

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11183

研究課題名(和文) 前庭代償の新しい評価法を用いた前庭代償の促進薬の開発：動物モデルを用いた研究

研究課題名(英文) Development of drugs that facilitate the processes of vestibular compensation using a new evaluation method with an animal model of vestibular compensation

研究代表者

武田 憲昭 (TAKEDA, Noriaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：30206982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：前庭代償の前期過程と後期過程を評価できるラットも動物モデルを開発した。前庭代償の前期過程は、一側内耳破壊後の自発眼振の消失過程で評価でき、内耳破壊42時間後に完成する。前庭代償の後期過程は、MK801により誘導される健側の前庭神経核のFos陽性ニューロン数の減少で評価でき、内耳破壊14日後に完成する。ヒスタミンH3受容体拮抗薬であるthioperamideは、前庭代償の前期過程に影響せず、後期過程を促進して完成時期を2日早めた。GABAA受容体作動薬であるdiazepamは、内耳破壊後の自発眼振の頻度を抑制したが消失時期は変化せず、前庭代償の前期過程に影響しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メニエール病、めまいを伴う突発性難聴、前庭神経炎などの一側性前庭障害によりめまいや平衡障害が発症するが、前庭代償により次第に軽快する。しかし、前庭代償が不十分のため、長期にめまいや平衡障害を訴える患者は少なくない。本研究結果から、ヒスタミンH3受容体拮抗薬の夜前庭代償を促進できる可能性が示唆された。本研究で用いたthioperamideは臨床では使用できないが、抗めまい薬であるbetahistineがヒスタミンH3受容体拮抗作用を持つことから、前庭代償不全の患者にbetahistineを長期に投与することにより、前庭代償を促進し、難治性めまい患者を治療できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We developed a new immunohistochemical method to evaluate the development of vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy (UL) in rats. The initial process of vestibular compensation is evaluated using the decline of the frequency of spontaneous nystagmus (SN) as an index in unilaterally labyrinthectomized rats. SN disappeared within 42 hours after UL. The late process of vestibular compensation is evaluated using the decline of the number of MK801-induced Fos-LIR neurons in contralateral medial vestibular nucleus (contra-MVn) as an index in unilaterally labyrinthectomized rats. The number of MK801-induced Fos-LIR neurons in contra-MVn gradually disappeared 14 days after UL. We showed that thioperamide, a histamine H3 receptor antagonist accelerated the late but not initial process of VC after UL. We then showed that diazepam, a GABAA receptor agonist did not accelerate the initial process of VC after UL.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：前庭代償 めまい

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 一側の末梢前庭機能が低下すると、めまいが発症し、著しい眼振や平衡障害が生じる。しかし、このような眼振や平衡障害は、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減していく。中枢前庭系の神経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。前庭代償は、前期過程と後期過程に分けられる。前庭代償の前期過程では小脳を介して健側前庭神経核ニューロンの自発発火が抑制されることにより、左右の前庭神経核ニューロンの活動性の不均衡が是正される。前庭代償の後期過程では、低下していた障害側の前庭神経核ニューロンの自発発火が回復してくる。これにより前庭代償が完成する。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。
- (2) 我々は、ラットの一側の内耳を破壊すると、障害側の内側前庭神経核に活性化されたニューロンが出現し、このニューロンが小脳片葉を介して対側内側前庭神経を抑制することが前庭代償の初期過程のメカニズムであることを明らかにしてきた。さらに我々は、一側内耳破壊後のラットに MK801 を投与すると、健側向き眼振が再出現する脱代償が誘発され、健側内側前庭神経核に Fos 陽性ニューロンが出現することを見出し、前庭代償の初期過程において小脳を介して抑制されていた健側内側前庭神経核のニューロンが可視化できることを明らかにした。健側前庭神経核の抑制は前庭代償の前期過程のメカニズムであることから、本研究では一側の内耳破壊後に MK801 によりラットに脱代償を誘発し、健側前庭神経核に出現する Fos 陽性ニューロン数が最大になる時点を前庭代償の前期過程の完成の指標として用い、さらに、MK801 により健側前庭神経核に Fos 陽性ニューロン数が出現しなくなった時点を前庭代償の後期過程の完成の指標として用いることで、前庭代償の新しい評価法となると考えた。

2. 研究の目的

(1) 前庭代償の後期過程を促進する薬物の開発

ヒスタミン H3 受容体はヒスタミン神経終末のシナプス前部に存在し、ヒスタミンの遊離を抑制する自己受容体であることから、ヒスタミン H3 受容体拮抗薬はヒスタミン神経終末からヒスタミンの遊離を促進し、前庭神経核の活動性を亢進させる。本研究では、H3 受容体拮抗薬である Thioperamide が前庭代償の後期過程を促進するが、前期過程には影響しないことを明らかにする。

(2) 前庭代償の前期過程を促進する薬物の開発

前庭代償の前期過程のメカニズムが小脳片葉プルキンエ細胞による健側前庭神経核の GABA 作動性抑制であること。本研究では GABA_A 受容体の α サブユニットに結合して GABA の作用を増強する diazepam が、前庭代償の前期過程を促進するが、後期過程には影響しないことを明らかにする。

2. 研究の方法

Wistar 種系ラット (7 週齢 150 ~ 200g) を使用。徳島大学動物実験管理規則に基づき、徳島大学 大学院医歯薬研究部 総合研究支援センター 動物資源研究部 動物実験委員会において承認を受けた。

イソフルラン吸入麻酔下にすべての外科的処置を行った。右耳後部切開後に、経外耳道的に鼓膜を穿破し、ツチ骨、キヌタ骨およびアブミ骨を除去し、卵円窓を確認し、卵円窓經由で 27G 針やドリルで小孔を開け、リンパ液の流出を確認後に、開放部位よ

り 99.5%エタノールを注入し、吸引を数回繰り返した。Sham 手術群は、耳介後部切開のみを行った。

内耳破壊術後 6、12 時間、1 日、2 日、3 日、5 日、7 日、12 日、14 日に、還流固定を行った。また、内耳破壊術後 6、12 時間、1 日、2 日、3 日、5 日、7 日、12 日、14 日に、ラットに MK801 (1.0mg/kg) を腹腔内に投与し、投与 2 時間後に還流固定を行った。還流固定後に、前庭神経核を含む脳幹を凍結後に 30 μ m の切片を作成した。1 次抗体に anti-Fos antibody を、2 次抗体に anti-rabbit IgG を用い、発色には DAB を用いた。免疫組織化学法により Fos を染色し、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。

ズームレンズ付き SONY 製ビデオカメラで 15 秒間の眼振数を 3 回測定した。眼振は、内耳破壊術後 30 分、1 時間、2 時間、3 時間、6 時間、12 時間、24 時間、30 時間、36 時間、42 時間の時点で測定した。

一側内耳破壊術後に、ラットに H3 受容体拮抗薬である thioperamide を浸透圧ポンプを用いて持続投与 (3.5mg/kg/日) し、前庭代償の前期過程と後期過程に及ぼす効果を検討した。さらに、一側内耳破壊術後に、ラットに GABA_A 受容体作動薬である diazepam を浸透圧ポンプを用いて持続投与 (3.5mg/kg/日および 7.0mg/kg/日) し、前庭代償の前期過程と後期過程に及ぼす効果を検討した。

3 . 研究成果

(1) 前庭代償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の開発

健側向きへの自発眼振は、内耳破壊術後 30 分で 25-35 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。

内耳破壊術 6 時間後に、Fos 陽性ニューロンは障害側前庭神経核に出現し、健側前庭神経核には出現しなかった。障害側前庭神経核の Fos 陽性ニューロン数は内耳破壊術 6 時間後に最大となり、その後徐々に減少し、内耳破壊術 5 日後には消失した。内耳破壊術後の MK801 投与後による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、sham 手術実施ラットとほぼ同程度となった。

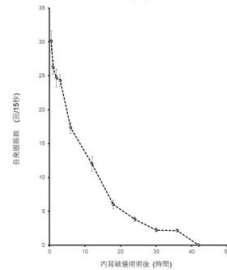
以上の結果から、本研究で、前庭代償動物モデルを用いた免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法を開発できた (図 1)。前庭代償の前期過程の完成は、内耳破壊術後に生じる自発眼振の消失時期と同時期でもあることから、内耳破壊術後の眼振の経時変化は前庭代償の前期過程を反映することが明らかとなった。

前庭代償の後期過程、すなわち障害側前庭神経核の活動性の回復を、内耳破壊術後の MK801 により誘導される健側前庭神経核の Fos 陽性ニューロン数の減少で評価できることを明らかにした。以上より、前庭代償モデルラットのコントロール群を作成した。

(2) 前庭代償の後期過程を促進する薬物の開発

前庭代償の前期過程の評価

眼振数は術後2日で消失する
—前庭代償の前期過程は2日で完成する



前庭代償の後期過程の評価

脱代償時の健側前庭神経核のFos陽性ニューロンは術後14日に消失する
—前庭代償の後期過程は14日で完成する

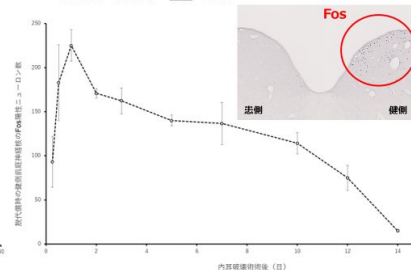


図1 前庭代償の新しい評価法

ヒスタミン H3 受容体は中枢ヒスタミン神経のシナプス前部に存在し、ヒスタミンの遊離を抑制する自己受容体であることから、H3 受容体拮抗薬は前庭神経ニューロンを興奮させる。一側内耳破壊術後ラットに H3 受容体拮抗薬である Thioperamide を浸透圧ポンプにより持続投与(3.5mg/kg/日)し、前庭代償の前期過程と後期過程に及ぼす効果を検討した。

Thioperamide 投与群は、コントロール群との間に内耳破壊術後の自発眼振数の経時変化に有意差を認めなかった(図2)。一方、内耳破壊術後ラットにおける MK801 投与による脱代償で発現する健側前庭神経核の Fos 陽性ニューロン数は、Thioperamide 投与群では術後12日目において Sham 手術群と同数となりコントロール群においては術後14日目において Sham 手術群と同数になっていた。この結果は、Thioperamide が前庭代償の完成を2日促進させたことを意味している。さらに、Thioperamide 投与群において、Vehicle 群と比較して、術後7、12日目において脱代償で発現する健側前庭神経核の Fos 陽性ニューロン数が有意に減少していた(図3)。この結果は、Thioperamide が内耳破壊術後7日目および12日目において前庭代償を有意に促進させていたことを意味している(図4)。以上の結果から、H3 受容体拮抗薬である thioperamide は、前庭代償の前期過程には影響せず、後期過程を促進することで前庭代償を促進させることが明らかとなった。

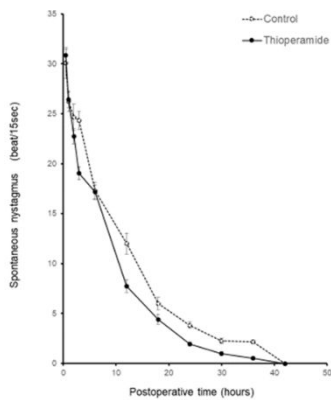


図2 一側内耳破壊術後ラットにおけるThioperamide投与群とコントロール群との眼振数の変化

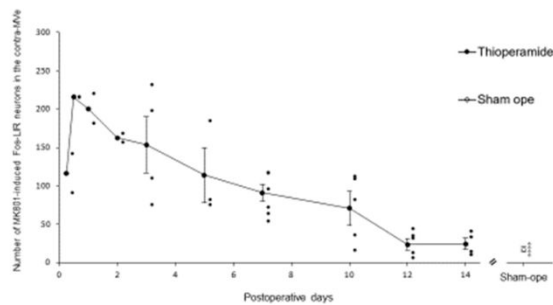
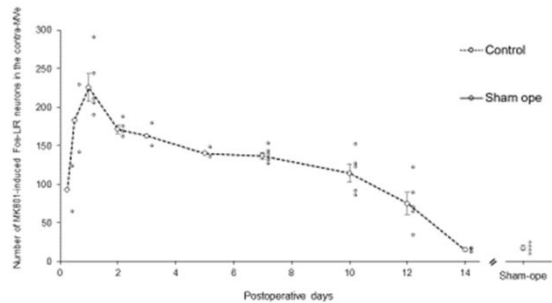


図3 一側内耳破壊術後ラットにおけるMK801による誘導される健側前庭神経に誘導されるFos陽性ニューロン数の経時的変化およびThioperamideの消失に対する効果

(3) 前庭代償の前期過程を促進する薬物の開発

前庭代償の前期過程のメカニズムが小脳片葉プルキンエ細胞による健側前庭神経核の GABA 作動性抑制であることから、GABA_A 受容体の α サブユニットに結合して GABA の作用を増強する diazepam が、前庭代償の前期過程を促進する可能性が示唆されている。本研究では、前庭代償モデルラットである一側内耳破壊術後ラットに GABA_A 受容体拮抗薬である diazepam を浸透圧ポンプにより持続投与(3.5mg/kg/日および7.0mg/kg/日)し、前庭代償の前期過程に及ぼす効果を濃度依存的に検討した。

Diazepam (3.5mg/kg/日) 投与群は、コントロール

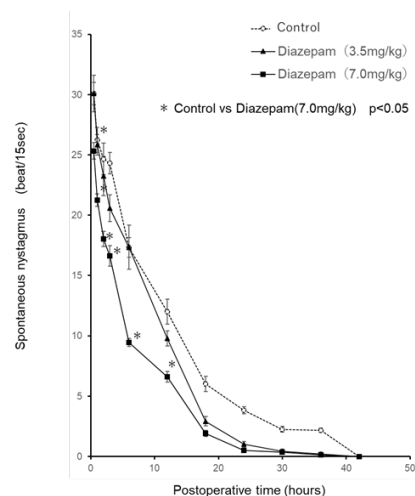


図5 一側内耳破壊術後ラットにおけるDiazepam投与群とコントロール群との眼振数の変化

群と比較し、内耳破壊術後の自発眼振数の経時変化に有意差を認めなかった(図5)。一方、Diazepam (7.0mg/kg/日)投与群はコントロール群と比較して、内耳破壊術後0.5時間、1時間、2時間、3時間、6時間、12時間における眼振数が有意に減少していたが、内耳破壊術後の眼振の消失時期は同時期であった。以上の結果から、前庭代償の前期過程は、内耳破壊術後の眼振数の経時変化で評価できることから、GABA_A受容体作動薬であるdiazepamは、前庭代償の前期過程には影響せず、前庭代償を促進させる効果は認めないことが明らかとなった。

<引用文献>

Kitahara T, Takeda N, Kiyama H, Kubo T. Molecular mechanisms of vestibular compensation in the central vestibular system--review. Acta Otolaryngol Suppl. 1998;539:19-27

Kitahara T, Takeda N, Saika T, Kubo T, Kiyama H. Effects of MK801 on Fos expression in the rat brainstem after unilateral labyrinthectomy. Brain Res. 1995 ;700(1-2):182-90.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

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. A new immunohistochemical method to evaluate the development of vestibular compensation after unilateral labyrinthectomy in rats. Acta Otolaryngol. 査読有, 2019 16:1-6

〔学会発表〕(計 2件)

動物モデルを用いた前庭代償の新しい評価法の開発とヒスタミンH3受容体拮抗薬による前庭代償の促進効果

松田和徳、北原 紘、伊藤妙子、福田潤弥、佐藤 豪、関根和教、東 貴弘、北村嘉章、阿部晃治、武田憲昭

第77回日本めまい平衡医学会 平成30年11月28日～30日 山口

一側内耳破壊ラットにおける免疫組織化学的手法による前庭代償の新しい評価法と前庭代償の進行過程の可視化

松田和徳、北原 紘、伊藤妙子、佐藤 豪、蔭山麻美、東 貴弘、関根和教、北村嘉章、阿部晃治、武田憲昭

第76回日本めまい平衡医学会 平成29年11月29日～12月1日 軽井沢

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：坂田 ひろみ

ローマ字氏名：(SAKATA, hiromi)

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号(8桁): 50294666

(2)研究分担者

研究分担者氏名：北村 嘉章

ローマ字氏名：(KITAMURA, yoshiaki)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学系)

職名：講師

研究者番号(8桁): 60380028

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。