

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20591975

研究課題名（和文）サルを用いた強大音による外眼筋誘発筋電位動物モデル作成

研究課題名（英文）Ocular vestibular evoked myogenic potentials in monkeys

研究代表者

将積 日出夫 (SHOJAKU HIDEO)

富山大学大学院医学薬学研究部（医学）・准教授

研究者番号：60187507

研究成果の概要（和文）：外眼筋における前庭誘発筋電位 VEMP (OVEMP) のモデル動物作成を検討した。覚醒サル眼窩下方に記録電極を貼付して強大音に対する反応を記録した。刺激開始から短潜時に二相性の誘発波形（陰性波に続く陽性波）を記録した。この反応は、①眼位の影響を受け、②対側優位であり、③低刺激周波数で閾値が低かった。これらの特徴は、ヒトでの OVEMP の特徴と類似しており、今回の実験系はヒト OVEMP のモデル動物として利用可能であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：In order to prepare an animal model of the ocular vestibular evoked myogenic potentials (OVEMP), an intense short tone burst was applied to the unilateral ear of the alert monkeys and evoked responses were evaluated by the surface electrode stuck on the buccal skin. These responses were a negative-positive waveform with a short latency, a high-threshold, contralateral predominance, and influenced by the eye position. These characteristics were similar to those of the OVEMP in humans, suggesting that these buccal responses might be a useful animal model of human OVEMP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2400000	720000	3120000
2009年度	500000	150000	650000
2010年度	700000	210000	910000
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：耳鼻咽喉科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：サル、強大音、誘発筋電位、外眼筋、球形囊

## 1. 研究開始当初の背景

2005年にColebatchのグループは強大音刺激により眼窩周囲から短潜時の誘発筋電位が出現すること、この反応が両側前庭障害の患者では消失していること、高度感音難聴の患者や眼球摘出後の患者にて記録されることから前庭由来の外眼筋誘発筋電位であると報告した。末梢前庭器のうちこれまで強大音刺激に対して応答すると考えられてきたのは球形囊であり、球形

囊の電気刺激により比較的閾値が高いが垂直方向への眼球運動が解発されることが知られている。このことから、この外眼筋誘発筋電位も胸鎖乳突筋で記録される前庭誘発筋電位と同様、球形囊由来である可能性がある。しかしながら、球形囊神経を刺激しても、応答する外眼筋運動ニューロン活動は多シナプス性であり、応答率は40%と低いことから、球形囊の刺激により外眼筋に再現性の高い誘発筋電位を発

現できるかどうかについては疑問が残る。球形囊以外の末梢前庭器のうち、卵形囊との関連性が指摘されているが、起源については依然明らかではない。強大音により外眼筋誘発筋電位は、末梢前庭器の障害のみならず、前庭動眼反射弓の異常を他覚的に検査することが可能な新しい検査手技であり、頸筋の筋緊張が不要で、小児や高齢者にも容易に施行することが可能であるため、臨床診断学的価値は高く、今後の臨床応用が期待される。しかしながら、動物モデルを用いた基礎的な研究は行われていない。

## 2. 研究の目的

強大音により外眼筋に誘発されるヒト誘発筋電位は、短潜時、高閾値、対側優位性、上方視優位性などの特徴をもち、末梢前庭器（耳石器）由来の前庭動眼反射弓の機能検査であると考えられ、臨床応用が期待されている。しかしながら、これまで覚醒した動物での同様の研究は全くおこなわれておらず、起源や詳細な神経経路について基礎的に十分な解明は行われていない。動物モデルの作成ができれば、起源や神経経路と推定される末梢前庭器や上下前庭神経の障害の影響を検討することで、OVEMPの神経機構を明らかにすることが可能となる。OVEMPは視線の影響を受けるため、検査中、視線保持が可能な種を選ぶ必要がある。そこで、今回の研究では、訓練により上方視保持を可能とすることができるサルを対象として強大音に応答するサル眼窩周囲の誘発反応を測定することで、OVEMPのモデル動物作成を試みた。

## 3. 研究の方法

対象は、覚醒成熟ニホンザルとした。まず、頭部固定用ホルダーの設置手術を行った。その後、注視課題の訓練を行い、サルが視覚刺激呈示用モニターを注視するよう訓練した。

手術：サル頭部を無痛的に保持する目的で、サル頭部に固定用ホルダーの設置手術を行った。手術はペントバルビタールナトリウム麻酔下にて無菌的に行った。手術中は、心電図、血圧および呼吸運動をモニターし、さらに直腸温モニターおよびヒーターを用いて直腸温が  $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  になるように調節した。サル用脳定位固定装置にサルを固定して頭皮を除去後、強化プラスチック製フレーム（頭部固定用ホルダー）をチタン製ビスおよび歯科用セメントを用いて脳定位的に頭骨に固定した。手術終了後、サルの体調を観察しつつ、抗生物質および鎮痛剤を数日間にわたって投与し、痛みおよびそれに伴うストレスの軽減をはかった。

注視課題の訓練：手術後に1週間以上の回復期間を置いた後、頭部を固定した状態で注視課題の訓練を行った。初期訓練では、サルをモンキーチェアに座らせ、モンキーチェア上に設置してある脳定位固定装置に頭部を固定した。この際、頭部固定用ホルダーを固定するので、サルは痛みを感じない。また、頭部の固定によるストレスを軽減させる目的で、頭部固定中は少量の報酬（ゼリービーンズや果物など）を与えつつ、頭部固定時間を徐々に延長し、実験環境に対する馴化を行った。

次に、視覚刺激に対する注視課題の訓練を行った。サルの頭部を固定した状態で、視覚刺激呈示用モニターに視標を呈示し、サルが視標を一定時間以上注視したら報酬としてジュースを与えた。視線の計測は、サルの前方に設置した赤外線 CCD カメラおよび眼球撮影記録装置 (Matsuda, et al., 2000) により行った。サルに報酬を与えるまでの注視時間を徐々に延長し、5秒以上の連続した注視ができるようにした。この訓練により、サルは視覚刺激呈示用モニターに呈示された視覚刺激を連続して注視するようになった。

聴覚誘発電位の記録：眼窩下方の頬部皮膚上に閾電極および不閾電極、前額部に接地電極を貼付した。不閾電極は上眼瞼直上および下眼瞼直下、不閾電極は閾電極より5mm下方に接着させた。イヤホンにて片側耳にトーンバースト音（ $\sim 135\text{dBnSPL}$ ）、対側耳には白色雑音（刺激音の $-30\text{dB SPL}$ ）を加えた。音刺激中は前方のモニター上に呈示した視標を固視させることで、上方視を保持させた。記録は、刺激耳と同側、対側の両側で行い比較した。さらに、刺激周波数を500Hz、1kHz、2kHz、4kHzと変化させ、周波数毎に閾値を測定、比較した。眼位の影響は、前方モニター上の視標を上方、下方に変化させ、検査中の固視を維持させることで、上方および下方固視時の反応を比較検討した。

## 4. 研究成果

結果：眼窩下方、下眼瞼直下に不閾電極を貼付した場合、音刺激開始から20msec以内の短潜時に二相性の誘発波形が記録された。初めに観察される陰性波をn1、引き続き記録される陽性波をp1と命名した。n1およびp1の波長潜時はそれぞれ9msecおよび13msecであった。音刺激と同側、対側の記録を比較すると、対側記録の振幅が同側よりも大きかった。さらに、刺激周波数の変化により低い刺激周波数の閾値は高い刺激周波数よりも低かった。しかしながら、n1潜時は刺激周波数により変化を受けなかった。上方固視時の振幅は下方

よりも大きかった。上眼瞼上方記録では、下眼瞼直下記録に比べ、小さな反応であった。

考察：従来、末梢前庭器の中で球形嚢のみが強大音に反応すると考えられていた。これは、球形嚢が胎生期に蝸牛の原器となること、蝸牛をもたない下等動物では球形嚢が蝸牛の代わりに聴覚受容器となっていること、モルモット、ネコにおいて下前庭神経で強大音に反応する神経活動を記録し、活動部位へ注入した神経解剖学的なトレーサーによりその起源が球形嚢であったことが根拠となっていた。一方、最近、Curthoy のグループの研究から、上前庭神経内でも強大音に反応する神経活動が記録され、その起源が卵形嚢であることが明らかとされてきた。つまり、強大音に反応する末梢前庭器としては球形嚢以外にも卵形嚢が有力な候補であることが知られてきた。

2種類の耳石器により前庭神経核まで運ばれた音刺激関連前庭性シグナルは、前庭眼反射弓や前庭脊髄路により外眼筋や頸部、体幹、四肢へ運ばれる。内野らのグループにより、これらの神経機構は耳石器毎に詳細に調べられている。要約すると、球形嚢は前庭脊髄路、卵形嚢は前庭眼反射弓への連絡が優位であるという特徴が明らかとされた。耳石器毎の連絡部位の特徴から、Curthoy は、強大音に反応する前庭性誘発筋電位として臨床応用されている2種類の反応のうち、頸部の胸鎖乳突筋で記録される Cervical VEMP (CVEMP) は球形嚢、外眼筋で記録される OVEMP は卵形嚢機能検査であると報告している。臨床的に、めまい患者に OVEMP と CVEMP 結果に乖離例があることはその考えを裏付けているが、それらの乖離例で、内耳の部分破壊や前庭神経の部分障害があるかどうかを確認することは不可能である。これらの点を明らかにする1つの方法としては、OVEMP 動物モデルを作成し、内耳や前庭神経の部分障害モデルを検討することであると考えられる。

今回の研究では、ヒト OVEMP の動物モデル作成を目的に、サル眼窩周囲から強大音刺激で記録される誘発反応を検討した。その結果、強大音によりサル眼窩下方で記録される誘発反応は、①高閾値、②眼位の影響を受け、③対側優位であり、④低刺激周波数で閾値が低いことが明らかとなった。これらの特徴は、ヒトでの OVEMP の特徴と類似しており、聴性脳幹反応などの蝸牛由来の反応とは明らかに異なっていた。そのため、今回の実験系はヒト OVEMP のモデル動物として利用可能であると考えられた。

これまで本研究のように、ヒト以外のほ乳類で OVEMP に類似した誘発反応を眼窩下方で記録した研究は、国内外ともになく、全く新しい知見が得られたと考えられる。今後、本動物モデルに対して前庭神経切断術の影響を見ることで、この誘発反応が前庭性であることを確認していく必要がある。さらに、前庭神経は上下2本に分かれ、上前庭神経は卵形嚢、下前庭神経は球形嚢からの情報を前庭神経核へ伝搬している。本動物モデルに対して、上、下単独の前庭神経切断術を行うことで、前庭神経部分障害モデルを作成することができる。その OVEMP への影響を見ることで、ヒト OVEMP の起源、神経径路がさらに解明されることが期待される。

結論：サル眼窩下方にて強大音に反応する高閾値・短潜時・対側優位性の二相性誘発反応を記録した。この反応は、類似性からヒト OVEMP の動物モデルとして利用可能であると考えられた。

## 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 14 件)

- ① Shojaku H, Watanabe Y, Mineta H, et al. Long-term effects of the Meniett device in Japanese patients with Meniere's disease and delayed endolymphatic hydrops reported by the Middle Ear Pressure Treatment Research Group of Japan. Acta Otolaryngol (Stockh) 査読有り 131:277-283, 2011.
- ② Shojaku H, Watanabe Y, Takeda N, et al. Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops in Japan: a nation-wide survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. Acta Otolaryngol (Stockh) 査読有り 130:1135-1140, 2010.
- ③ 將積日出夫. 耳石機能検査としての VEMP Equilibrium Res 査読有り 69:168-175, 2010.
- ④ Tazumi T., Hori E., R S. Maior., Ono T., Nishijo N. Neural correlates to Seen gaze-direction and head orientation in the macaque monkey amygdala. Neuroscience 査読有り 169: 287-301, 2010.
- ⑤ Maior RS, Hori E, Tomaz C, Ono T, Nishijo H. The monkey pulvina neurons differentially respond to emotional expressions of human faces. Behav Brain Res 査読有り 215: 129-135,

- 2010.
- ⑥ Hori E, Takamoto K, Urakawa S, Ono T, Nishijo H. Effects of acupuncture on the brain hemodynamics. *Autonomic Neurosci-Basic* 査読有り 157:74-80, 2010.
- ⑦ Shojaku H, Watanabe Y, Yagi T. Changes in the characteristics of definite Meniere's disease over time in Japan: a long-term survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan, formerly the Meniere's Disease Research Committee of Japan. *Acta Otolaryngol (Stokh)* 査読有り 129:155-160, 2009.
- ⑧ Tsubota M, Shojaku H, Watanabe Y. Prognosis of inner ear function in pneumolabyrinth: case report and literature review. *Am J Otolaryngol* 査読有り 30:423-426, 2009.
- ⑨ Hori E, Tsunoda M, Takeshima M, Suzuki M, Kurachi M, Ono T, Nishijo H. Sexual Influence on Gaze-Guided Social Attention. *Neurobiologia* 査読有り 72: 9-20, 2009.
- ⑩ Shojaku H, Watanabe Y, Tsubota M, Katayama N. Evaluation of the vestibular evoked myogenic potential during parabolic flight in humans. *Exp Brain Res* 査読有り 187:477-481, 2008.
- ⑪ Tsubota M, Shojaku H, Ishimaru I. Mumps virus may damage the vestibular nerve as well as the inner ear. *Acta Otolaryngol (Stockh)* 査読有り 128:644-647, 2008.
- ⑫ Mao CV, Hori E, Maior RS, Ono T, Nishijo H. A primate model of Schizophrenia using chronic PCP treatment. *Review Neurosci* 査読有り 19: 83-89, 2008.
- ⑬ Nishijo H, Hori E, Tazumi T, Ono T. Neural correlates to both emotion and cognitive functions in the monkey amygdala. *Behav Brain Res* 査読有り 188: 14-23, 2008.
- ⑭ Umeno K, Hori E, Tsubota M, Shojaku H. et al. Effects of direct Cedrol inhalation into the lower airway on autonomic nervous activity in totally laryngectomized subjects. *Br J Clin Pharmacol* 査読有り 65:188-196, 2008.
- [学会発表] (計 14 件)
- ① 坪田雅仁, 将積日出夫, 堀悦郎 他. 強大音刺激により無麻酔サル眼窩周囲で記録される誘発反応の検討. 第 69 回日本めまい平衡医学会総会. 2010. 11.19. 京都.
- ② Shojaku H, Watanabe Y, Mineta H. Long-term effects of the Meniett device in Japanese patients with Meniere's disease and delayed endolymphatic hydrops reported by the Middle Ear Pressure Treatment Research Group of Japan. 6<sup>th</sup> International Symposium on Meniere's disease and Innear Ear Disorders. 2010.11.16. Kyoto, Japan.
- ③ Shojaku H, Watanabe Y, Takeda N, et al. Clinical characteristics of delayed endolymphatic hydrops in Japan: a nation-wide survey by the Peripheral Vestibular Disorder Research Committee of Japan. 26<sup>th</sup> Barany Society Meeting. 2010. 8. 20. Reykjavik, Iceland.
- ④ 堀悦郎, Maior RS, Tavares MC, Tomaz C, 小野武年, 西条寿夫. 幼若サルの社会行動における上丘の役割. 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク夏のワークショップ. 2010.7.27. 札幌.
- ⑤ 堀悦郎, 小野武年, 西条寿夫. 瞳孔反応と情動. 電子情報通信学会 イメージクオリティ研究会 基調講演, 2010.8.27. 富山.
- ⑥ Hori E., R S.Maior, Tavares M C, Tomaz C, Ono T, Nishijo H. Role of the superior colliculus in social behaviors of infant monkeys. *Neuro* 2010.9.1. Kobe, Japan.
- ⑦ 堀悦郎, 小野武年, 西条寿夫. 社会的学習に関連したサル内側前頭葉ニューロンの応答. 霊長類研究所共同研究会「社会・報酬・経済と脳」. 2010. 11.1. 名古屋.
- ⑧ 堀悦郎, 小野武年, 西条寿夫. 社会的認知の脳内機構. 第 4 回日本情動研究会, 2009. 10. 24. 富山.
- ⑨ Takakura H, Shojaku H, Kobayashi T. Cortical response to right caloric stimulation detected by functional near infrared spectroscopy (NIRS). 25th Barany Society Meeting. 2008. 4.1. Kyoto, Japan.
- ⑩ Tsubota M, Shojaku H, Hori E, et al. Effects of vestibular nerve section on sound-evoked myogenic potentials in the sternocleidomastoid muscle of monkeys. 25th Barany Society Meeting. 2008. 4.2. Kyoto, Japan.
- ⑪ Shojaku H, Watanabe Y, Tsubota M, et al. Epidemiologic characteristics of definite Meniere's disease in Japan. 25th Barany Society Meeting. 2008. 4.2. Kyoto, Japan.

- ⑫ 坪田雅仁, 将積日出夫, 安村佐都紀, 渡辺行雄, 片山直美: 放物線飛行中の VEMP の左右差と自律神経症状との関係. 第 67 回めまい平衡医学会. 2008. 10. 30-31. 秋田.
- ⑬ 堀悦郎, Nguyen MN, 浦川将, 小野武年, 西条寿夫. 社会的な視覚刺激に対するサルの認知過程—視線計測による解析—. 第 55 回中部日本生理学会. 2008. 10. 17-18. 愛知.
- ⑭ 堀悦郎, 西条寿夫. 皮質下領域のニューロンによる社会的認知. 生理学研究所研究会 大脳皮質—大脳基底核連関と前頭葉機能 (第 2 回). 2008. 12. 15-16. 岡崎.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 将積日出夫. 前庭誘発筋電位 (VEMP). 「イラスト」めまいの検査 [改訂第 2 版] (日本めまい平衡医学会編), 診断と治療社, 東京, 2009. pp. 90-91.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)  
○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

将積 日出夫 (SHOJAKU HIDEO)  
富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) ・  
准教授  
研究者番号: 6 0 1 8 7 5 0 7

### (2) 研究分担者

堀 悦郎 (HORI ETSURO)  
富山大学大学院医学薬学研究部 (医学) ・  
准教授  
研究者番号: 9 0 3 1 3 6 0 0