

3. マウス前庭器におけるアクアポリンの発現

工田昌也、片桐佳明、平川勝洋（広島大）

[はじめに]

近年、内耳液の恒常性の維持にアクアポリン (AQP) が大きく関与していることが明らかになっており、蝸牛や内リンパ嚢における各種AQPやその受容体であるバズプレッシンレセプター (V2R) の存在が報告され、メニエール病との関係も強く示唆されている¹⁻³⁾。しかしながらAQPの局在に関しては蝸牛、内リンパ嚢では多くの報告が認められるものの、前庭器における報告は数少ない。そこで今回、我々はマウス前庭器におけるすべてのAQP (AQP0-12) とV2Rの発現について、免疫組織学的に検討を行ったので報告する。

[対象と方法]

実験にはプライエル反射正常のCBA/Jマウス、8週齢(体重約25g)を使用した。動物はネ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、側頭骨を摘出した。試料はEDTAにて脱灰後、4μmの厚さで凍結切片を作製、AQP0-12、V2Rに対する抗体(抗AQP0抗体: Acris Antibodies GmbH、抗AQP1, 3, 4, 5, 6, 8, 9抗体: Santa Cruz biotech、抗AQP2, 7, 10, 11, 12抗体: Novus Biologicals、抗V2R抗体: Thermo scientific)を用いて、免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。

[結果]

今回の検討ではAQP0-12のすべてが前庭器のいずれかの部位に発現していた(表1)。半規管、球形嚢、卵形嚢の感覚細胞にはV2R、AQP0-3, 5, 9-12、が発現し、AQP2, 11はcuticular plateに強く認められた。支持細胞にはAQP4, 6, 7, 8, 12が認められ、上皮化の神経ではAQP0-2, 5, 7, 9-12が発現し、基底膜ではAQP4, 6が認められた。前庭神経節細胞ではすべてのAQPとV2Rが発現しており、神経線維にはAQP0, 1, 3, 5-9, 12、V2Rが認められた。暗細胞ではすべてのAQPとV2Rが認められ、AQP1はapicalとbasolateral、AQP2はbasolateral、AQP3はbasal、AQP4はapicalとbasolateral、AQP7, 8, 9はapical、AQP0, 5, 6, 10, 11, 12は細胞質に発現していた。内リンパ嚢では上皮細胞にV2R、AQP0, 2, 3, 4, 6-12、基底膜にAQP1, 6, 8, 9の発現が認められた。

[考察]

AQPは腎臓では水の再吸収に関与し、内耳でも水代謝に関連することが示唆されているが、感覚細胞ではAQP0, -3, 5, 9-12が認められ、これまでの報告を合わせると、AQP0は感覚細胞の活動性の調節、AQP2は前庭器での神経伝達、AQP9は感覚細胞のエネルギー代謝に関係していることなどが考えられた⁴⁾。支持細胞ではAQP4, 6, 7, 8, 12が認められ、AQP4は水、イオンの恒常性の維持し、支持細胞のK⁺の上昇を相殺、AQP6は酸塩基平衡の維持、AQP7は内リンパでのK⁺代謝の調節、AQP8はAQP4と共同して水分代謝の調節を行うなどの機能が示唆された。前庭神経節のAQPも神経伝達機構に関与していることが考えられ、特にAQP1, 2は前庭での神経伝達、AQP9は前庭神経節細胞のエネルギー代謝や細胞容積の調節に関与していると思われた⁴⁾。一方、暗細胞でもすべてのAQPが認められたが、同様に内リンパの産生を行い、形態学的にも類似している血管条でAQP0, 1, 2, 3, 6, 7, 9, 11が認められている²⁾ことを考えると、暗細胞での内リンパの産生に関して、AQP2, 3は水分輸送、AQP6は水とイオンの輸送や細胞内水分調節、AQP7は水分輸送経路のexocytosisに関与し、AQP9は細胞の内リンパ腔側での水分輸送に関与することなどが考えられた。血管条で認められていない他のAQP (AQP4, 5, 8, 10, 12)についてはその機能は未だ明らかではないが、例えば、耳石の代謝に関するCaイオン(耳石)の吸収に関与している可能性などが考えられた。内リンパ嚢ではAQP5以外のすべてのAQPが認められたが、内リンパの吸収に関して、AQP2, 3, 4, 6, 7, 8は水分輸送に、AQP9は様々な代謝産物の移動に、AQP1, 6, 8, 9は基底膜での水分輸送に関係することなどが示唆された³⁾。

[結論]

卵形嚢、球形嚢、半規管、前庭神経節、内リンパ嚢でAQP0-12、V2Rの蛋白発現を認め、これらが前庭での水代謝や感覚伝達機構に関与していることが示唆された。

[参考文献]

1. Takeda T, Takeda S, Kakigi A, Okada T, Nishioka R, Taguchi D, Nishimura M, Nakatani H. Hormonal aspects of Ménière's disease on the basis of clinical and experimental studies. ORL 2009; 71 (suppl 1): 1-9.
2. Nishioka R, Takeda T, Kakigi A, Okada T, Takebayashi S, Taguchi D, Nishimura M, Hyodo M. Expression of aquaporins and vasopressin type 2 receptor in the stria vascularis of the cochlea Hear Res 2010; 260: 11-9.
3. Nishimura M, Kakigi A, Takeda T, Takeda S, Doi K. Expression of aquaporins, vasopressin type 2 receptor and Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransporters in the rat endolymphatic sac. Acta Otolaryngol 2009; 129: 812-8.
4. Barbara B. Aquaporin biology and nervous system. Current Neuropharmacology 2010; 8: 97-104.

表 1 : 前庭器でのアクアポリンの発現

	半規管					前庭神経節		内リンパ嚢	
	感覚細胞	支持細胞	基底膜	上皮神経	暗細胞	細胞体	神経	上皮細胞	基底膜
AQP0	+	-	-	+	+	+	+	+	-
AQP1	+	-	-	+	+	+	+	-	+
AQP2	+	-	-	+	+	+	-	+	-
AQP3	+	-	-	-	+	+	+	+	-
AQP4	-	+	+	-	+	+	-	+	-
AQP5	+	-	-	+	+	+	+	-	-
AQP6	-	+	+	-	+	+	+	+	+
AQP7	-	+	-	+	+	+	+	+	-
AQP8	-	+	-	-	+	+	+	+	+
AQP9	+	-	-	+	+	+	+	+	+
AQP10	+	-	-	+	+	+	-	+	-
AQP11	+	-	-	+	+	+	-	↑	-
AQP12	+	+	-	+	+	+	+	+	-
V2R	+	-	-	+	+	+	+	+	-

4. iPS細胞を用いた内耳再生治療

田浦晶子、大西弘恵、中川隆之、伊藤壽一（京都大）

[はじめに]

鳥類では内耳有毛細胞が障害されても再生するとされているが、哺乳類では、一旦障害されると再生は困難とされている。それ故、内耳障害治療として有毛細胞の再生が急務となっている。そこで本研究では、内耳再生への新規治療法を確立するために、iPS (induced pluripotent stem cell) 細胞を用いて内耳有毛細胞の再生を試みた。iPS細胞は体細胞にOct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの遺伝子を導入することでES(胚性)細胞のように様々な細胞に分化出来る細胞のことで、2006年に山中らによって報告された¹⁾。iPS細胞から有毛細胞への分化はすでに大島らによって報告されている²⁾が、分化効率が低く、鳥類の内耳組織を用いている点で誘導因子の詳細は未だに不明である。今回は鳥類ではなく、哺乳類の内耳組織を用いてiPS細胞からの分化誘導の可否について検討した。

[対象と方法]

1. マウスiPS細胞：山中研究室から御供与頂いた256H18 (Oct3/4, Sox2, Klf4: DsRed)にて標識)を用いた。大島らの方法を参考にして、まずD/S/I方法によりiPS細胞を未分化な状態から外胚葉系に分化誘導させた。さらに、bFGFを用いて内耳前駆細胞方向へと分化させた。

2. 内耳組織としては、生後2日齢のマウスの卵形嚢を採取し、iPS細胞と共培養した。またthermolysinにて上皮組織を除去し、間葉系組織のみとも共培養を行った。結果はMyo7Aおよびphalloidinにて免疫組織染色を行い、組織学的に評価した。

[結果]

卵形嚢組織との共培養により、僅かではあるが、Myo7A陽性でしかもDsRed陽性のiPS細胞が観察された。しかしながら、それらの細胞からは感覚毛は観察されなかった。しかも、卵形嚢組織とiPSの細胞集塊とは融合せずに離れて存在する傾向が見られた。一方、上皮組織を除去し、間葉系組織のみとも共培養した群では、僅かではあるが、Myo7A陽性でしかもDsRed陽性の二重陽性のiPS細胞集塊が見られ、そのclusterの中央に感覚毛様構造を認めることが出来た。また、間葉系組織のみの培養では二重陽性細胞は全く認められなかった。

[考察]

実験結果より、哺乳類の組織を用いてもiPS細胞から有毛細胞様細胞を分化誘導することが可能であった。また上皮組織が存在した場合には、有毛細胞様細胞を分化誘導することは難しかったため、上皮組織自体が何らかの誘導阻害因子を放出している可能性があると思われた。間葉組織に有毛細胞分化誘導因子が含まれている可能性が高く、今後更なる詳細な検討が必要であると思われる。

[結論]

哺乳類組織を用いてもマウスiPS細胞から有毛細胞様細胞を分化誘導することは可能であった。

[参考文献]

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126(4):663-76. 2006
2. Oshima K, Shin K, Diensthuber M, Peng AW, Ricci AJ, Heller S. Mechanosensitive hair cell-like cells from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell*. 141(4):704-16. 2010

5. Optical Coherence Tomographyを用いた内リンパ水腫の検討

柿木章伸、田久保勇也、樫尾明憲、江上直也、坂本幸士、山下真司、山唄達也（東京大）

[はじめに]

Optical Coherence Tomography (OCT) は、赤外光を用いて非侵襲的に生体組織などの不透明な構造物の断面画像を得る方法である。眼科領域ではすでに臨床応用されており、網膜や前房部の診断に用いられている。また、血管カテーテルに挿入し冠動脈壁の観察にも応用され始めている。今回我々は、OCT を用いて実験的内リンパ水腫モルモットの蝸牛を観察し、パラフィン切片を用いた組織標本と比較したので報告する。

[対象と方法]

白色モルモットを使用し、左内リンパ管・囊閉塞術を施行後4週間飼育した動物を使用し、ケタミン、キシラジンの深麻酔下に生理食塩水およびホルマリンで経心灌流の後、ホルマリンに浸漬固定を行った。さらにEDTAにて4週間脱灰を行った後、OCTにて蝸牛を観察した。OCT観察後はパラフィン固定にてHE染色標本を作製し、光学顕微鏡にて蝸牛を観察した。

[結果]

OCTによりライスネル膜の膨隆を認め、内リンパ水腫が確認され、HE染色標本で見られるのと同様の形態が確認された。しかし、HE染色では組織標本作成にかかわるアーチファクトがみとめられた。一方、OCT画像にはHE染色で認められるアーチファクトは認められなかった (図1)。

[考察]

これまでも実験動物の蝸牛をOCTにて観察した報告 (1-4) は存在するが、いずれも骨壁により探査光が減弱し十分に内部構造を映し出すことに成功していない。本研究では蝸牛を脱灰することにより内リンパ水腫を鮮明に描出することができた。また、一般的に行われている組織標本作成に要する過程を大幅に短縮しており、これらによるアーチファクトを最小限に抑えることができた。このことは、内リンパ水腫の程度を計測するうえで極めて重要な点であり、より正確な内リンパ水腫の評価を行うことができる。また、パラフィンなどに包埋することなく観察できるので、観察後すぐに分子生物学的手法を用いた研究に使用できることも大きな利点である。

[結論]

OCTは組織標本作成にかかわるアーチファクトを軽減でき、より簡便に蝸牛形態を観察できることが利点である。また、パラフィンなどに包埋することなく観察できるので、観察後すぐに分子生物学的手法を用いた研究に使用できることも大きな利点である。

[参考文献]

1. Subhash HM, Davila V, Sun H, Nguyen-Huynh AT, Nuttall AL, Wang RK (2010) Volumetric in vivo imaging of intracochlear microstructures in mice by high-speed spectral domain optical coherence tomography. *J. Biomed. Opt.* 15, 036024.
2. Lin J, Staecker H, Jafri MS (2008) Optical coherence tomography imaging of the inner ear: a feasibility study with implications for cochlear implantation. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 117, 341-346. 39
3. Sepehr A, Djalilian HR, Chang JE, Chen Z, Wong BJ (2008) Optical coherence tomography of the cochlea in the porcine model. *Laryngoscope.* 118, 1449-1451.
4. Wong BJ, Jackson RP, Guo S, Ridgway JM, Mahmood U, Su J, Shibuya TY, Crumley RL, Gu M, Armstrong WB, Chen Z (2005) In vivo optical coherence tomography of the human larynx: normative and benign

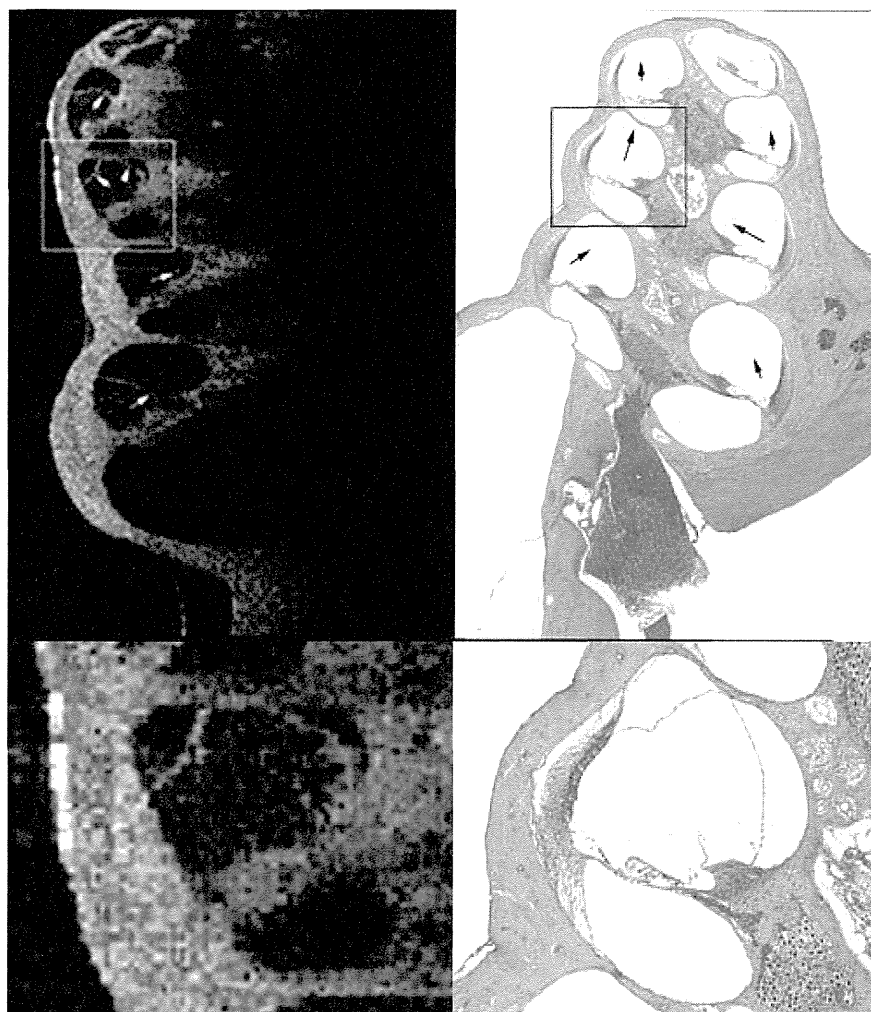


図1 OCTおよびHE染色による実験的内リンパ水腫動物の蝸牛観察

OCTによりライスネル膜の膨隆を認め、内リンパ水腫が確認され、HE染色標本で見られるのと同様の形態が確認された。HE染色ではアーチファクトがみとめられた。矢印：ライスネル膜の膨隆。下段は上段内の四角内を拡大。

6. 光コヒーレンストモグラフィー (OCT) を用いためまいの病態診断

坂本達則、十名洋介、伊藤壽一 (京都大)

[はじめに]

内耳の内部構造を生きたままで診断する方法を、現在我々は持っていない。そのため、例えば、良性発作性頭位めまいの原因が半規管内に迷入したdebrisであると言われながらも、それを臨床的に確認することは困難である。またメニエール病が内リンパ水腫と関連があるされているが、めまいが起きているときの水腫の状態がどうなっているのか、知ることは出来ない。先天性高度難聴の大部分が膜迷路奇形であるとJacklerらは報告しているが、これについても診断できるのは死後の側頭骨標本を作製した場合のみであり、臨床的には評価不能である。臨床で用いることの出来る非侵襲的な診断技術によって内耳の病態を診断し、病態に基づいた治療を目指す必要がある。

光コヒーレンストモグラフィー (OCT) は、赤外光が組織透過性を持つことを利用して非侵襲的に断層像を得る方法で、網膜、皮膚、血管内皮などの病変の評価に広く用いられつつある。我々はこれが内耳にも応用可能であると考えた。OCTによる内耳病態診断法を開発し、病態に応じた内耳治療の開発を促進したい。

[対象と方法]

(1) 内耳障害モデルを用いたin vivoでの内耳OCT

Pendred症候群のモデルマウスである*Slc26a4*ノックアウトマウス(1, 2)を用いた。生後11週の子仔において、聴性脳幹反応 (ABR) と行動評価による前庭機能評価 (Trunk curl test) (3)を行った。引き続き、全身麻酔下に内耳骨包を保ったままで蝸牛軸に平行な断面でOCT撮影を行った。撮影装置はOCS1300SS (Thorlabs) を用いた。直後に屠殺し、内耳の切片を作成しH&E染色を行った。

(2) 模擬浮遊耳石の半規管内での描出

CBAマウス (7ヶ月齢) の内耳を摘出し、10% EDTAで1週間の脱灰を行った。半規管切断部から炭酸カルシウム顆粒を挿入し半規管のOCT撮影を行った。

(3) ヒト用 ファイバー型OCTプローブの臨床開発

ヒト蝸牛に挿入できる形状のファイバー型OCTプローブを作成し、非臨床試験として安全性試験等を行った。また、臨床試験プロトコルを作成した。

[結果]

(1) 内耳障害モデルを用いたin vivoでの内耳OCT

ABR閾値の評価では、野生型 (WT) とヘテロでは良好なABR波形が得られ、聴力が良好であることが分かった。ホモではABR波形は得られず、高度難聴であることが確認された。またTrunk curl testでは、WTおよびヘテロでは、体幹を維持することが出来たが、ホモでは維持できず回転したことから、ホモで高度な前庭機能障害があることが確認された。

OCT画像と、撮像直後に屠殺して得た組織切片を比較すると、野生型 (WT) マウスの内耳において、蝸牛回転、ライスネル膜、基板などが明瞭に描出され、中央階がはっきりと同定できることがわかった。ヘテロ型では、内耳形態は正常と区別がつかなかった。ホモでは、組織切片で高度な内リンパ水腫と蝸牛回転の減少、コルチ器の変性 (有毛細胞の変性) が見られ、OCTで高度な内リンパ水腫、蝸牛回転の減少は確認できた。しかし有毛細胞の変性を含むコルチ器の変性は確認できなかった。

(2) 模擬浮遊耳石の半規管内での描出

半規管切断部から模擬耳石として挿入した炭酸カルシウム顆粒は、半規管骨包を越えて半規管内腔にOCT画像上確認することが出来た。

(3) ヒト用 ファイバー型OCTプローブの臨床開発

プローブの使用を確定し、PMDA事前相談を行った。非臨床試験として、滅菌、生体適合性、耐久性等の試験を行っている。

[考察]

非侵襲的な断層画像取得法としてOCTは応用が広がっており、眼科領域等では広く用いられつつある。内耳領域では摘出内耳においていくつかの報告があったが、今回はin vivoでもOCTによる内耳断層画像が得られることが示された。これによって、薬物投与の効果などのダイナミックな変化をOCTで捕らえる研究が加速すると思われる。

また、蝸牛だけではなく、工夫すれば前庭系でもOCTを用いて描出可能であることが分かった。これまでBPPVは画像診断が困難な疾患であった。OCTを用いることで評価できる可能性がある。

ヒトの内耳の病態の画像診断が可能であることを実証して行く。

[結論]

OCTは生体における内耳病態診断のツールとなりえる。

[参考文献]

1. Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idol JR, Buchs A, Heyman M, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet.* Nature Publishing Group; 1997 Dec;17(4):411-22.
2. Everett LA, Belyantseva IA, Noben-Trauth K, Cantos R, Chen A, Thakkar SI, et al. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet.* 2001 Jan 15;10(2):153-61.
3. Quick KK, Zhao JJ, Eijkelkamp NN, Linley JEJ, Rugiero FF, Cox JJJ, et al. TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. *Open Biol* [Internet]. 2012 Apr 30;2(5):120068-8. Available from: <http://rsob.royalsocietypublishing.org/content/2/5/120068>

7. 塩酸セルトラリンが前庭神経系に与える影響

下郡博明、菅原一真、橋本 誠、広瀬敬信、山下裕司（山口大）

[はじめに]

BDNF は前庭神経系においては重要な神経栄養因子である。しかし、外因性の BDNF を薬剤として人に投与するのは現時点では困難である。BDNF は神経系の可塑性の分子といわれる CREB によって転写がコントロールされており、CREB-BDNF 系を活性化させることで内因性 BDNF を増加させることが可能であると考えられる。抗うつ薬の慢性投与により、海馬、大脳皮質において CREB 及びその活性化型であるリン酸化 CREB が増加することが報告されている。また抗うつ薬の慢性投与により、ラットの海馬において BDNF およびその受容体である trkB 双方の mRNA の発現が CREB を介して増加するともいわれている^{1, 2)}。以上のことから抗うつ薬で CREB-BDNF 系を活性化させ、内因性 BDNF を増加させることができるのではないかと考えた。本研究の目的は、抗うつ薬である塩酸セルトラリンの慢性投与が前庭神経系に与える影響を検討することである。

[対象と方法]

実験にはハートレイ系白色モルモットを用いた。塩酸セルトラリンのヒトに対する極量をモルモットに換算すると 7.7 mg/kg となる。日本 CLEA 社で塩酸セルトラリンを含んだ特殊飼料（1 mg/10 g）を作成、おおよそ 4 mg/匹/日で 30 日飼育の後、海馬、前庭神経核、前庭神経節を摘出してから mRNA を抽出した。RT-PCR で BDNF mRNA を検出し、内部コントロールとの発色強度比で定量化した。

[結果]

塩酸セルトラリン慢性投与の有無にかかわらず、海馬、前庭神経核、前庭神経節すべてに、BDNF mRNA を認めた（図 1）。海馬においては、塩酸セルトラリン慢性投与群は非投与群に比べて BDNF mRNA の有意な増加を認めた（図 2）。しかし、前庭神経節、前庭神経核では、塩酸セルトラリン慢性投与の有無による BDNF mRNA 量の変化は認められなかった。

[考察]

今回の実験で、ヒトに用いることが可能な量の塩酸セルトラリン慢性投与でもモルモットの海馬領域では BDNF mRNA の増加をもたらすことがわかった。ただし、前庭神経節・核においては投与の有無による差は明らかではなかった。今後、BDNF のレセプターに対する mRNA 量の検討が必要であると考えられた。また、慢性投与の有無による前庭障害時の BDNF mRNA 量の差が出てくる可能性も考えられた。

[結論]

塩酸セルトラリン慢性投与により、海馬においては非投与群に比べて BDNF mRNA の有意な増加を認めた。しかし、前庭神経節、前庭神経核では、塩酸セルトラリン慢性投与の有無による BDNF mRNA 量の変化は認められなかった。

[参考文献]

1. 神庭重信、橋岡禎征、門司 晃: 抗うつ薬の薬理作用機序: 最近の知見. 第 129 回日本医学会シンポジウム: 24-30, 2005.
2. 橋本謙二: うつ病と脳由来神経栄養因子 (BDNF). 日薬理誌 127: 201-204, 2006.

図1 RT-PCRの結果

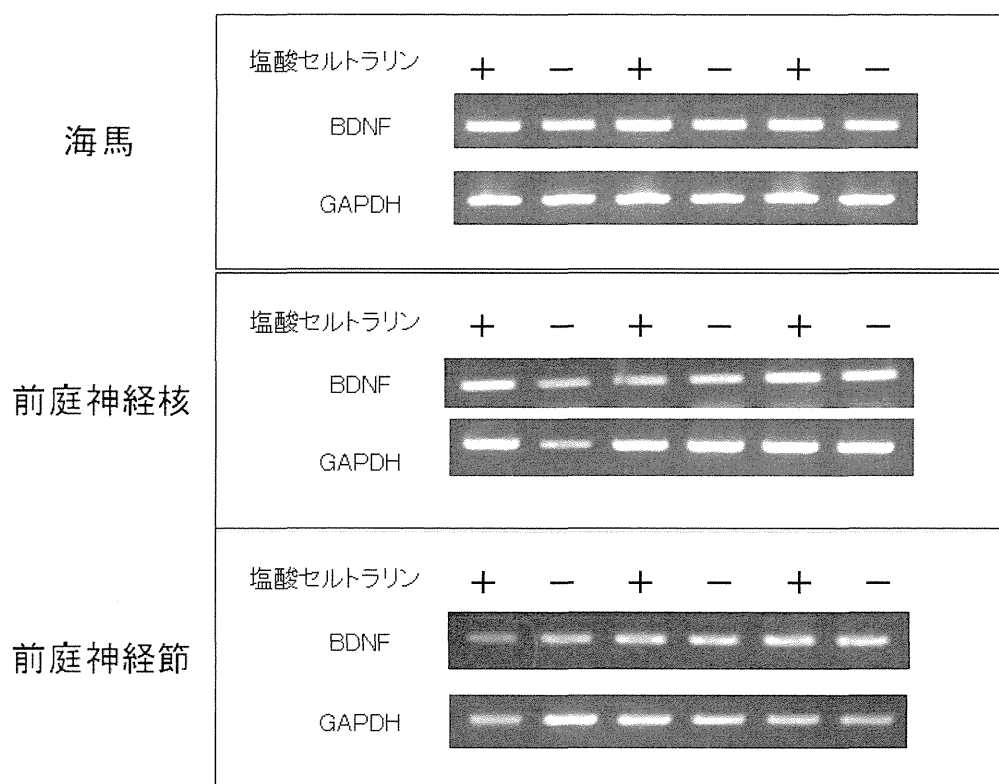
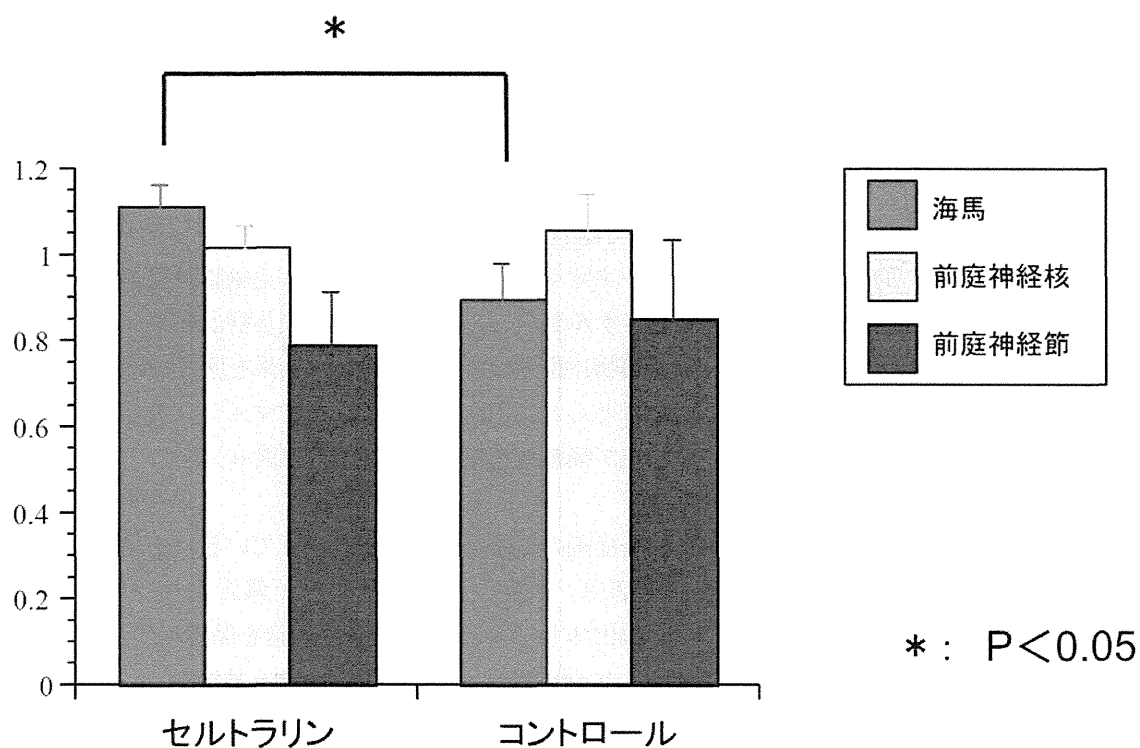


図2 発光強度比での比較



8. 難治性めまいに対する薬物療法のスクリーニング

—ゼブラフィッシュを用いて—

広瀬敬信、下郡博明、橋本誠、山下裕司（山口大）

[はじめに]

ゼブラフィッシュは容易に飼育する事ができ、一度に多く産卵し、全ゲノム配列でヒトと80%の相同性がある事等から実験動物に適しており、NIHでは、マウス、ラットに続く第3のモデル動物であると認知されている。その体表面には水流を感知する側線器があり、ゼラチン物質でおおわれた動毛をもつ複数の有毛細胞と支持細胞からなる神経小丘で構成され、構造的に三半規管膨大部に酷似する。またアミノグリコシド系薬物やシスプラチンで障害されるなど、生理学的にも内耳有毛細胞に酷似している。

一方、難治性めまいに対しては、複数の効果の異なる薬物（薬物カクテル療法）を用いることが多い。どの薬物の組み合わせが良いか検討するのに、げっ歯類を使った実験では途方もない労力と時間を要する。最終的には、様々な薬物の組み合わせによる有毛細胞保護効果を検討する予定であるが、今回は単剤で検討するために、昨年報告したネオマイシン有毛細胞障害モデルを用いて、有毛細胞保護効果候補薬物のスクリーニングを施行した。

次に、ネオマイシンによる有毛細胞障害モデルは酸化ストレスによると報告されている事から、スクリーニングされた薬物の保護機構を検討するために、酸化ストレスの評価を行った。

[対象と方法]

生後5-7日目の野生型ゼブラフィッシュを用い、48穴プレートにゼブラフィッシュを10匹入れ、1, 10, 100, 1000 μ M濃度の保護候補薬物を投与し、ネオマイシン100 μ M・1時間で暴露、4%パラホルムアルデヒドにて固定、1次抗体としてParvalbumin抗体、2次抗体としてAlexa 488抗体にて染色し標本とした。神経小丘のS01、S02、O1、O1の有毛細胞数を数え、コントロール群をと比した有毛細胞残存率を評価した。

酸化ストレスの検討は、生存したゼブラフィッシュを用い、コントロール群、ネオマイシン群、ケルセチン+ネオマイシン投与群で施行した。ケルセチン100 μ M・1時間で暴露後、ネオマイシン100 μ Mで有毛細胞を障害、酸化ストレスマーカーであるH2DCFで5分染色し評価した。

[結果]

図1にケルセチンによる例を示す。コントロールでは有毛細胞は障害されていないが、ネオマイシン100 μ M投与群では障害されている事が解る。ケルセチン+ネオマイシン投与群では、有毛細胞障害が軽減されている。これらを元に容量反応曲線を作成した（図2）。ケルセチン+ネオマイシン投与群はネオマイシン投与群に比べ、有意に有毛細胞が保護されていた。候補薬物18種類のスクリーニング結果を図3に示す。

酸化ストレスの実験では、コントロール群ではほとんど染色されないが、ネオマイシン投与群では強く染色され、ケルセチン+ネオマイシン投与群では染色が軽減されているのが解る（図4）。

[考察]

今回、同定された薬物はいずれも抗酸化剤、抗炎症剤の作用があると報告されている。また、ゼブラフィッシュのネオマイシンによる側線器有毛細胞障害は、酸化ストレスによると報告されている事から、抗酸化剤であるケルセチンがネオマイシンによる酸化ストレスを軽減し、有毛細胞を保護したと考えられた。

また、このようなスクリーニング実験を行うと、in vivoで行えば1薬剤でも数ヶ月かかるが、このモデルを使用すれば1ヶ月で数種類スクリーニングできる事から、抗めまい薬の組み合わせを同定するには、大変有用であると考えられる。

[結論]

ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞障害モデルを用いてスクリーニングを行い、ケルセチン等を同定する事ができた。更に、ネオマイシンによる側線器有毛細胞障害は、主に酸化ストレスによるものであり、抗酸化作用によって有毛細胞が保護されたと考えられた。また、ゼブラフィッシュ側線器有毛細胞障害モデルはスクリーニングに適しており、今後、抗めまい薬の組み合わせを同定するのに有用であると考えられた。

[参考文献]

Hirose Y, Simon JA, Ou HC. Hair cell toxicity in anti-cancer drugs: evaluating an anti-cancer drug library for independent and synergistic toxic effects on hair cells using the zebrafish lateral line. *J Assoc Res Otolaryngol*. 2011 Dec;12(6):719-28.

Ou HC, Santos F, Raible DW, Simon JA, Rubel EW. Drug screening for hearing loss: using the zebrafish lateral line to screen for drugs that prevent and cause hearing loss. *Drug Discov Today*. 2010 Apr;15(7-8):265-71.

Olivari FA, Hernández PP, Allende ML. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res*. 2008 Dec 9;1244:1-12.

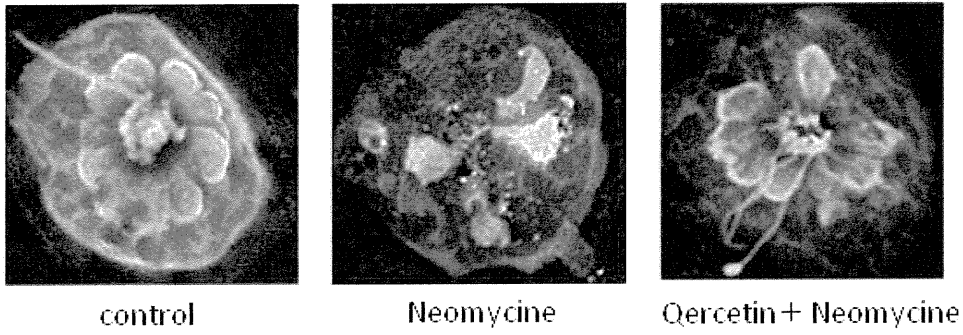


図1 有毛細胞

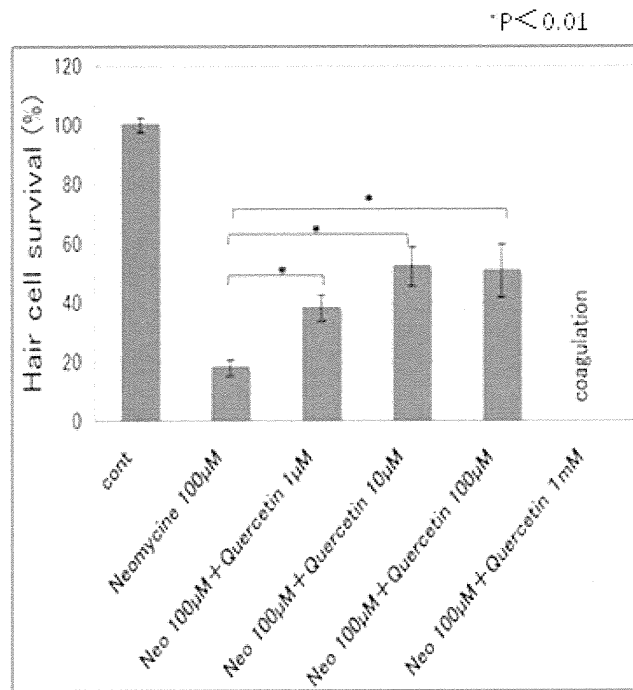


図2 容量反応曲線

*P<0.01

Drug	0 μ M	1 μ M	10 μ M	100 μ M	1 mM
Bilobalide	24.5 \pm 3.4	24.3 \pm 2.2	26.1 \pm 2.6	22.4 \pm 2.9	25.6 \pm 1.5
Caffeic acid	24.5 \pm 3.4	24.9 \pm 1.7	26.4 \pm 2.1	dead	coagulation
Catechin	23.1 \pm 1.7	27.7 \pm 3.6	29.7 \pm 1.4	22.9 \pm 2.8	dead
Coenzyme Q10	24.5 \pm 3.4	22.4 \pm 3.6	20.4 \pm 1.1	23.2 \pm 1.9	24.0 \pm 2.2
Coumarin	24.5 \pm 3.4	29.7 \pm 5.2	29.5 \pm 2.9	31.5 \pm 3.2	dead
elag acid	24.5 \pm 3.4	30.4 \pm 3.3	31.2 \pm 3.3	coagulation	coagulation
Ginkgolide B	24.5 \pm 3.4	27.0 \pm 3.2	27.9 \pm 4.0	26.3 \pm 1.2	22.4 \pm 3.2
Glycitin	24.5 \pm 3.4	29.5 \pm 2.7	26.6 \pm 2.9	23.8 \pm 1.9	coagulation
L-Ascorbic acid	23.1 \pm 1.7	20.2 \pm 1.7	20.7 \pm 2.6	19.7 \pm 1.8	33.3 \pm 6.6
Paeoniflorin	24.5 \pm 3.4	22.2 \pm 2.8	24.7 \pm 1.5	25.6 \pm 3.4	20.4 \pm 3.9
Quercetin	18.0 \pm 2.8	38.1 \pm 4.4 *	52.1 \pm 6.6 *	50.7 \pm 9.0 *	coagulation
Resveratrol	24.5 \pm 3.4	24.3 \pm 2.5	34.0 \pm 7.7	33.0 \pm 3.5	dead
Riboflavin	23.1 \pm 1.7	22.2 \pm 3.6	25.2 \pm 2.5	23.2 \pm 2.7	coagulation
Rutin	24.5 \pm 3.4	26.3 \pm 1.5	21.5 \pm 2.6	24.5 \pm 2.1	coagulation
Secoisolariciresinol	24.5 \pm 3.4	32.0 \pm 3.3	33.3 \pm 2.8	32.6 \pm 2.8	21.8 \pm 1.9
Tannic acid	24.5 \pm 3.4	29.2 \pm 1.6	55.8 \pm 2.5 *	coagulation	coagulation
Vitamin E	24.5 \pm 3.4	33.2 \pm 2.0	coagulation	coagulation	coagulation
Xanthohumol	23.1 \pm 1.7	23.7 \pm 2.3	coagulation	coagulation	coagulation

図3 スクリーニング結果

(%)

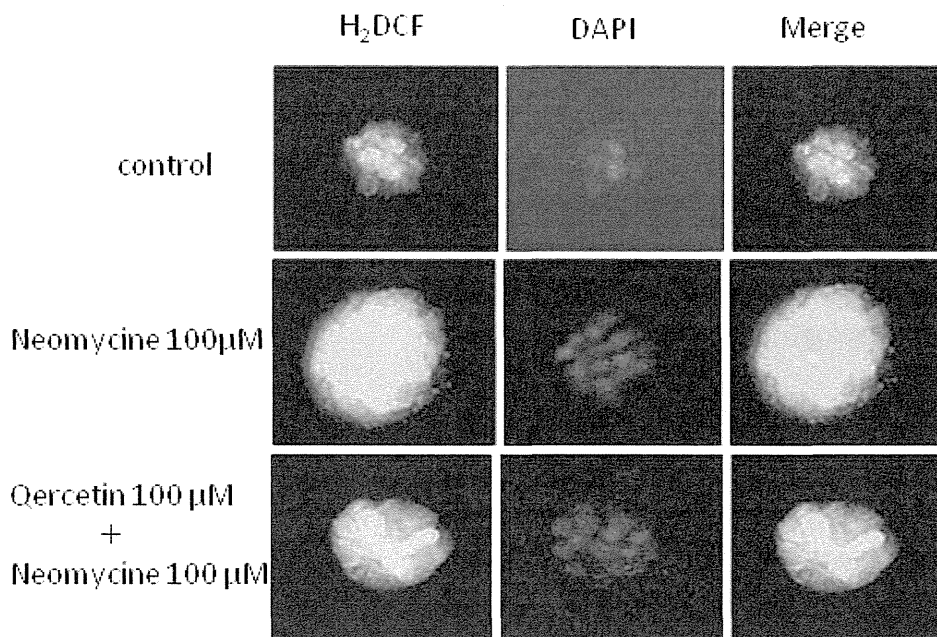


図4 酸化ストレス実験

9. ファイリングソフトを用いた眼振データベースの診断, 評価への応用

橋本 誠^{1,2)}, 池田卓生³⁾, 藤井博則¹⁾, 菅原一真¹⁾, 下郡博明¹⁾, 山下裕司^{1,2)}

(¹⁾山口大, ²⁾山口大学医学部附属病院 高次統合感覚器医療センター,

³⁾鼓ヶ浦こども医療福祉センター耳鼻咽喉科)

[はじめに]

我々はこれまで, 赤外線CCDカメラとフリーウェアの画像解析ソフトImageJを用いたvideo-oculography (VOG) を行ってきた。さらに市販のファイリングソフトを用いてVOGを行う眼振データベースシステムを開発し, 当科ではめまい外来を中心に運用している。

[対象と方法]

FileMakerPro と PC を使い, AppleSprict でプログラムを組み, FileMaker と連動させて, 眼球画像を項目毎に QuickTime 形式で PC に取り込んだ。ImageJ で独自のマクロプログラムを使い, ファイルメーカーと連動し眼振の解析を行った。定量的評価に基づいて設定した眼振の振幅・頻度のクライテリアによる解析結果から, 眼振を数値化して眼振図, 眼振矢印を記録した。動画および解析結果データをファイリングした。この定量的眼振解析データベースシステムの運用状況について検討した。

[結果]

当科においてめまい外来を中心に, 2010年6月30日から2013年1月16日までの期間, 238名の患者に対し延べ406回 (1名あたり平均 1.7回) 検査を行っていた。動画数は約5000動画 (1回あたり平均約 12.3動画) であった。

方向交代性下向性眼振を呈する症例では, 頭位による眼振の方向, 振幅, 頻度, 緩徐相速度を客観的データとして記録した。前庭神経炎症例では眼振の経時的変化を, 客観的データとして記録した。

[考察]

眼振の定量的解析に基づく客観的な記録をファイルしたデータベースを得た。眼振の正確な所見を記録できること, また経過中の眼振所見の推移を記録できることが可能となった。めまい疾患の診断や重症度などの評価に客観的データを反映することが期待できる。

[結論]

眼振の定量的解析に基づく客観的な記録をもとに, 正確な診断が可能となった。眼振所見の経過をファイルすることができ, 客観的な重症度の推移の把握につながる。

[参考文献]

- 1)池田卓生, 他: 赤外線 CCD カメラとパソコンを用いた簡易的眼球運動画像解析法. Equilibrium Res 59: 298-305, 2000.
- 2)池田卓生, 他: NIH Image を用いた簡易眼球運動画像解析法-三次元解析と回転軸解析について-. Equilibrium Res 61: 90-96, 2002.
- 3)池田卓生, 他: ImageJ を用いた眼振解析とその表示 平衡機能検査法基準化のための資料に基づいて. Equilibrium Res 68: 92-96, 2009.

10. 前庭小脳領域 unipolar brush cell の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, 近松一朗 (群馬大)

[はじめに]

椎骨脳底動脈循環不全症 (Vertebrobasilar Insufficiency; VBI) は高齢者に生じるメマイ・平衡障害の代表的疾患であり、脳梗塞と異なりCT・MRIで器質性病変を検出できない一過性脳虚血発作のため、前庭神経炎や前庭型メニエール病などの内耳性メマイとの鑑別も重要である。椎骨脳底動脈系は末梢前庭器、蝸牛、第VIII脳神経、脳幹、小脳などに広く血液を供給しており、循環不全により灌流域にあるすべての器官の機能障害が生じうる。しかし、実際の日常診療では、メマイ単独の症状を呈すること少なくない。そこで我々は椎骨脳底動脈灌流域において、前庭神経核の興奮性を制御する入力系として、前庭小脳に着目し、一過性虚血に対する反応を検討した。これまでの電気生理学的な先行研究から、前庭小脳プルキンエ細胞における自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory synaptic current: sEPSC) が、一過性虚血により一過性に著明増加し、生理的条件下に戻すとすぐに元の状態に回復するという現象を見出した。今回の研究では、このsEPSC増加のメカニズムとして、前庭小脳プルキンエ細胞の興奮性シナプス前細胞である顆粒細胞と、顆粒細胞層に存在する興奮性介在ニューロンであるunipolar brush cellをターゲットに一過性虚血に対する反応のメカニズムを検討した。

[対象と方法]

可逆性の変化を経時的にとらえるために、電気生理学的手法 (Whole-cell patch clamp法) を用いた。生後3~4週齢Wistar ratの前庭小脳矢状断のスライス標本を作製し、lobule IX-Xに存在する顆粒細胞およびunipolar brush cellに~5M Ω のガラス管電極を押し当て、patch-clampにて電流固定し、その静止電位あるいは自発発火を記録した。顆粒細胞はスライス切片上、自発発火を認めず、一方、unipolar brush cell (UBC) は内在的な自発発火の特性を持っている。生理的条件下の記録の後、一過性虚血刺激として、5分間の無酸素無グルコース (Oxygen-Glucose Deprivation; OGD) 細胞外液の還流を行った。薬理的に、興奮性応答の原因としてグルタミン酸受容体の活性化が示唆されたため、さらにグルタミン酸受容体のサブクラスによって違いがあるかを検討した。

[結果]

1. 前庭小脳において、顆粒細胞では自発発火は認めず、unipolar brush cell では自発発火を認めた (Fig. 1)。
2. OGD による一過性虚血刺激を行うと、すべてのUBCにおいて一過性の自発発火の上昇が確認された。一方、顆粒細胞 (GC) では、一部の細胞でOGDによる一過性虚血刺激による軽度の自発発火が観察された (Fig. 2)。
3. グルタミン酸受容体拮抗薬 (キヌレン酸: KA) をOGDによる一過性虚血刺激の途中で投与すると、UBCの自発発火の増加は抑制された。また、KAの先行投与により、OGDによる自発発火の増加は生じない (Fig. 3)。
4. OGDによる一過性虚血刺激で観察されるUBCにおける自発発火の増加は、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬で抑制され、AMPA型グルタミン酸受容体拮抗薬では抑制されない。従って、NMDA型グルタミン酸受容体の活性化が関与する。

[考察]

OGDによる一過性虚血により、NMDA型グルタミン酸受容体を介した持続的な脱分極が生じ、UBCの自発発火の上昇をもたらしたと考えられる。興奮性介在ニューロンであるUBCの自発発火の増加は、顆粒細胞の興奮性を上昇させ、結果的にプルキンエ細胞の興奮性入力の顕著な増加につながったと考えられる。このメカニズ

ムは、前庭小脳に非常に特異的であり、同部位の虚血に対する脆弱性に関与するメカニズムとして重要である。

[結論]

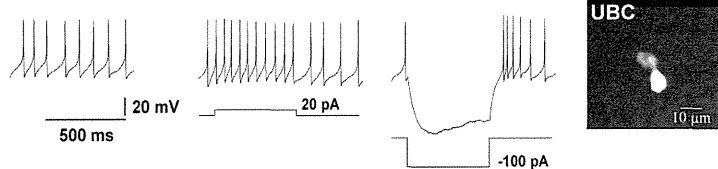
OGDによる一過性虚血による前庭小脳プルキンエ細胞のsEPSCの増加は、興奮性介在ニューロンであるUBCの自発発火の増加を介した現象であった。

[参考文献]

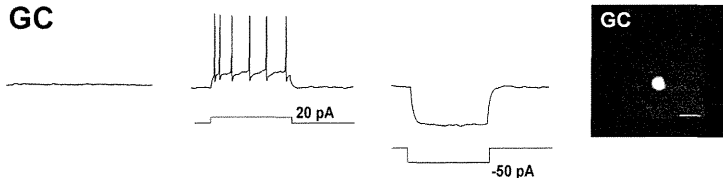
Savitz SI, Caplan LR (2005) N Engl J Med 352:2618-2626
 Mugnaini E, Sekerková G, Martina M (2011) Brain Res Rev 66:220-245
 Bruyn GW (1988) Acta Otolaryngol Suppl 460:128-134
 Barmack NH (2003) Brain Res Bull 60:511-541

Fig. 1

UBC

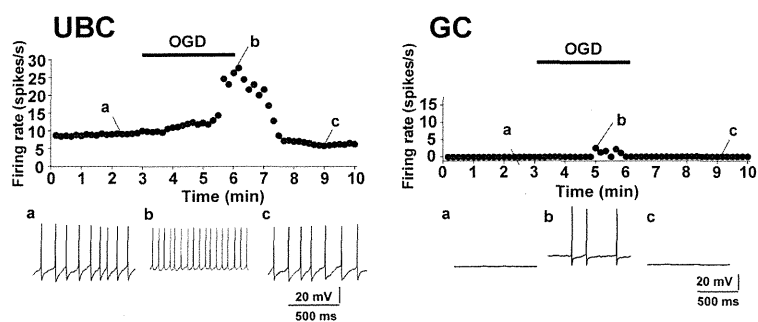


GC



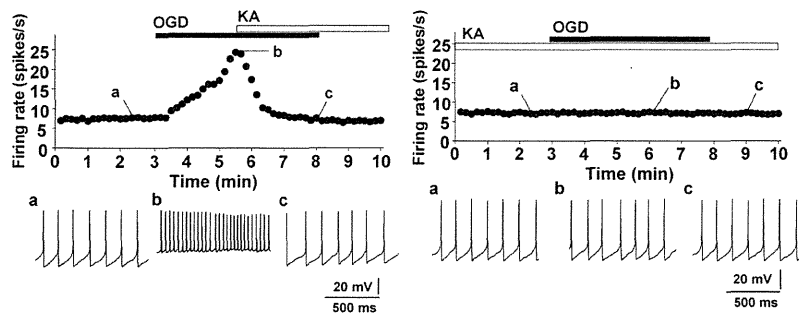
Unipolar brush cell (UBC) と顆粒細胞 (granule cell: GC) の膜電位特性の違い。GCは静止電位で自発発火なく、UBCは自発発火をしている特徴を持つ。

Fig. 2



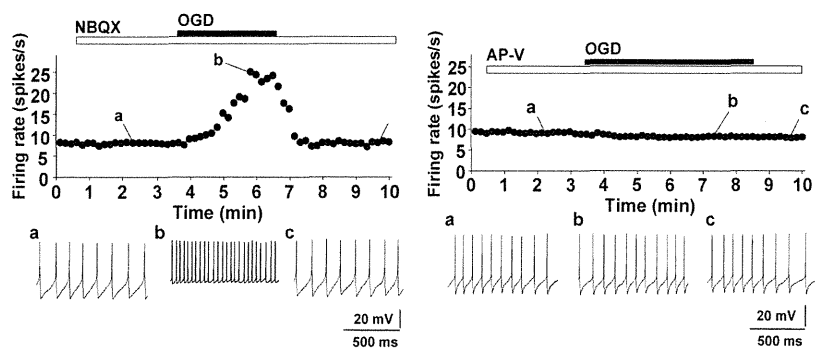
OGDによる一過性虚血時の発火頻度の変化。UBCの自発発火はOGD刺激により一過性に発火頻度の上昇が確認された。

Fig. 3



非選択的グルタミン酸受容体拮抗薬(キヌレン酸:KA)により、UBCにおけるOGD誘導性の発火頻度上昇は完全に抑制される。

Fig. 4



AMPA型グルタミン酸受容体拮抗薬(NBQX)存在下、UBCにおけるOGD誘導性の発火頻度上昇に影響は認めない。一方、NMDA型グルタミン酸受容体拮抗薬(AP-V)存在下、UBCにおけるOGD誘導性の発火頻度上昇は完全に抑制される。

11. 感覚混乱による身体動揺制御中の大脳皮質応答の解析

—近赤外線分光法 (NIRS) による研究—

高倉大匡¹⁾、将積日出夫¹⁾、西条寿夫²⁾、渡辺行雄¹⁾
富山大 1)、富山大学情動科学 2)

[はじめに]

近年、機能的磁気共鳴画像法 (functional Magnetic Resonance Imaging: fMRI) や陽電子断層撮影法 (Positron Emission Tomography: PET) などを用いた前庭覚・体平衡機能に関するヒトの脳機能画像研究が多く報告されている^{1)~4)}が、多くは安静条件下で行われたものであり、動的な姿勢制御を行っている際の大脳皮質応答を調べた研究はほとんどない。

近赤外線分光法 (Near infra-red spectroscopy: NIRS) は波長の異なる近赤外線を頭皮上から送光し、大脳皮質表面の酸素化ヘモグロビン (OxyHb) と還元ヘモグロビン (DeoxyHb) による吸光度の違いから脳血流量の変化を測定する方法である。fMRI や PET と比較して解像度でやや劣り、脳深部は測定できないなどの欠点はあるが、被爆などの被験者への侵襲性がなく、大きな装置が必要ないことから拘束性が少ないため、軽い運動中の脳活動を記録できる、などの利点を持っている。

今回我々は、近赤外線分光法 (NIRS) 測定装置を用いて、身体動揺を誘発する条件下で動的に直立姿勢制御を行っている際の大脳皮質応答を記録・解析したので報告する。

[方法]

被験者は健康成人男性 11 名 (右きき 11 名、23~46 歳 平均 33.4±7.4 歳) である。被験者は NIRS 計測用ヘッドキャップ (FLASH-PLAS ; 島津製作所製) を着用し、に、fNIRS 用プローブを送光用、受光用併せて 31 個装着し、計 50 チャンネルから記録した。測定領域は頭頂部から右側頭部にかけての領域に設定した。被験者は NeuroCom 社製 EquiTest[®] system の Sensory Organization Test を繰り返し、その最中の脳血流反応を NIRS 測定装置 (OMM-3000、島津製作所製) で計測した。

Sensory Organization Test (SOT) は、直立している被験者の起立台や被験者の周辺視野が被験者の前後動揺に追従して動くことで足からの体性感覚入力、視覚入力の変化を減弱させることで被験者に体が動いていないかのような錯覚を生じさせ、さらに開閉眼も組み合わせ全部で 1-6 の 6 条件を作り、被験者の身体動揺を調べる検査である⁵⁾⁶⁾。SOT1 は直立維持に必要な前庭入力、体性感覚、視覚入力のすべてが正常な条件、SOT2 は前庭入力正常、体性感覚正常、視覚入力なし (閉眼)、SOT3 は前庭入力正常、体性感覚正常、視覚入力減弱、SOT4 は前庭入力正常、体性感覚減弱、視覚入力正常、SOT5 は前庭入力正常、体性感覚減弱、視覚入力なし (閉眼)、SOT6 は前庭入力正常、体性感覚減弱、視覚入力減弱、という条件であり、SOT1-6 の全条件での大脳血流応答を測定した。各刺激毎に 20 秒間の刺激とその後の 60 秒間の開眼直立を 5~6 回施行した。

データ解析では、各 SOT の刺激開始を起点とし OxyHb 濃度変化を加算平均し、その加算波形データの刺激開始後 10 秒~20 秒 (刺激終了時点) の OxyHb 濃度変化の積分値を解析データとして用いた。NIRS 各被験者の NIRS 測定チャンネル点を標準脳座標に変換し、血流測定チャンネルの標準脳上での脳領域を推定した上で、異なる脳領域毎に測定チャンネルをグループ化 (関心領域: ROI の設定) した。さらに、各 ROI 毎に 1 測定チャンネル平均の OxyHb 濃度変化を算定した。ROI は補足運動野、内側感覚運動皮質、体性感覚連合野、前頭眼野、外側感覚運動皮質、前頭弁蓋皮質/下前頭回、上側頭回、頭頂弁蓋皮質、縁上回、角回の 10 領域を設定した。各 ROI における 1 測定チャンネル平均の OxyHb 濃度変化を SOT1~SOT6 の条件間で統計的に比較し

た(2因子の分散分析(SOT×ROI))。統計的有意性は5%未満とした。

[結果]

加算波形を見ると、血流変化を示しませんでした。SOT5、6では右側頭部領域で刺激にてOxyHb濃度の増加を認めた。被験者の大脳皮質上にOxyHb濃度変化をマッピングすると、OxyHb濃度の増加した領域はシルビウス裂を中心とした領域であった。各ROIでのSOT1～SOT6のOxyHb濃度変化の統計的比較では、前頭弁蓋皮質/下前頭回、右上側頭回、右頭頂弁蓋皮質の3領域において、SOT5、6で有意なOxyHb濃度の上昇を認めた(P<0.01)。

[考察]

SOT6の条件すなわち前庭入力正常、体性感覚入力・視覚入力減弱した条件では右前頭弁蓋皮質/下前頭回、右頭頂弁蓋皮質、右上側頭回で有意な血流上昇が認められた。これらの大脳皮質領域は、これまでのヒト脳機能画像研究で報告された前庭覚関連大脳皮質に一致していた^{1)~4)}。

SOT5、6では、視覚・前庭覚・体性感覚の3つの入力情報のうち2つ(視覚・体性感覚)が減弱するため、実際の感覚入力と記憶から予測される感覚入力との間にミスマッチが生じるため、強い身体動揺が生じると考えられる。この際、被験者は直立姿勢維持のために、自己運動認知の際の感覚の重みを正常である前庭覚によりシフトした結果、前庭覚関連皮質の強い賦活化を示したものと考えた。

[結語]

近赤外線分光法測定装置(NIRS)を用いて、身体動揺を誘発する条件下で動的に直立姿勢制御を行っている際の大脳皮質応答を記録・解析した。直立姿勢維持中に体性感覚および視覚入力情報が減弱した条件下では、前庭覚関連大脳皮質が賦活化することが確認された。今後は、今回測定できなかった領域での大脳皮質応答を明らかにするとともに、前庭機能障害患者への臨床応用を進めていきたいと考える。

[参考文献]

- 1) Fasold O, von Brevern M, Kuhberg M, Ploner CJ, Villringer A, Lempert T, Wenzel R. Human vestibular cortex as identified with caloric stimulation in functional magnetic resonance imaging. *NeuroImage*17:1384-1393, 2002.
- 2) Suzuki M, Kitano H, Ito R, Kitanishi T, Yazawa Y, Ogawa T, Shiino A, Kitajima K. Cortical and subcortical vestibular response to caloric stimulation detected by functional magnetic resonance imaging. *Cognitive Brain Research*12 :441-449, 2001.
- 3) Dieterich M, Bense S, Lutz S, Drzezga A, Stephan T, Bartenstein P, Brandt T. Dominance for Vestibular Cortical Function in the Non-dominant Hemisphere: *Cerebral Cortex* 13:994-1007, 2003.
- 4) Bottini G, Sterzi R, Paulesu E, Vallar G, Cappa SF, Erminio F, Passingham RE, Frith CD, Frackowiak RS. Identification of the central vestibular projection in man: a positron emission tomography activation study. *Experimental Brain Research* 99:164-169, 1994.
- 5) 浅井正嗣、渡辺行雄、大橋直樹、安村佐都紀、赤荻勝一、山本森弘、水越鉄理、川崎 匡: EquiTest[®] systemによる感覚、運動機能の総合的分析の診断的意義。耳鼻臨床 補36:38-44, 1989.
- 6) 清水勝利、浅井正嗣、渡辺行雄、水越鉄理: 直立姿勢維持に対する視覚・体性感覚の影響について。 *Equilibrium Res* Vol.52(4) 621-628, 1993.

12. 難治性内耳疾患の遺伝子バンクプロジェクトの現況

(メニエール病患者におけるSNPs関連解析)

福岡久邦、西尾信哉、塚田景大、宇佐美真一（信州大） 小川 郁（慶応大） 渡辺行雄（富山大）
鈴木 衛（東京医大）

[はじめに]

メニエール病の病態は内リンパ水腫がとされているがその誘因については明らかではない。これまでに、ウイルス感染、片頭痛、自己免疫疾患、循環障害、アレルギー疾患などの多くの疾患の関連が報告されているが、いずれも世界的なコンセンサスを得るに達していない。遺伝的背景に関する研究としては、AQPやカリウムイオンチャネルなどの遺伝子の解析が行われており、発症に遺伝的要因も強く関わっているとされているが、未だ解明には至っていない。そこでメニエール病の発症に関連する遺伝子（多型を含む）を同定し、メニエール病の発症メカニズムを推定し、新たな治療法・予防法を開発することを目的に、平成22年度より前庭機能異常に関する調査研究班を中心に、メニエール病患者を中心に、全国の各施設より患者の遺伝子を収集し遺伝子バンクとして管理・保管するプロジェクトを行ってきている。今回、バンクに登録された遺伝子をもとに予備解析（メニエール病の関連遺伝子解析等）を行ったので報告する。

[対象と方法]

メニエール病患者180名（1次解析 96例、2次解析 84例）を対象に、メニエール病との関連が指摘されている遺伝子を中心に相関解析を行った。解析を行う遺伝子多型は、Hapmap Japan Projectのデータベースの情報に基づき、日本人における連鎖不平衡ブロックの情報および日本人における遺伝子多型の頻度を参考に選定した（表1）。

1次解析にて、疾患と関連が示唆された遺伝子多型については2次解析（2段階絞り込み）にて再評価を行った。SNPの同定にはApplied Biosystems社のStep One Plus™およびTaq Man Genotyping Assayを用いた。（なお、今回のサンプルは平成22年度より前庭機能異常に関する調査研究班を中心に行っている遺伝子バンクプロジェクトのサンプルを使用した。）

[結果]

1次解析では、5個のSNPsにメニエール病患者群とコントロール群との間に有意差を認めたが（表2）、2次解析では有意差はなく再現性を認めなかった（表3）。

[考察]

遺伝子解析の方法としては①ゲノムワイド相関解析、②候補遺伝子を用いた相関解析、③ファーマコゲノミクス解析などがある。メニエール病の遺伝子の関連性をCommon diseaseのレベルとし、候補遺伝子を用いた相関解析を行う場合、オッズ比を2と仮定した場合でも検出力80%を得るためには約500ものサンプル数が必要とされる。このように統計学的に有意性のある検討を行うためには、ある程度以上のサンプル数が必要であるが、これらを単施設で収集することは困難である。バンクを運営、管理することで質の高い症例をより多く収集することが可能となり、これらの研究に役立つものと考えられる。

今回使用したサンプルは180症例と少なく、また対象としたSNPの数も少なく、あくまでも予備解析の域でない。今後、解析対象人数を増やすとともに、解析対象遺伝子を増やすことにより、メニエール病の発症に関与する遺伝子を同定することが可能であると期待される。

[結論]

前庭機能異常に関する調査研究班を中心に行っている遺伝子バンクプロジェクトのサンプルを用いて、予