

平 21 年 12 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19591975

研究課題名（和文）前庭性嘔吐反射中枢の機能地図の解明：動物モデルを用いた研究

研究課題名（英文）Neural mechanism of vestibular vomiting:an animal model study

研究代表者

武田 憲昭（TAKEDA NORIAKI）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：30206982

研究成果の概要：

過重力刺激により動揺病を発症させたラットを用いて Fos を神経活性化の指標とした免疫組織化学法を行い、嘔吐反射に関与する中枢神経系、特に扁桃体の中心核の嘔吐反射への関与を検討した。その結果、過重力による前庭刺激により中継核である LPBN のニューロンが興奮し、その出力が扁桃体の中心核を興奮させたと考えられた。さらに、過重力刺激による空間識異常により興奮した視床下部ヒスタミンニューロンが、ヒスタミン H1 受容体を介して扁桃体の中心核を興奮させ、嘔吐反射が引き起こされる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：耳鼻咽喉科学

科研費の分科・細目：

キーワード：過重力、動揺病、嘔吐反射、扁桃体、ヒスタミン H1 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

めまい発作時の嘔吐や動揺病は、前庭自律神経反射を介する前庭性の嘔吐である。嘔吐中枢は延髄にあり、孤束核、迷走神経背側核、延髄網様体核、最後野などの複合体であると考えられている。しかし、嘔吐中枢複合体を

形成する各神経核の詳細な分布や機能分担は不明である。また、嘔吐には情動が大きく影響することから、海馬や扁桃体などの大脳辺縁系の関与も大きいと考えられる。また、予測性嘔吐などには、大脳皮質も関与している可能性がある。

我々は、動揺病の動物モデルを開発し、めまい、すなわち空間識異常が視床下部のヒスタミンニューロンを興奮させ、ヒスタミン H1 受容体を介して嘔吐中枢を興奮させることを明らかにしてきた。しかし、視床下部からのヒスタミン神経作動性下向性シグナルの出力経路は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々の動揺病の動物モデルである過重力刺激により動揺病を発症させたラットに、最初期遺伝子 *c-fos* の遺伝子産物である Fos を神経活性化の指標とした免疫組織化学法を行い、嘔吐反射に関与する中枢神経系の機能地図を解明する。本研究では、特に大脳辺縁系に属する扁桃体の中心核に過重力の前庭刺激に特異的に Fos 陽性ニューロンが発現し、嘔吐反射に関与することを検討した。

次に、視床下部のヒスタミン神経からのヒスタミン H1 受容体を介した入力により扁桃体中心核が刺激されることを明らかにする目的で、過重力刺激で Fos を発現するニューロンがヒスタミン H1 受容体を発現しているかについて、免疫二重染色で検討した。また、あらかじめヒスタミン H1 受容体拮抗薬を投与したラットに過重力刺激を与えた場合、扁桃体中心核における Fos の発現が抑制されるかについても検討した。

## 3. 研究の方法

### 動物

Wistar 系雄ラット (180-200g) を用いた。  
内耳破壊

### 薬物投与

ヒスタミン H1 受容体拮抗薬である mepyramine (30mg/kg) と diphehydramine (40mg/kg) を生理食塩水に溶解し、過重力刺激開始 10 分前にラットの腹腔内に投与した。

### 過重力刺激

我々が開発した、ラット用過重力刺激装置を用いた。刺激条件としては、2G で 3 時間刺激を用い、ラットの背側から腹側に刺激を与えた。

### 免疫組織化学

ラットを経心臓的に灌流固定した。ラットの脳を摘出してクライオスタットにより凍結切片を 20  $\mu$  m の厚さで作成し、ABC (avidin-biotin complex) 法により抗 Fos 抗体を第一抗体とした免疫組織化学法を行った。免疫二重染色

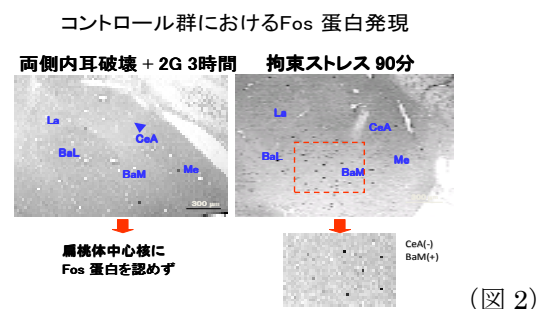
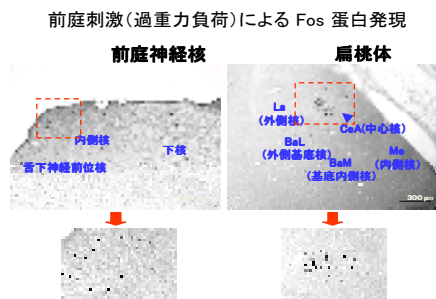
同様に作成した凍結切片に、第一抗体を抗 Fos 抗体 (ウサギ)、第二抗体を抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) に FITC をラベルした抗体を反応させた。さらに、第一抗体に抗ヒスタミン H1 受容体抗体 (マウス)、第二抗体に抗マウス IgG 抗体 (モルモット) に Cy3 をラベルした抗体を反応させた。共焦点傾向顕微鏡で観察し、両抗体の同一ニューロンにおける共存を検討した。

## 4. 研究成果

ラットに 2G の過重力刺激を 3 時間与えたところ、前庭神経核に Fos 陽性ニューロンが認められた (図 1 左)。しかし、ラットを過重力刺激装置の横において過重力刺激を与えずノイズのみを与えても、前庭神経核に Fos 陽性ニューロンは出現しなかった。さらに両側の側の内耳を破壊したラットに 2G の過重力刺激を 3 時間与えても、前庭神経核に Fos 陽性ニューロンは出現しなかった。この結果から、過重力による前庭刺激により、前庭神経核のニューロンが興奮したと考えられる。

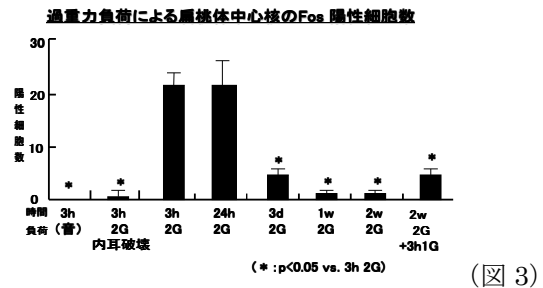
次にラットに 2G の過重力刺激を 3 時間与えたところ、扁桃体の中心核に Fos 陽性ニューロンが認められた (図 1 右)。しかし、ラ

ットを過重力刺激装置の横において過重力刺激を与えずノイズのみを与えても、扁桃体の中心核には Fos 陽性ニューロンは出現しなかった。さらに、さらに両側の側の内耳を破壊したラットに 2G の過重力刺激を 3 時間与えても、扁桃体の中心核に Fos 陽性ニューロンは出現しなかった (図 2 左)。ところが、ラットに 90 分の拘束ストレスを与えたところ、扁桃体の内側核に Fos 陽性ニューロンが認められた (図 2 右)。以上の結果から、過重力による前庭刺激により扁桃体の中心核のニューロンが興奮したと考えられる。拘束ストレスのようは非特異的刺激により扁桃体の内側核に Fos 陽性ニューロンが出現し、嘔吐を引き起こすリチウム投与により扁桃体の中心核に Fos 陽性ニューロンが出現することから、過重力刺激により扁桃体の内側核に出現する Fos 陽性ニューロンは、過重力刺激により発症する動揺病 (嘔吐反射) に関与している可能性が考えられる。

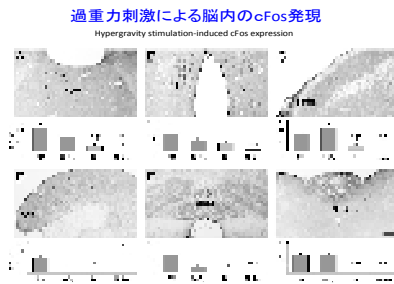


ラットに 2G の過重力刺激を長時間与え、扁桃体の中心核の Fos 陽性ニューロンの変化を検討した。24 時間の過重力刺激では 3 時間刺激と同様に扁桃体の中心核の Fos 陽性ニュー

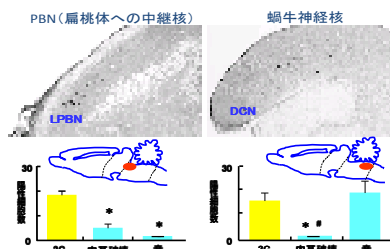
ロンが認められたが、3 日以上 of 過重力刺激を行うと、Fos ニューロンは減少した (図 3)。過重力刺激によるラットの動揺病も、過重力刺激を 3 日以上、持続すると慣れの減少で抑制されてくることから、過重力刺激により扁桃体の内側核に出現する Fos 陽性ニューロンは、嘔吐反射に関与している可能性が考えられた。



ラットに 2G の過重力刺激を 3 時間与えた際の、脳の他の部位における Fos 陽性ニューロンの発現を検討した (図 4)。Paraventricular thalamic nucleus (PVT)、paraventricular hypothalamic nucleus (PVH)、lateral parabrachial nucleus (LPBN)、dorsal cochlear nucleus (DCN)、Inferior olive dorsomedial cell group (IODM)、nucleus of solitary tract (NST) に fos 陽性ニューロンが認められた。過重力刺激により LPBN に認められた Fos 陽性ニューロンは、両側内耳破壊ラットや音刺激だけでは認められなかったことから (図 5 左)、過重力による前庭刺激により LPBN のニューロンが興奮したと考えられる。LPBN は扁桃体の中心核と線維連絡を持つことから、LPBN は前庭入力扁桃体の中心核へ至る中継核の可能性が考えられる。一方、過重力刺激で DCN に認められた Fos 陽性ニューロンは、両側内耳破壊ラットでは認められなかったが、音刺激により発現した (図 5 右)。DCN のニューロンは過重力刺激の音刺激に興奮したと考えられた。

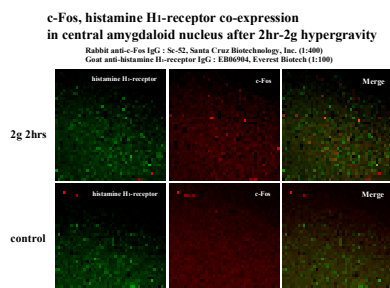


(図 4)



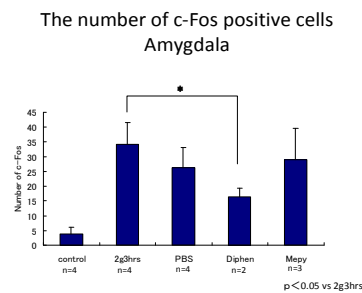
(図 5)

我々の以前の研究から、過重力などの前庭刺激が空間識を障害して動揺病が発症する際には、視床下部のヒスタミンニューロンが興奮し、ヒスタミン H1 受容体を介して嘔吐反射を引き起こされることを明らかにしてきた。しかし、視床下部からのヒスタミン神経作動性下向性シグナルの出力経路は不明である。過重力刺激により興奮した視床下部ヒスタミンニューロンがヒスタミン H1 受容体を介して扁桃体の中心核に入力する可能性を検討する目的で、過重力刺激により扁桃体の中心核に発現する Fos 陽性ニューロンはヒスタミン H1 受容体を発現しているかについて、免疫二重染色により検討した。その結果、ラットに 2G の過重力刺激を 2 時間与えた時に扁桃体の中心核に出現する Fos 陽性ニューロンの一部が、ヒスタミン H1 受容体を共発現していた (図 6)。



(図 6)

さらに、あらかじめラットにヒスタミン H1 受容体拮抗薬である mepyramine と diopenhydramine を投与し、2G の過重力刺激を 2 時間与えた場合の扁桃体の中心核に出現する Fos 陽性ニューロンに対する影響を検討した。その結果、mepyramine では変化は認められなかったが、diphenhydramine により扁桃体の中心核の Fos 陽性ニューロンが減少した (図 7)。



(図 7)

これらの結果から、過重力刺激による空間識異常により興奮した視床下部ヒスタミンニューロンが、ヒスタミン H1 受容体を介して扁桃体の中心核を興奮させ、嘔吐反射を引き起こされる可能性が示唆された。

##### 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 7 件)

1. T. Imai, N. Takeda, G. Sato, K. Sekine, M. Ito, K. Nakamae, T. Kubo: Changes in slow phase eye velocity and time constant of positional nystagmus at transform from cupulolithiasis to canalolithiasis. *Acta Otolaryngol.* 128: 22-28, 2008 査読あり
2. T. Imai, N. Takeda, G. Sato, K. Sekine, M. Ito, K. Nakamae, T. Kubo: Differential diagnosis of true and pseudo-bilateral benign positional nystagmus. *Acta Otolaryngol.* 128: 151-158, 2008 査読あり
3. S. Ohyama, S. Nishiike, H. Watanabe, K. Matsuoka, N. Takeda: Effects of optokinetic stimulation induced by virtual reality on

locomotion: a preliminary study. Acta

Otolaryngol. 128: 1211-1214, 2008 査読あり

4. 島田亜紀, 関根和教, 佐藤 豪, 武田憲昭: 回転性めまいで発症した若年性 Wallenberg syndrome の 2 症例. Equilibrium Res. 67 : 115-120, 2008 査読あり
5. 佐藤 豪, 今井貴夫, 関根和教, 北村嘉章 武田憲昭: 頸性めまいを訴えた Bow hunter's stroke 例. Equilibrium Res. 67 : 301-306, 2008 査読あり
6. S. Ohyama, S. Nishiike, H. Watanabe, K. Matsuoka, H. Akizuki, N. Takeda, T. Harada: Autonomic responses during motion sickness induced by virtual reality. Auris Nasus Larynx. 34 303-306, 2007 査読あり
7. 佐藤 豪, 梅原隼人, 水川奈己, 宇野敦彦, 堀井 新, 関根和教, 田村公一, 福井裕行, 武田憲昭: 過重力負荷ラットの視床下部におけるヒスタミン H1 受容体 mRNA 発現の変化. 頭頸部自律神経 21 : 45-48, 2007 査読なし

[学会発表] (計 13 件)

1. 第 67 回日本めまい平衡医学会 平成 20 年 10 月 29 日～31 日 秋田  
アルコール性頭位眼振の 3 次元主軸解析:  
関根和教, 中川英幸, 今井貴夫, 佐藤 豪,  
武田憲昭
2. 第 67 回日本めまい平衡医学会 平成 20 年 10 月 29 日～31 日 秋田  
新しい眼球運動解析システム: 今井貴夫, 御堂義博, 関根和教, 佐藤 豪, 中前幸治,  
武田憲昭
3. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum  
Amicitiae Sacrum Berlin Germany 2008. 8.  
24-27  
N. Takeda: Three Dimensional eye rotation axis  
Analysis of benign Paroxysmal Positional  
Nystagmus is patients with the posterior canal

type of BPPV.

4. 第 109 回日本耳鼻咽喉科学会 平成 20 年 5 月 15 日～17 日 大阪  
過重力刺激によるラット脳内のヒスタミ H1 受容体発現への影響 動揺病発症との関連:  
佐藤 豪, 宇野敦彦, 堀井 新, 北村嘉章,  
関根和教, 田村公一, 武田憲昭
5. XXV Bárány Society Meeting, Kyoto, 2008.  
3.31 - 4.3  
K. Sekine, H. Nakagawa, G. Sato, T. Imai, N. Takeda: Efficacy of Postural Restriction in Treated Patient with Benign Paroxysmal Positional Vertigo.
6. XXV Bárány Society Meeting, Kyoto, 2008.  
3.31 - 4.3  
G. Sato, H. Umehara, A. Horii, A. Uno, Y. Kitamura, K. Sekine, K. Tamura, H. Fukui, N. Takeda: Effects of Hypergravity on the Expression of Histamine H1-receptor mRNA in the Rat Brain.
7. XXV Bárány Society Meeting, Kyoto, 2008.  
3.31 - 4.3  
T. Imai, N. Takeda, K. Sekine, G. Sato, T. Kubo: Three Dimensional Analysis of Various Type of Benign Paroxysmal Positional Nystagmus.
8. 厚生労働省 難治性疾患克服研究事業  
前庭機能異常に関する調査研究班 平成 19 年度報告会 平成 20 年 1 月 20 日 大阪  
レモワイエ症候群の長期予後と発症機に関する考察: 武田憲昭, 関根和教, 佐藤 豪
9. Collegium Oto-Rhino-Laryngologicum  
Amicitiae Sacrum 26-29 August 2007 Seoul  
Histaminergic mechanisms of motion sickness : An animal model study: N. Takeda
10. 第 66 回めまい平衡医学会 平成 19 年 11 月 14 日-16 日 大阪  
過重力刺激がラットの脳内のヒスタミ H1

受容体遺伝子発現に及ぼす影響: 佐藤 豪, 梅原隼人, 水川奈己, 堀井 新, 宇野敦彦, 北村嘉章, 関根和教, 田村公一, 福井裕行, 武田憲昭

11. 第66回めまい平衡医学会 平成19年11月14日-16日 大阪  
良性発作性頭位めまい症の頭位変換眼振第二相の検討: 今井貴夫, 武田憲昭, 関根和教, 佐藤 豪, 久保 武

12. 第66回めまい平衡医学会 平成19年11月14日-16日 大阪  
Epley 法施行後の頭位保持時間が BPPV の治癒率に及ぼす影響  
関根和教, 中川英幸, 佐藤 豪, 今井貴夫, 武田憲昭

13. 厚生労働省 難治性疾患克服研究事業  
前庭機能異常に関する調査研究班平成18年度報告会 平成19年2月3日 大阪  
眼振の3次元主軸解析による両側性後半規管型 BPPV の病態解明: 武田憲昭, 佐藤 豪, 関根和教, 今井貴夫

[図書] (計4件)

1. 武田憲昭

高齢者のめまい診断における pitfall: 高齢者のメニエール病  
ENTONI 87: 63-66, 2008

2. 佐藤 豪, 武田憲昭

難聴の神学: Meniere 病  
神経内科 68: 422-428, 2008

3. 武田憲昭

急性めまいと慢性めまい -診断・治療の差-  
めまい薬物治療の EBM 評価  
ENTONI 75: 31-36, 2007

4. 今井貴夫, 武田憲昭

眼球運動3次元回転軸解析の臨床応用  
耳鼻咽喉科臨床 100: 599-613, 2007

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 憲昭 (TAKEDA NORIAKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 30206982

(2) 研究分担者

福井 裕行 (FUKUI HIROYUKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 90112052