試みられているが、耳鳴や固定した感音難聴への有効な治療法はいまだなく、一般的には治らないものとされている。

耳鳴りは睡眠導入を妨げ、日常生活活動を制限させ、抑うつ状態を誘導する場合が少なくない。そうした症例では耳鳴り自体がストレスとして、個人にストレスとして認識される。そうしたストレスの認識は遺伝、幼少児期の発達過程、経験に基づき規定されるため、個人差が大きく、その反応も個々にみられる抑うつ、不安、怒りなどの情動反応やアルコール多飲や喫煙、運動不足ならびに睡眠障害といった行動反応により影響をうける。以上のストレスの認識後、生物学的反応が引き起こされるが、同時に生体内ではアロスタシスといわれる適応反応が起こる⁵⁾。その結果、生体の恒常性は保たれるが、その代償が、アロスタティック負荷として、生体内に臓器障害を進行させる。たとえば、交感神経系や視床下部・下垂体・副腎系のストレスシステムが活性化され、カテコラミン、コルチゾール、プロラクチンなどがそれぞれのシステムのメディエーターとして、生体内に影響を及ぼす。個々により、こうしたアロスタティック負荷が過大反応したり、回復遅延が生じることで様々な病気が生じると考えられている⁵⁾。

メニエール病症例の聴力に関してはいままでに多くの報告があり、初期には低音障害型、2000Hz付近の聴力レベルは保たれる一方、高音部障害に至る、いわゆる“逆V字型”を示す症例が20%程度存在するといわれている。そして、5年程度の罹病期間を経て、平均50dB前後の水平型感音難聴を呈するとされる⁶⁾。したがって、2000Hz前後の聴力をいかに進行させないかが、メニエール病症例の聴力予後規定する因子となりうる。しかし、こうした周波数域の聴力レベルがどのようなメカニズムで進行するかはいまだ不明である。

今回の結果では、コルチゾールが高い症例ほど、高音部聴力レベルの悪化がみられた。とくに2000Hzでは12週間後には有意に聴力悪化を認めた。耳鳴り苦痛度スコアであるTHIはCORT/DHEASに相関していた。DHEASは副腎皮質ホルモンであるが、抗コルチゾール効果があり、DHEASが低下するとCORTの分泌制御が不能になり、過大分泌につながるとされる⁷⁾。また、加齢による減少はよく知られており、今回もメニエール病群では年齢とDHEASの間には有意な逆相関がみられた。

また、慢性ストレス症例やうつ病症例ではコルチゾールが高いことが知られている^{5, 8)}。今回用いた、CORT/DHEASはうつ病や認知症症例で高く、抑うつ状態の指標としての有用性が報告されている⁹⁾。こうしたコルチゾールの上昇は海馬を委縮させ、海馬がもつネガティブフィードバック機能を低下させる。そのため、耳鳴りによる慢性ストレス負荷の状態ではよりコルチゾールを増加させ、ストレスホルモンに対する中枢性制御が機能不全に陥っていく可能性がある⁸⁾。また、コルチゾール受容体は内耳に多く存在していることは知られており、コルチゾールが高い状態では内耳、とくに内リンパのオモホスターシスに影響が及ぶ可能性がある[Rarey KE, et al. 1996]。動物実験のみならず、ストレス負荷によるコルチゾール上昇は聴覚域値を一過性に上昇させることが報告されている⁹⁾。

[結論]

コルチゾールが、メニエール病における聴力予後、とくに高音部の聴力予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。THIが高い症例ほどCORT/DHEASが高いことを考えると、耳鳴りに対する不安やいらだちなどの情動反応をいかにコントロールするかが聴力予後に影響を与える可能性がある。しかし、そのメカニズムは不明な点も多く今後の研究が期待される。

[参考文献]

1. Aoki M, Asai M, Nishihori T, Mizuta K, Ito Y, Ando K. The relevance of an elevation in the plasma vasopressin levels to the pathogenesis of Meniere's attack. *J Neuroendocrinology* 2007; 19: 901-906.

2. Aoki M, Hayashi H, Kuze B, Mizuta K, Ito Y. The association of the plasma vasopressin level during attacks with a prognosis of Meniere's disease. *Int J Audiology* 2010; 49: 1-6.
3. Newman CW, Jacobson GP, Spitzer JB. Development of the Tinnitus handicap Inventory. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1996; 122: 143-148.
4. Garner B, Phassouliotis C, Phillips LJ, Markulev C, Butselaar F, Bendall S, Yun Y, McGorry PD. Cortisol and dehydroepiandrosterone-sulphate levels correlate with symptom severity in first-episode psychosis. *J Psychiatric Res* 2011; 45: 249-255.
5. McEwen BS. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Res* 2000; 886: 172-189.
6. Stahle J, Friberg U, Svedberg A. Long-term progression of Meniere's disease. *Acta Otolaryngol Suppl* 1991;485: 78-83.
7. Orentreich N, Brind JL, rizer RL, Vogelman JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 551-555.
8. Axelson DA, Doraiswamy PM, McDonald WM. Hypercortisolemia and hippocampal changes in depression. *Psychiatry Res* 1993; 47: 163-173.
9. Fehm-Wolfsdorf G, Soherr U, Arndt R, Kern W, Fehm HL, Nagel D. Auditory thresholds elevated by stress-induced cortisol secretion. *Psychoneuroendocrinology*. 1993; 18: 579-589.

表1 メニエール病群と耳鳴症群における聴力レベル、耳鳴りおよびめまい問診 (*: baseline と 12weeks で有意な差あり、 $p < 0.05$)

		メニエール病群		耳鳴症群	
		baseline	12 weeks	baseline	12 weeks
難聴耳 聴力レベル	4分法	52.0±16.0	53.7±15.5	61.7±30.5	61.1±31.9
	高音部	54.4±9.7	56.5±10.1*	66.3±29.1	67.0±28.6
耳鳴	THI	43.9±21.1	40.3±20.7	34.4±21.1	33.5±23.6
	VAS	5.7±2.0	5.9±1.8	5.2±2.3	5.2±2.5
めまい	DHI	22.4±20.1	24.1±25.2		
	VAS	1.9±1.7	2.5±2.9		

表2 メニエール病群と耳鳴症群での内分泌ホルモン動態

		メニエール病群		耳鳴症群	
		baseline	12 weeks	baseline	12 weeks
コルチゾール (μg/dl)	CORT	10.0±3.6	9.9±5.0	11.7±3.9	11.6 ±3.1
バソプレッシン (pg/ml)	AVP	1.1±0.3	1.2±0.3	1.6±1.0	1.9±1.4
アルドステロン (pg/ml)	ALD	96.1±41.6	98.5±33.9	86.2±34.1	99.2±41.5
プロラクチン (ng/ml)	PRL	8.8±2.4	8.3±2.6	8.1±2.3	8.5±3.6
エストラジオール (pg/ml)	E2	21.6±35.2	45.3±103.3	27.0±38.9	19.9±22.7
テストステロン (pg/ml)	FT	1.3±2.2	1.3±02.2	1.1 ±1.75	0.9±1.5
デヒドロエピアンドロステロンサルフェート (μg/dl)	DHEAS	91.5±72.5	92.9±74.3	92.2±50.8	99.0±54.2

図1 メニエール病群における高音部聴力レベルとコルチゾールの相関

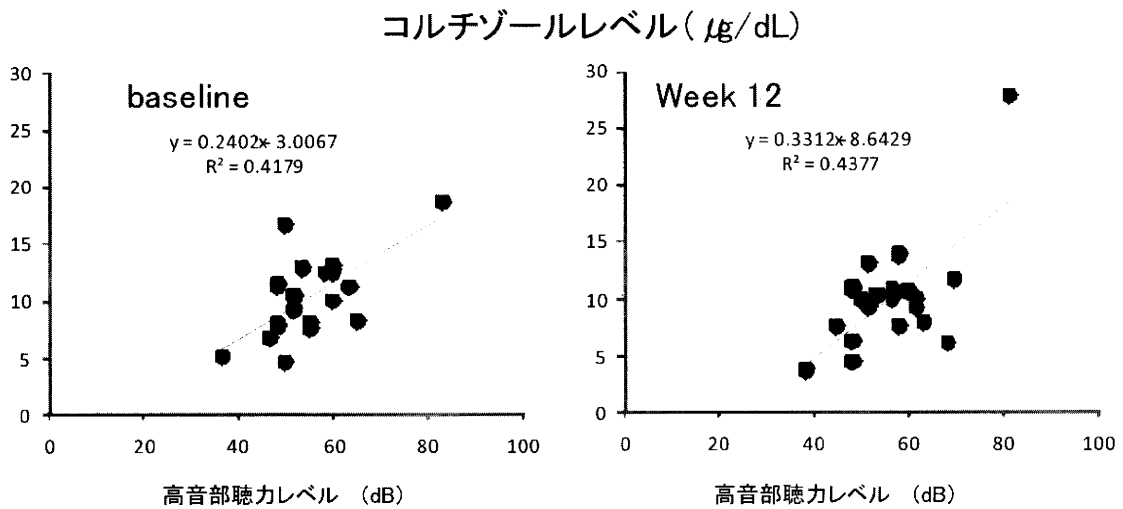
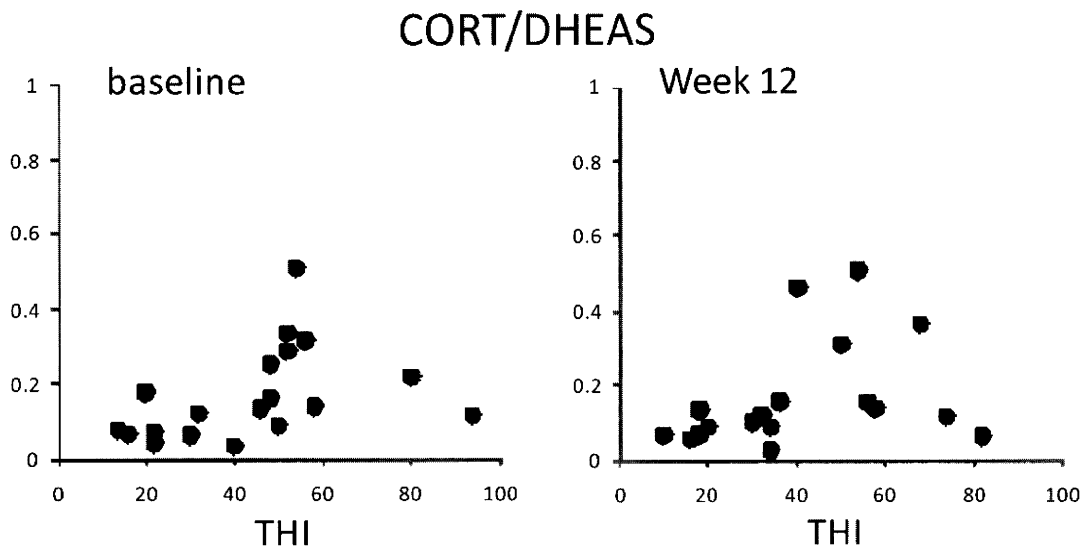


図2 メニエール病群におけるTHIとCORT/DHEASの相関



7. 前庭小脳プルキンエ細胞自発性興奮性電流における特徴と 無酸素無グルコース刺激に対する易感受性

高安幸弘, 紫野正人, 高橋克昌, 古屋信彦 (群馬大)

[はじめに]

小脳虫部に存在する前庭小脳領域 (Lobules IX, X) は、末梢前庭感覚器および前庭神経核と直接的な線維連絡を持ち、前庭神経核における興奮性の制御に深く関与する。前庭感覚器からの afferent は直接、前庭小脳に入力するものと、前庭神経核を介するものがあり、いずれも苔状線維として小脳皮質の顆粒細胞に達し、顆粒細胞からの平行線維はプルキンエ細胞の樹状突起と連絡する。1つのプルキンエ細胞に対し数万もの顆粒細胞の線維が入力し、従って、この顆粒細胞の自発発火は、プルキンエ細胞からの電気生理学的記録により自発性興奮性シナプス後電流として記録され、興奮性の指標となる。

椎骨脳底動脈循環不全症 (VBI) は一過性のめまい患者によく見られる病態で、小脳脳幹への一時的な血流障害が原因の1つと考えられる。脳における虚血性障害の重要なメカニズムの1つに興奮毒性が知られ、もともと興奮性の高い前庭小脳領域は虚血時に他の領域に比べてより傷害されやすいと思われる。前庭小脳領域とその他の小脳領域とで、虚血性刺激に対する反応性の違いについて検討した。

[対象と方法]

生後3-4週齢のラットを用い、前庭小脳である虫部Lobule IX, X領域プルキンエ細胞における自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) をパッチクランプ法を用いて記録し、その頻度と振幅を定量的に解析した。電極の抵抗は3-5M Ω 、細胞内液 (voltage clamp) はCs-gluconateを使用した。記録は「生理的条件」と「虚血条件」とで比較した。虚血状態は、ニューロンの栄養源を除去した灌流液を流すことで作り出した。すなわち細胞外液を、酸素なし (N₂+CO₂ガス)、グルコースなし (sucroseで浸透圧調整) に置換した (Oxygen-Glucose Deprivation; OGD)。今回、興奮性入力にフォーカスを当てて実験を行ったため、細胞外液中には常にGABA受容体ブロッカーのピクロトキシンを使用した。

[結果]

- 1) Lobule IX, X領域のsEPSCは他の小脳領域と比較して有意に高いことが分かった。これは前庭小脳領域の顆粒細胞の自発的な活動性が高いことを示し、前庭小脳領域はベースとなる興奮性が高いと考えられた (図1)。
- 2) 無酸素無グルコースの細胞外液の還流で5~10分の虚血刺激を行うと、Lobule IX, X領域プルキンエ細胞におけるsEPSCに著しい頻度の増加が一過性に観察された。これは、Lobule IV, V, VI領域プルキンエ細胞における同様の反応より有意に大きかった。虚血状態を解除すると、速やかに元のsEPSCの頻度に戻った (図2)。
- 3) NBQXにてsEPSCが完全に抑制されたことから、Lobule IX, X領域のsEPSCはAMPA受容体を介することが確認された。

[考察]

前庭小脳領域の自発性興奮は他の領域より有意に高いが、前庭感覚は他の感覚と異なり On-Off がなく常に働いている特徴に合致すると考えられる。前庭感覚は例えば左右方向、ニューロンからすると極性が180度異なる刺激を受ける必要があり、換言するとプラス方向とマイナス方向の双方の入力に対応する必要がある。

従って、定常状態からある程度自発発火の頻度が多く、ある程度の興奮性を保っていることは合理的であると考えられる。

このように生理条件下で高い興奮性をもつ前庭小脳領域は、虚血性刺激に対し感受性が高かった。興奮毒性をベースとする虚血性神経障害を想定した場合、興奮性の高い領域に虚血に対する脆弱性が生じることは自然である。前庭小脳領域は、その中枢神経系の役割上、ある程度高い興奮性を維持する必要がある、それゆえ虚血に対する易感受性を併せ持っている可能性がある。これらは、中枢神経系の循環不全においてめまい症状が最も生じやすいという病態生理を示唆する所見である。

[結論]

前庭小脳における顆粒細胞の自発発火は有意に他領域のものより多く、前庭小脳領域はベースとなる興奮性が高いと推測された。また、虚血刺激に対する自発発火の増加も前庭小脳に有意に高く、虚血に対する易感受性が示唆された。

[参考文献]

- ・ Barmack NH. Central vestibular system: vestibular nuclei and posterior cerebellum. *Brain Res Bull.* 60:511-541, 2003
- ・ Hamann M et al. The electrical response of cerebellar Purkinje neurons to simulated ischaemia. *Brain.* 128:2408-2420, 2005

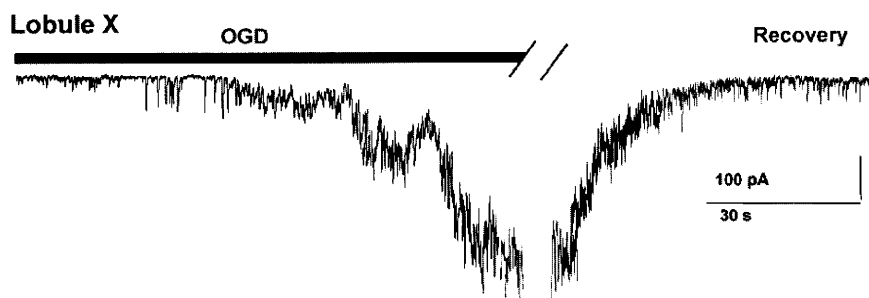


図 1

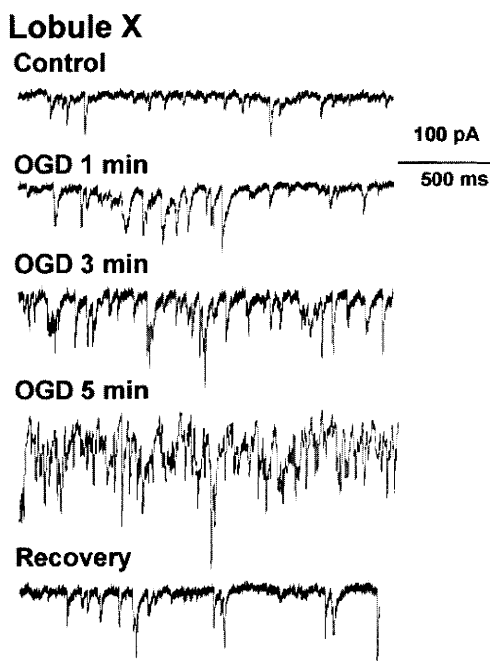


図 2

8. 内側前庭神経核ニューロンの一過性虚血に対する耐性

紫野正人, 高安幸弘, 高橋克昌, 古屋信彦 (群馬大)

[はじめに]

椎骨脳底動脈循環不全症 (VBI) は、蝸牛症状を伴わない一過性のめまい患者によく見られる病態であり、メニエール病非典型例 (前庭型) との鑑別にも重要である。VBIの本態は脳幹への一過性血流障害であり、Willis動脈輪の恩恵を被らない椎骨脳底動脈の解剖学的特徴が一因である。動脈硬化、頸椎の異常、血圧変動など様々な原因で血流不全が生じやすく、前庭神経核も灌流域に含まれる。VBIにおける眼振は水平性であることが多く、その解発の中心的役割を担うのは4つに細分化される前庭神経核のうちの内側核 (MVN) と考えられている。一過性虚血における神経核としての振る舞いは、その素子である個々のニューロンの特性に反映されるため、populationとしてのニューロンの虚血時反応を調べることで推測できる。不可逆的な末梢入力遮断によるMVNの反応についての報告は数多くみられるが、一過性の可逆的な虚血負荷に対するMVNの反応については、今まで調べられてこなかった。我々はMVNの一過性脳虚血に対する耐性を調べるため、MVNニューロンに虚血刺激を与えたときの反応を電気生理学的に観察した。

[対象と方法]

生後3-4週齢 (P17-24) のWisterラットを用い、麻酔下に断頭し、小脳脳幹を摘出した。厚さ250 μ mの脳幹スライス標本作製し、スライスパッチクランプ法にて、MVNニューロンの自発発火を記録した。電極の抵抗は3-5M Ω 、細胞内液は電流固定法ではK-gluconate、電圧固定法ではCs-gluconateを使用した。虚血は、ニューロンの栄養源を除去した細胞外液、すなわち酸素なし (N₂+CO₂ガス)、グルコースなし (sucroseで浸透圧調整) のOGD (Oxygen-Glucose Deprivation) 負荷で代用した。記録は一過性の虚血負荷を再現するために、「生理的条件下」- 「5分間の虚血条件」- 「wash outして生理的条件下に戻す」ことで経時的に記録した。続いて、MVNニューロンへの抑制性入力 (sIPSC) を記録した。さらに、細胞外液中に興奮性入力であるグルタミン酸の、抑制性入力であるGABAとglycineのアнтаゴニスト (キヌレン酸、ピクロトキシン、ストリキニン) を投与して、ニューロンを孤立させた状態で、ニューロン自身の膜特性の変化を調べた。

[結果]

- 1) MVNニューロンはOGD負荷により膜電位が一過性に過分極し、やがて自然発火が消失した。5分間のOGD負荷後、生理的条件下に戻すと膜電位は回復し、速やかに自然発火がOGD負荷前の頻度まで回復した (図1)。この変化は記録した自発発火するニューロン全て (n=11) で観察できたことから、MVNで普遍的な現象と思われた (図2)。
- 2) 1) で観察されたOGD負荷による一過性の過分極が抑制性入力の増加によるものかを調べるため、MVNニューロンにみられる自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC) を観察した。OGD負荷前後でsIPSCのFrequencyとAmplitudeは有意な変化を示さなかった。ことから、抑制性入力の増加のみでは、1) で述べた現象を説明するには不十分と思われた。
- 3) アンタゴニスト存在下でMVNニューロンへの入力の遮断した条件下においてOGD負荷しても、1) と同様に膜電位の一過性の過分極がみられ、wash outにより速やかに回復した。

[考察]

OGD負荷による5分間の虚血状態で、一過性の過分極にともなう自然発火の消失が観察された。この原因と

して、1) MVNニューロンへの抑制性入力(sIPSC)の増加、2) ニューロン自身の膜特性の変化が考えられる。sIPSCはOGD負荷の前後でその頻度と振幅が変化しなかったことから、この現象を説明するには不十分と思われた。次に、種々のアンタゴニスト投与によりニューロンへの入力の遮断した条件下でも、OGD負荷によるMVNニューロンの一過性過分極とこれに伴う自然発火消失がみられた。このことはMVNニューロン自身の膜特性の変化し、虚血状態でのMVNニューロンの自然発火を規定していると考えられた。

さらに、本研究で観察できた一過性過分極は、虚血による過興奮状態と、これに伴った細胞死を避けるためのニューロン自身の防御反応とも考えられた。

[結論]

虚血により、MVNニューロンの膜電位は一過性に過分極し自発発火が消失したが、生理的条件下に戻すことで自発発火は速やかに回復し、その頻度は虚血前の状態を維持した。この現象はニューロンへの入力(興奮性、抑制性ともに)変化に依存しないことから、ニューロン自身の内因性膜特性変化によって生じると思われた。5分間程度の虚血負荷では、MVNニューロン自体は機能を回復でき、小脳や海馬と比較して、虚血に寛容であることが推測された。

[参考文献]

- 1) Takazawa et al. Membrane and firing properties of glutamatergic and GABAergic neurons in the rat medial vestibular nucleus. J Neurophysiol. 2004 Nov;92(5):3106-20. Epub 2004 Jul 7.
- 2) Singh et al. Brief ischemia causes long-term depression in midbrain dopamine neurons. Eur J Neurosci. 2007 Sep;26(6):1489-99.
- 3) Hamann M et al. The electrical response of cerebellar Purkinje neurons to simulated ischaemia. Brain. 2005 Oct;128(Pt 10):2408-20. Epub 2005 Aug 25.

図1

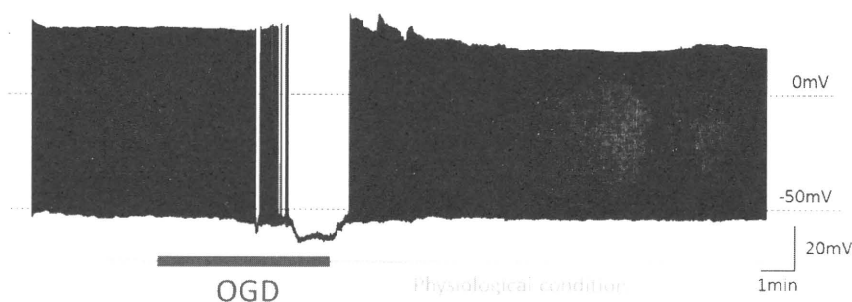
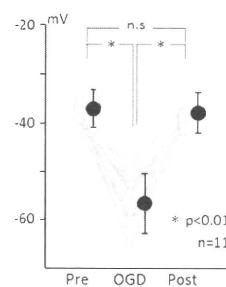


図2



9. メニエール病治療薬としてのアスタキサンチンの検討

工田昌也, 平川勝洋 (広島大)

[はじめに]

メニエール病の治療には急性期には炭酸水素ナトリウム、鎮静剤、鎮量剤などが用いられるが、発作自体は長くても数日程度で軽快する。しかし、発作を繰り返すためその予防として利尿剤、内耳循環改善剤、自律神経調節剤、鎮静剤、抗不安剤、抗うつ剤などが用いられ、なかでも内リンパ水腫の改善のためにイソソルビドが多く使用されている。メニエール病の3大症状のうちめまい発作は長期経過で見ると自発的に寛解していく傾向があるが、なかにはめまい発作が反復し、制御し難い例も存在する。一方、聴力および耳鳴などの聴覚症状は変動しがたく著明に自然寛解はしない傾向にあると推察されている¹⁻⁴⁾。これらの点を解決し、メニエール病の新しい薬剤を開発する目的で、我々はこれまで各種内耳障害の発生機序に関する研究で内耳感覚細胞の障害にはフリーラジカルが大きく関与していること、フリーラジカルを制御することで内耳障害の予防、治療ができる可能性があることを明らかにしてきた⁵⁻⁷⁾。それらの結果をもとに、抗酸化剤である、ビタミンC、レバミピド、グルタチオン、 α -リポ酸などの投与によりめまいの軽減や聴力の回復に効果があることを報告してきた⁸⁾。しかしながらその効果には限界があり、新しい薬剤を短索する必要が出てきた。そこで、今回、新しい薬剤の候補として、フリーラジカルの制御という目的に対して、より強力な抗酸化作用を持つアスタキサンチン (AST) の内耳障害軽減作用について検討した。

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常の成熟、有色モルモット (体重 250-300g) を使用した。動物はネブタールによる深麻酔下に断頭、末梢前庭器を摘出し、一部は機械的方法により単離有毛細胞を作製した。最初に AST のフリーラジカル産生に対する作用を前庭器での NO、活性酸素種 (ROS) の産生を指標に検討した。摘出卵形囊、半規管ならびに単離有毛細胞は、 $10\ \mu\text{M}$ DAF-2DA、 $20\ \mu\text{M}$ DHTMRos により 20 分間の loading を行い、 1mM GM の負荷による NO、ROS の産生を検討した。加えて $10\ \mu\text{M}$ AST による NO、ROS の産生の抑制能を検討した⁹⁾。

次に、AST の感覚細胞障害予防効果を GM による感覚細胞死を指標に LIVE/DEAD system を使用し検討した。実際には摘出卵形囊、半規管、単離有毛細胞を HBSS 中にて培養し、 $10\ \mu\text{M}$ AST による 2mg/ml GM 負荷後の感覚細胞の生存率に及ぼす影響を検討した¹⁰⁾。

[結果]

GM 刺激による NO、ROS の産生に及ぼす各種薬剤の影響について、AST を投与した場合には、GM 刺激による前庭感覚細胞での NO と ROS の産生は有意に抑制された (図 1)。

GM による前庭感覚細胞の生存率の低下に及ぼす AST の影響を検討した結果、AST の投与により前庭感覚細胞障害はいずれの時点においても抑制され、GM 投与 2 時間後の時点で比較すると GM 投与で $51 \pm 8.0\%$ に低下した前庭感覚細胞生存率は $81 \pm 13.0\%$ と有意に軽減された ($p < 0.01$) (図 2)。

[考察]

内耳障害の原因には感染、老化、耳毒性薬剤など様々なものが考えられるが、近年の研究により、内耳障害をきたすような病態では、その原因のいかんに関らず共通した障害機構が存在することが明らかになっており、なかでも NO や活性酸素をはじめとするフリーラジカルが大きな役割を果たしている⁵⁻⁷⁾。このような

観点から我々はフリーラジカルを制御することで内耳障害の予防や治療が可能になることを報告してきた。今回、メニエール病に対する新しい薬剤の候補として、AST の作用をフリーラジカルの観点から検討した。AST は赤橙色を呈するカロテノイドの中のキサントフィルの一種で、主に海産物の筋肉や体表に多く含まれている。サケの魚肉部分や、イクラやスジコにも AST が多く含まれており、また、タイやキンメダイ、メバル、キンキ、ニシキゴイ、金魚といった魚の表皮や、エビ、カニの甲殻や身の赤身も AST によって生み出されている。AST は活性酸素の中でも特に毒性の強い「一重項酸素」の酸化反応と、体内の組織を連鎖的に障害していく「過酸化脂質」の生成を抑える力が強く抗酸化力はビタミン E の 1,000 倍に及ぶとされている。その応用は広範囲に及び、糖尿病合併症の抑制、眼疾患の抑制や眼精疲労の改善、癌予防、抗疲労作用などが報告されている¹¹⁾。

今回の検討の結果、AST に内耳でのフリーラジカルの産生を抑制する作用があること、その結果として GM による内耳障害の軽減作用があることが明らかとなった。AST のフリーラジカル抑制作用については、AST が ROS と NO の産生を抑制すること、それにより神経保護作用を示すことが小脳や眼の研究により明らかになっているが¹¹⁾、今回の結果により AST は前庭感覚細胞においても感覚細胞の障害抑制作用を示すことが明らかとなった。前述したように AST の抗酸化作用はビタミン C やビタミン E などと比較しても非常に強力であり、今回の結果と我々のこれまでの検討をあわせると、AST はメニエール病の治療に応用可能な薬剤と考えられ、今後、実際の臨床応用を検討すべきであると思われた。

[参考文献]

- 1) 竹森節子：メニエール病の長期観察. 厚生省特定疾患 前庭機能異常調査研究班平成 7 年度研究報告書. 142-143, 1996.
- 2) 竹田泰三：メニエール病難聴の長期観察. 厚生省特定疾患 前庭機能異常調査研究班平成 7 年度研究報告書. 144-145, 1996.
- 3) 松永 喬、他：メニエール病の長期観察例の検討. 厚生省特定疾患 前庭機能異常調査研究班平成 7 年度研究報告書. 146-147, 1996.
- 4) 山中敏彰、他. メニエール病に対する薬物療法の短期および長期評価- 自然経過を考慮した検討- . *Equilibrium Res* 56:594-600, 1997.
- 5) Takumida M, Zhang DM, Anniko M: Localization of nitric oxide synthase isoforms (I, II and III) in the endolymphatic sac of the guinea pig. *ORL* 59:317-321, 1997.
- 6) Takumida M, Anniko M, Popa R: Possible involvement of free radicals in lipopolysaccharide-induced labyrinthitis in the guinea pig: a morphological and functional investigation. *ORL* 60:246-253, 1998.
- 7) Takumida M, Popa R, Anniko M: Free radicals in the guinea pig inner ear following gentamicin exposure. *ORL* 61:63-70, 1999.
- 8) Takumida M, Anniko M, Ohtani M: Radical scavengers for Meniere's disease after failure of conventional therapy: A pilot study. *Acta Otolaryngol* 123:697-703, 2003.
- 9) Takumida M, Anniko M: Simultaneous detection of both nitric oxide and reactive oxygen species in guinea pig vestibular sensory cells. *ORL* 64:143-147, 2002
- 10) Takumida M, Anniko M: Brain derived neurotrophic factor and nitric oxide synthase inhibitor protect the vestibular organ against gentamicin ototoxicity. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 122:10-15, 2002.
- 11) Yuan J-P, Peng J, Yin K, Wang J-H: Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Mol Nutr Food Res* 54: 1-16, 2010.

図1：アスタキサンチンによるNO、ROS 産生の抑制

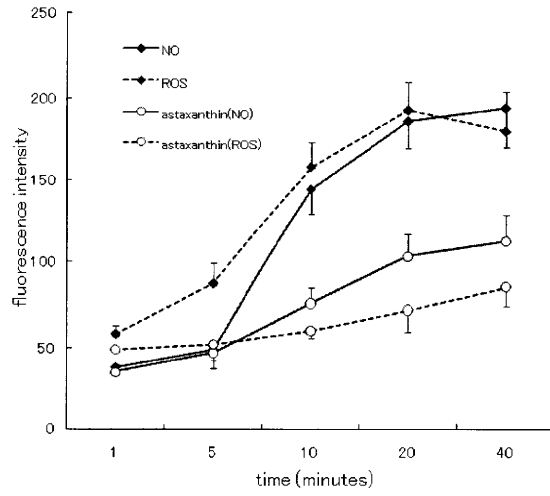
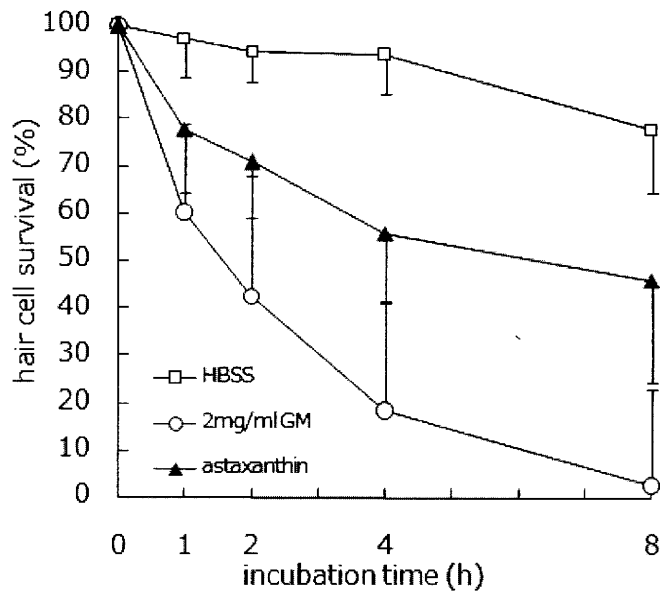


図2：アスタキサンチンによる感覚細胞障害軽減



10. ラタノプロストによる内リンパ水腫の軽減

工田昌也, 平川勝洋 (広島大)

[はじめに]

メニエール病の治療には浸透圧利尿剤や内耳循環改善剤などが主として用いられているが、これらの治療でコントロールが得られない場合プロスタグランジンが使用される場合がある。実際、 PGI_2 ¹⁾や $\text{PGF}_{2\alpha}$ ²⁾がメニエール病のめまいの改善に有効であったとの報告も認められる。我々は、マウス内耳におけるプロスタグランジン受容体 (PR) の局在を検討し、内耳には8種類のPRが程度の差はあれ、各部位に発現しており、それぞれ様々な機能に関連していること、中でも EP_4 、FP、IPは内耳の各領域に強く発現しており、内耳の機能維持や障害からの回復に大きな役割を果たしていることを報告した³⁾。それをもとに、今回は、メニエール病治療におけるプロスタグランジンの有用性を検討する目的で、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 誘導体であるラタノプロストを鼓室内に投与することで、バゾプレッシン投与による実験的内リンパ水腫の形成が抑制されるかどうかについて検討した。

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常、8週齢のCBA/Jマウスを使用した。動物にはバゾプレッシン (VP) $50\mu\text{g}/\text{kg}$ (体重) を1日1回、5日間連日皮下投与し、左耳にラタノプロスト ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) 0.1ml を経鼓膜的に1日1回、5日間連日投与した。これらの動物は薬剤の最終投与終了1日後に深麻酔下に断頭し、その後、側頭骨を摘出、4%パラホルムアルデヒドにて固定後、EDTAで脱灰、エタノール系列にて脱水後、水性樹脂 (JB-4[®]) にて包埋した。その後、通常の方法で切片を作製し、光学顕微鏡にて形態学的観察を行なった。

[結果]

1) バゾプレッシン投与

VP投与のみを行なった耳では蝸牛に軽度から中等度の内リンパ水腫の発現を認めた。内リンパ水腫は上方回転に加えて下方回転でも認められ、下方回転ではライスネル膜のfoldingもしばしば認められた。前庭器では卵形囊、球形囊では内リンパ水腫は軽度であったが、半規管では内リンパ腔の拡大が認められた (図1、2)。内リンパ囊の観察では内リンパ腔の大きさは拡大しており、上皮細胞の丈は低くなり、LISは縮小していた。

2) バゾプレッシン+ラタノプロスト投与

VP投与に加えてラタノプロストの鼓室内投与を行なった蝸牛では内リンパ水腫はほとんど認められないかごく軽度であった。前庭器では卵形囊、球形囊、半規管に内リンパ腔の拡大は認められず、半規管ではむしろ内リンパ腔が縮小しているものも認められた (図1、2)。内リンパ囊の観察では内リンパ腔の大きさは正常であった。

[考察]

ラタノプロスト (キサラン) はプロスタグランジン $\text{PGF}_{2\alpha}$ の受容体 (FP) の選択的作動薬であり、緑内障の治療に広く用いられている。この薬剤は房水の流出経路のうち、ぶどう膜強膜流出経路からの房水の流出効果を促進することにより眼圧降下作用が発揮すると考えられている。FP受容体は眼に広く分布することが知られており、内耳での検討では、蝸牛側壁では、血管条全体に、コルチ器では感覚細胞、支持細胞、蝸牛神経節では神経節細胞核にFPの局在が認められ、前庭器では前庭感覚細胞、暗細胞、上皮下の神経、前庭神