

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462550

研究課題名(和文) 前庭系の加齢性変化抑制と機能回復に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Research for suppressing the aging of the peripheral vestibular organs

研究代表者

牛尾 宗貴 (Ushio, Munetaka)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：70361483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：末梢前庭器の老化とその抑制をテーマに、老化動物を用いて形態学的・機能的研究を行っている。動物の眼球運動を記録できるシステムを構築し、末梢前庭器を電気刺激して眼球運動を観察し、最適な刺激条件となる刺激の強度ならびに波形を追求してきた。一方、両側末梢前庭機能廃絶モデル動物は両側迷路破壊術により作成し、末梢前庭器への電気刺激は中耳を開放して電極を留置することにより行っている。眼球運動を完全にコントロールするには至っていないが、電極の留置位置や電流の大きさを微調整し、各個体に応じた眼球運動を生じさせられる状態となった。

研究成果の概要(英文)：For suppressing the aging of the peripheral vestibular organs, experimental system for performing vestibular stimulation for a guinea pig was constructed. Technique for stimulating the vestibular ganglion and inducing the eye movement was established, however we still cannot induce the eye movement exactly as we wanted. We are planning to reserve the vestibular ganglion cells by electric stimulation.

研究分野：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：前庭 半規管 電気刺激

1. 研究開始当初の背景

めまい・平衡障害は65歳以上の21% (Izumi 2005)、72歳以上の24% (Tinetti 2000)が自覚する症状で、転倒や骨折の重大な原因のひとつであり(相対危険度 2.9, Rubestien 2002)、その対策は喫緊の課題である。末梢前庭器(半規管、耳石器)に注目すると、加齢により求心性神経線維に進行性の脱落が生じること (Johnson 1972)、前庭有毛細胞が減少すること (Richter 1980)、耳石が変性すること (Jang 2006)などが報告されており、前庭生理学的には前庭動眼反射 (VOR) のゲイン低下が生じることなどが示されている (Tian 2001)。これらの知見は高齢者にめまい・平衡障害が多い原因と考えられているが、未だ効果的な対処法は報告されていない。下肢の知覚低下 (Ushio 2008) や視力低下によっても平衡障害は生じるが、一側あるいは両側末梢前庭機能障害を伴った患者が高齢となる、あるいは高齢の患者に末梢前庭機能障害が生じる (Maarsingh 2010) と、脱代償あるいは代償不全によりめまい・平衡障害はより重度となり、本人のQOLが低下するのはもちろん、社会的・経済的損失は甚大なものとなる。

近年、カロリー制限により寿命の延長や各器官の加齢性変化の抑制が可能であること (Lee 2000) が報告され、耳鼻咽喉科領域でも、加齢による蝸牛の変性と難聴の進行がカロリー制限により抑制されうること (Someya 2007, 2010) などが示された。申請者らの研究でも、カロリー制限により前庭神経節細胞の加齢による減少が抑制されることが示唆されている (データ集計中)。また、カロリー制限をしなくても、レスベラトロール投与 (加齢動物作成中) などにより加齢を抑制できる可能性が報告され、多くの研究が行われているが、前庭系の加齢抑制に関する研究は遅れている。一方、特に一側末梢前庭機能障害症例に対する前庭リハビリテーションの有用性 (Strupp 1998, Herdman 1995)、議論があるところではあるが両側末梢前庭機能障害症例に対するリハビリの有用性 (Krebs 1993, Szturm 1994) も示されているが、理論的な裏付けは十分ではなく、また、形態学的な評価は十分になされていない。申請者らは一側末梢前庭機能廃絶モデル動物に対して前庭リハビリとして急速頭部回転刺激を反復して行い、患側前庭動眼反射 (VOR) のゲイン向上が可能であることを示し (Ushio 2011)、現在形態学的検討も行っているため、本申請でもモデル動物に対するリハビリの手法として用いる。さらに、電気刺激による神経細胞減少抑制についても報告されているが、特に前庭系に対する生理学的・形態学的検討は余り行われていないため、申請者らはマウスの末梢前庭刺激用の電極を新規作成し、刺激実験開始に向けて準備を行っている。なお、加齢実験 (慢性実験) の問題のひとつは、経過中の形態学的評価が困難な点に

あるが、申請者らは研究分担者 (山下真司) の研究室の協力で光コヒーレンストモグラフィ (OCT: 比較的浅い層の構造を高解像度かつ詳細に観察できる技術) を用いてモルモットなどの内耳 (固定・脱灰後) を詳細に観察することを可能としており (Kakigi 2013)、生体の半規管や半規管膨大部などを固定・脱灰することなく観察することに成功している。

2. 研究の目的

両側末梢前庭機能が高度低下あるいは廃絶している症例においては、特に頭部を急速に動かした際や歩行時の動揺視、暗所での平衡本研究の目的は、加齢マウスを対象としてカロリー制限・レスベラトロール投与などによる前庭系の老化抑制の可否、一側ならびに両側末梢前庭機能廃絶動物に対する前庭リハビリテーション・前庭電気刺激の効果の有無を前庭生理学的 (video HIT (ビデオ記録による head impulse test) による VOR 測定など)・形態学的 (生体に対する OCT を用いた観察など) に評価し、加齢による前庭系の老化抑制の可能性、前庭リハビリテーション・前庭電気刺激の有効性を示すことである。

3. 研究の方法

1. カロリー制限・レスベラトロール投与などによる前庭の加齢抑制の可否: 通常食・カロリー制限食・レスベラトロール投与群を加齢させ、前庭生理学的評価 (video HIT, rotarod) ならびに形態学的評価 (OCT を用いた生体の観察、固定しての組織学的観察) を行い、カロリー制限ならびにその代替手段としてのレスベラトロール投与などが加齢による前庭障害を形態学的・機能的にどの程度まで抑制可能か明らかにする。

II. 加齢ならびに末梢前庭障害マウスに対する前庭リハビリテーションの有効性: 正常群・一側末梢前庭機能廃絶群・両側末梢前庭機能廃絶群に対して急速頭部回転刺激を用いた前庭リハビリテーション ($1,000^{\circ}/s^2$ の加速・ $150^{\circ}/s$ で 0.45 秒間定速・ $1,000^{\circ}/s^2$ で減速の刺激で構成されるステップ刺激を 1 回/1 秒で 30 分間、週 1 回) を行う。I と同様に前庭生理学的評価ならびに形態学的評価を行い、前庭リハビリテーションの有効性を明らかにする。

III. 加齢ならびに末梢前庭障害マウスに対する前庭電気刺激の有効性: 正常群・一側末梢前庭機能廃絶群・両側末梢前庭機能廃絶群に対して専用の刺激電極を用いて前庭電気刺激を行う。I と同様に前庭生理学的評価ならびに形態学的評価を行い、前庭電気刺激の有効性を明らかにする。

[1 年目]

1. 加齢マウス・末梢前庭機能廃絶マウスの作成: カロリー制限食 (生後 2 か月より 26% 制限) を投与した加齢マウス (10 ヶ月齢) と

通常食を投与した加齢マウス(10ヶ月齢)それぞれ15匹ずつの末梢前庭器(半規管、耳石器)と前庭神経節の観察(細胞数カウントなど)を行っていた。また、通常カロリー食を投与した加齢マウス(N群)15匹、カロリー制限食(生後2か月より26%制限)20匹(CR群)通常カロリー食+レスベラトロール投与群20匹(NR群)(飼育中にN群5匹、CR群10匹、NR群10匹死亡すると予想)の飼育を開始している。また、今後、前庭リハビリ群(VR群)前庭電気刺激群(VS群)一側末梢前庭機能廃絶+前庭リハビリ群(uni-VR群)両側末梢前庭機能廃絶+前庭リハビリ群(bi-VR群)一側末梢前庭機能廃絶+前庭電気刺激群(uni-VS群)両側末梢前庭機能廃絶+前庭電気刺激群(bi-VS群)をそれぞれ15匹飼育し、12ヶ月齢まで加齢させる予定である(飼育中にそれぞれ5匹ずつ死亡すると予想)。なお、本研究では12ヶ月齢となった時点で「加齢マウス」とする。対照とする若年マウス(4ヶ月齢、Y群)15匹も購入予定である。

II. マウスの前庭機能評価:すべての群を対象とする。専用の固定具にマウスと回転テーブルを固定し、LabChartを核とするvideo HITシステムを用いてステップ刺激によりマウスの末梢前庭機能(水平方向のVORゲイン)を測定する。生後4ヶ月、8ヶ月、12ヶ月の時点で測定し、個体内ならびに個体間で比較する。古典的ではあるが、同時期にrotarodも使い、体平衡も評価する。

III. OCTによるマウス(生体)の形態学的評価:すべての群を対象とする。研究分担者(山下真司)と大学院生(田久保勇也)と共同で、光コヒーレンストモグラフィ(OCT)を用いてマウス(生体)の末梢前庭器を生後4ヶ月、8ヶ月、12ヶ月の時点で観察し、個体内ならびに個体間で比較する。なお、水平半規管膨大部内のクプラは、回転テーブル上で水平方向のVORゲインを測定する際に観察し、その動的評価を行う。

IV. 前庭リハビリテーション:VR・uni-VR・bi-VR群を対象とする。専用の固定具にマウスと回転テーブルを固定し、一側末梢前庭機能廃絶群では廃絶側向きに、両側末梢前庭機能廃絶群では左右両側向きに回転させ、前庭リハビリを行う($1,000^\circ/s^2$ の加速・ $150^\circ/s$ で0.45秒間定速・ $1,000^\circ/s^2$ で減速の刺激で構成されるステップ刺激を1回/1秒で30分間、週1回行う)。

V. 前庭電気刺激:VS・uni-VS・bi-VS群を対象とする。専用の特注電極先端(幅は0.6mmで、コネクターまではフレキシブルなケーブルで形成されている)を水平半規管膨大部近傍に埋め込み、ケーブルを皮下に通してコネクターは皮膚に固定する。LabChartで刺激電流を作成して刺激装置(8チャンネルまで独立した刺激電流を作成できる)経由で週1回、30分間の電気刺激を行う。本システムを用いると、8匹まで同時に前庭電気刺激を行える。

[2-3年目]

I. 平成26年度(I)のつづき:平成26年度にひきつづき、マウスの飼育を行って加齢モデルを作成する。飼育スペースの問題から、前庭リハビリ群(VR群)前庭電気刺激群(VS群)一側末梢前庭機能廃絶+前庭リハビリ群(uni-VR群)両側末梢前庭機能廃絶+前庭リハビリ群(bi-VR群)一側末梢前庭機能廃絶+前庭電気刺激群(uni-VS群)両側末梢前庭機能廃絶+前庭電気刺激群(bi-VS群)の一部は平成27年度から飼育開始することになる可能性があるが、平成28年度までには結果を得ることができると予想している。

II. 平成26年度(II-V)のつづき:平成26年度にひきつづき、マウスの前庭機能評価・OCTによるマウス(生体)の形態学的評価・前庭リハビリテーション・前庭電気刺激を行う。飼育には多くのスペースを要し、さらに前庭リハビリテーション・前庭電気刺激を各群10匹強に行うには多くの時間を要するため、各群の飼育開始時期を適度に前後させる予定である。

III. 末梢前庭器ならびに前庭神経節の形態学的評価:すべての群を対象とする。生後12ヶ月の時点で固定し、形態学的変化を全体的に評価する。また、前庭神経節細胞の数、耳石器ならびに半規管の感覚細胞の数をカウントする。前庭神経節細胞については、アポトーシスを生じている細胞数なども評価する。個体間で比較する。

4. 研究成果

末梢前庭器の老化とその抑制をテーマに、老化動物を用いて形態学的・機能的な研究を行っている。機能的評価のためにビデオ記録装置を作成し、動物の眼球運動を記録できるシステムを構築して使用している。本システムでは回旋方向の眼球運動は記録できないが、XY方向の眼球運動を正確に記録できる。本来は眼球の瞳孔と強膜のコントラストを判断して眼球運動を判定する仕組みであるが、モルモットに最適化した条件で使用している。システムはデジタルカメラ対応の構成としており、眼球運動と電気刺激自体の同時記録ができるよう構築している。

末梢前庭器の電気刺激にあたっては、刺激機、アンプ、制御ソフト、非常に微小な針電極で構成されたシステムを用いており、刺激の強度ならびに形を自在にコントロールすることができる。現在、最適な刺激条件となる刺激の強度ならびに形は、過去の報告で示されている前庭神経節細胞から記録されたデータを参考に作成し、刺激器を用いている。

両側末梢前庭機能廃絶モデル動物は両側迷路破壊術により作成している。末梢前庭器への電気刺激は中耳を開放して電極を留置することにより行っている。具体的には側頭骨上面を明視下において顕微鏡下で前庭神経節に電極を刺入し、電気刺激の至適条件を

探る。眼球運動を完全にコントロールするには至っていないが、電極の留置位置や電流の大きさを微調整し、モルモットの各個体に応じた眼球運動を生じさせられる状態になっている。

5. 今後の展開

I. マウスの前庭機能評価：現時点ではなかなか安定したデータを得られずにいるため、測定機器などの精度やマウスの固定方法に工夫を加える。

II. 前庭リハビリテーション：専用の固定具にマウスと回転テーブルを固定し、一側末梢前庭機能廃絶群では廃絶側向きに、両側末梢前庭機能廃絶群では左右両側向きに回転させ、前庭リハビリを行う。リハビリ用の刺激を安定して行えるようにする。

III. 前庭電気刺激：LabChartで刺激電流を作成して刺激装置経由で週1回、30分間の電気刺激を行う。生じる眼球運動については個体間の差が大きいため、安定した刺激が行えるようにして、末梢前庭器の機能低下抑制を目指す。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

牛尾 宗貴 (USHIO, Munetaka)
東京大学・医学部附属病院・臨床登録医
研究者番号：70361483

(2)研究分担者

山下 真司 (YAMASHITA, Shinji)
東京大学・先端科学技術研究センター・
教授
研究者番号：40239968

(2)研究分担者

鈴木 光也 (SUZUKI, Mitsuya)
東邦大学・教授
研究者番号：50302724

(3)連携研究者

()

研究者番号：