

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09911

研究課題名(和文) Vestibular suppressantが前庭代償に与える影響：動物モデル研究

研究課題名(英文) Impact of Vestibular suppressants on vestibular compensation: animal model studies

研究代表者

松田 和徳 (MATSUDA, Kazunori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：60721785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：一側内耳破壊術を実施した前庭代償モデルを用いて、前庭代償の前期過程(健側前庭神経核の活動性の抑制)は内耳破壊後の眼振数の経時的変化で評価でき、前庭代償の後期過程(障害側健側前庭神経核の活動性の回復)は、MK801投与により誘導される健側前庭神経核におけるFos陽性ニューロン数の減少の経時的変化で評価できることを証明した。

前庭代償の前期・後期過程を分離する新しい評価法により、ヒスタミンH3受容体拮抗作用をもつthioperamideやbetahistineは前庭代償の後期過程を、GABAA受容体作動薬であるdiazepamは前庭代償の前期過程をそれぞれ用量依存性に促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、我が国は世界でも類を見ない超高齢社会に突入している。高齢者において前庭代償遅延によるふらつきは転倒・骨折の危険因子となり、健康寿命を短縮させる要因となる。今後、超高齢化社会を迎える日本において、前庭代償に影響を及ぼす薬剤の検討と前庭代償を促進させる薬剤の開発が求められる。本研究は、薬剤における前庭代償に与える影響についての科学的根拠となり、前庭代償の促進に着眼した抗めまい薬の開発にむけた臨床的応用へとつながり、前庭代償を促進する新規薬剤の開発も可能となりうる。このことは、超高齢社会に向けたフレイルや寝たきりの予防戦略の構築に貢献し、超高齢化のすすむ我が国において社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：we used immunohistochemical technique and developed the new evaluation method of vestibular compensation (VC) in unilateral labyrinthectomized rats. VC consists of two processes: the inhibition of the contralateral vestibular nucleus activities in the initial process, and the restoration of the ipsilateral medial vestibular nuclear in the late process after UL. The initial process of VC was evaluated by the decline of spontaneous nystagmus frequency after UL, and the late process of VC considered to be the decline of MK801-induced Fos-like immunoreactive neurons number in the contra-MVe after unilateral labyrinthectomy (UL) in rats.

We then used this evaluation method and showed that thioperamide and betahistine, histamine H3 receptor antagonists, accelerated the late but not initial process of VC. Further, we performed the nonlinear regression analysis using the decline of SN frequency after UL, showed that diazepam, GABAA receptor agonist, accelerated the initial process of VC.

研究分野：めまい平衡障害

キーワード：前庭代償 免疫組織化学法 MK801 Fos ヒスタミンH3受容体 GABA作動薬 自発眼振 前庭神経核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メニエール病や前庭神経炎などにより一側の末梢前庭機能が障害されるとめまいが発症し、著しい平衡障害や眼振が生じる。しかし、このような平衡障害や眼振は、末梢前庭機能が回復しなくても、中枢前庭系の機能代償により次第に軽快していく。中枢前庭系の可塑性に基づく末梢前庭障害の機能代償は、前庭代償と呼ばれている。本邦においては一側前庭障害患者の急性期にベンゾジアゼピン系薬剤や抗ヒスタミン薬が頻用され、慢性期にも投与が継続されている。一方、諸外国において、これらの薬剤は vestibular suppressants と呼ばれており、前庭代償を遅延させるために一側前庭障害患者に長期間の投与を避けるべきであるとされている。しかしながら、ベンゾジアゼピン系薬剤や抗ヒスタミン薬が vestibular suppressants として前庭代償を遅延させるとする基礎実験のデータはほとんどなく、科学的根拠に乏しい。現在、我が国は世界でも類を見ない超高齢社会に突入している。高齢者において前庭代償遅延によるふらつきは転倒・骨折の危険因子となり、フレイル、寝たきりや要介護およびその後に生じる認知症の要因となりうる。したがって、前庭代償を遅延させる薬剤の検討は、超高齢化のすすむ我が国における社会的意義が大きい。

2. 研究の目的

前庭代償は、低下していた障害側の前庭神経核の活動性の回復により完成する。障害側の前庭神経核ニューロンの活動性は、これまでに *in vitro* スライス標本における電気生理学的研究による報告がされてきた。しかし、スライス標本では、ニューロンへの入力・出力の多くが断絶されているため、*in vivo* 実験で検討されてきたネットワークの解明とは結びつかない点が一番の問題であった。さらに専門的な知識と機器が必要であり、手技が煩雑であり、また、個体における経時的变化を観察することが困難であった。以上から、簡便に障害側の前庭神経核の活動性を評価する前庭代償の新しい評価法を開発する必要があり、一側内耳破壊術ラットを前庭代償の動物モデルとして用い、免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法を用いて、以下の点を明らかにすることを本研究の目的とした。

- (1) 免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法の確立
- (2) ベンゾジアゼピン系薬剤が前庭代償に及ぼす影響の解明と前庭代償の前期過程を促進する薬剤の開発
- (3) 抗ヒスタミン薬が前庭代償に及ぼす影響の解明と前庭代償の後期過程を促進する薬剤の開発

3. 研究の方法

Wistar 系雄ラット (約 150g) を用いた。内耳破壊は吸入麻酔下に手術用顕微鏡下に卵円窓から 100%エタノールを注入して行った。ラットの右内耳破壊術後に経時的 (内耳破壊後 1~14 日) に NMDA 受容体拮抗薬である MK801 (1.0mg/kg) を腹腔内投与し、脱代償を誘発する。MK801 投与後 2 時間後にラットを還流固定し、前庭神経核を含む脳幹を取り出し、免疫組織化学的手法を用いて Fos を染色する。左前庭神経核における Fos 陽性ニューロン数を Image J を用いて定量する。前庭代償の前期過程である、健側前庭神経核の活動性の抑制は、眼振数の経時的变化で評価できる。一方、前庭代償の後期過程である、患側健側前庭神経核の活動性の回復は、MK801 投与により誘導される健側前庭神経核における Fos 陽性ニューロン数の減少の経時的变化で評価できることを確認している。

内耳破壊直後から GABAA 作動薬である diazepam を、7 mg/kg/day と 3.5 mg/kg/day の用量で浸透圧ミニポンプを用いてラットの腹腔内に持続注入し、前庭代償の促進効果を検討した。さらに、内耳破壊直後から、ヒスタミン H3 受容体拮抗作用を持つ betahistine を、200 mg/kg/day と 100 mg/kg/day の用量で浸透圧ミニポンプを用いてラットの腹腔内に持続注入し、前庭代償の促進効果を検討した。

4. 研究成果

- (1) 免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法の確立
耳破壊術後 30 分で 25 - 35 (平均 30.08 ± 5.04) 回 / 15 秒と最大値となり、その後徐々に減少し、術後 42 時間で消失した。前庭代償の前期過程である、健側前庭神経核の活動性の抑制は、内耳破壊後の眼振数の経時的变化で評価できることが明らかとなった。
前庭代償モデル動物に経時的 (内耳破壊後 1~14 日) に MK801 (1.0mg/kg) を腹腔内投与し、脱代償を誘発し、MK801 投与後 2 時間後に還流固定し、前庭神経核を含む脳幹を取り出し、免疫組織化学的手法を用いて Fos を染色した。障害側前庭神経核における Fos 陽性ニューロン数を

Image J を用いて定量した。内耳破壊後に MK801 投与後の脱代償にて誘導される健側前庭神経核の Fos 陽性ニューロン数は、内耳破壊術 1 日後に最大値となり、その後徐々に減少し、内耳破壊術 14 日後において、MK801 投与 2 時間後には健側前庭神経核における Fos 陽性ニューロン数は正常コントロールラットおよび sham 手術実施ラットとほぼ同程度となった。前庭代償の後期過程である、障害側健側前庭神経核の活動性の回復は、MK801 投与により誘導される健側前庭神経核における Fos 陽性ニューロン数の減少の経時的変化で評価できることが明らかとなった。我々は、免疫組織化学的手法を用いた前庭代償の前期過程と後期過程を分離して評価できる新しい評価法を確立した。

(2) ベンゾジアゼピン系薬剤が前庭代償に及ぼす影響の解明と前庭代償の前期過程を促進する薬剤の開発

ラットの一侧の内耳を破壊すると、自発眼振が誘発される。自発眼振の頻度は前庭代償の前期過程により次第に減少し、非線形回帰解析では 48.6 時間で消失した。内耳破壊直後から diazepam を、7 mg/kg/day と 3.5 mg/kg/day の用量で浸透圧ミニポンプを用いてラットの腹腔内に持続注入すると、diazepam は一侧内耳破壊により誘発された自発眼振の頻度を

用量依存性に有意に低下させた。また、diazepam を 7 mg/kg/day の用量で投与すると 32.4 時間で、3.5 mg/kg/day の用量で投与すると 37.24 時間で自発眼振が消失した。すなわち、diazepam は一侧内耳破壊ラットの自発眼振の消失時期も用量依存性に有意に促進した。Diazepam が一侧内耳破壊後の自発眼振を抑制しただけでなく前庭代償の前期過程も促進したことから、diazepam は急性期のめまいの抑制に有用と考えられた。過去の文献にはベンゾジアゼピン系抗不安薬は前庭抑制薬 (vestibular suppressants) のため前庭代償を遅延させるとの記載があるが、それを示す実験的または臨床的データは報告されていない。Diazepam などのベンゾジアゼピン系抗不安薬は GABA_A 受容体作動薬であり、前庭代償の前期過程における前庭小脳 - 前庭神経核抑制系のプルキンエ細胞から健側前庭神経核への抑制効果を増強し、前庭代償の前期過程を促進させる可能性があると考えられた。

(3) 抗ヒスタミン薬が前庭代償に及ぼす影響の解明と前庭代償の後期過程を促進する薬剤の開発

Betahistine は一侧内耳破壊により誘発される自発眼振の頻度を抑制せず、消失時期も早めなかった。このことから、betahistine は前庭代償の前期過程には影響しないと考えられた。しかし、betahistine は一侧内耳破壊後に MK801 により健側前庭神経核に出現する Fos 陽性ニューロン数を、内耳破壊後 7 日目、10 日目、12 日目に saline 群と比較して有意に低下させた。また、betahistine の 200 mg/kg/day の用量では 10 日目に、100 mg/kg/day の用量では 12 日目に、MK801 により健側前庭神経核に出現する Fos 陽性ニューロン数が sham ope 群と同じレベルまで減少した。以上の結果から、betahistine は前庭代償の後期過程を用量依存性に促進し、前庭代償の後期過程の完成を 200 mg/kg/day の用量では 4 日間、100 mg/kg/day の用量では 2 日間、早めたと考えられた。betahistine はヒスタミン H₃ 受容体拮抗作用があり、前庭神経核に投射するヒスタミン神経終末のシナプス前膜に存在するヒスタミン H₃ 受容体をブロックすることにより、ヒスタミン遊離を促進させ、前庭神経核ニューロンの活動性を亢進させる。ヒスタミン H₃ 受容体拮抗薬は、障害側前庭神経核ニューロンの自発発火の回復を促進することにより、前庭代償の後期過程を促進する可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukuda Junya, Matsuda Kazunori, Sato Go, Kitahara Tadashi, Matsuoka Momoyo, Azuma Takahiro, Kitamura Yoshiaki, Tomita Koichi, Takeda Noriaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of Betahistine on the Development of Vestibular Compensation after Unilateral Labyrinthectomy in Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 360 ~ 360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci11030360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 福田 潤弥, 松田 和徳, 佐藤 豪, 北原 紘, 富田 江一, 武田 憲昭	4. 巻 34
2. 論文標題 ベタヒスチンが一側内耳破壊ラットのの前庭代償過程に与える影響	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス	6. 最初と最後の頁 36 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuda K, Kitahara T, Ito T, Fukushima M, Fukuda J, Sato G, Kitamura Y, Abe K, Uno A, Tomita K, Sakata-Haga H, Fukui Y, Takeda N.	4. 巻 139
2. 論文標題 A new immunohistochemical method to evaluate the development of vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy in rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Otolaryngologica	6. 最初と最後の頁 505-510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00016489.2019.1599140.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松田和徳、北原 紘、伊藤妙子、佐藤 豪、福田潤弥、武田憲昭	4. 巻 33
2. 論文標題 動物モデルを用いた免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 耳鼻咽喉科ニューロサイエンス	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 福田 潤弥, 松田 和徳, 佐藤 豪, 北原 紘, 武田 憲昭
2. 発表標題 一側内耳破壊後のラットのの前庭代償に対するベタヒスチンの効果
3. 学会等名 第121回 日本耳鼻咽喉科学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松田和徳
2. 発表標題 免疫組織化学法を用いた一側内耳破壊ラットのの前庭代償の新しい評価法の開発
3. 学会等名 第146回徳島県耳鼻咽喉科医会研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武田 憲昭 (TAKEDA Noriaki) (30206982)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究分担者	佐藤 豪 (SATO Go) (30464358)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------