

一側前庭障害ラットの遊泳検査法

浅井 美洋¹⁾・梅村 和夫¹⁾・河野 裕¹⁾
姜 学鈞²⁾

A New Swimming Test for Hemilateral Vestibular Disorder in Rats

Yoshihiro Asai¹⁾, Kazuo Umemura¹⁾, Yutaka Kohno¹⁾
Xuejun Jiang²⁾

¹⁾ Department of Pharmacology, Hamamatsu University School of Medicine

²⁾ Department of Otolaryngology, Hamamatsu University School of Medicine

We developed a new swimming test for evaluating the degree of equilibrium dysfunction of rats with hemilateral vestibular disorder. The behavior of swimming rats in a water bath was observed for 60 sec. When a rat sank in the water, rotating about its longitudinal axis, the observation was stopped and the time was calculated. When a rat with both ears above the water, its behavior was assessed as normal swimming; when a rat swam with one ear under water, it was considered to be abnormal swimming. The swimming score was calculated by the following formula: [the duration (seconds) of normal swimming] + 1/2x [the duration (seconds) of abnormal swimming]. We think that this new swimming test will be useful in basic pharmacological research on therapy of balance disorders.

Key words: swimming test, laboratory rat, hemilateral vestibular disorder, pharmacological evaluation

緒 言

めまいの薬理学的治療に関する基礎的研究には、再現性の良い動物モデルとその評価法の確立が必要である。しかし、実験的めまいモデルで薬効評価を行う際、小動物における一側性末梢前庭障害の程度を如何に数値化するかが問題となる。そこで今回我々は薬理学的実験に最も汎用されているラットにおいて一側性末梢前庭障害による体平衡異常を遊泳検査によりスコア化する方法を考案してみた。諸家の御批判を仰ぐべく、若干の考察を

加えてここに報告する。

方 法

(I) 一側前庭障害の作成：11週齢の Wistar 系雄性ラット（体重 240~250g）24頭を用いた。ペントバルビタール 50mg/kg の全身麻酔下に一側迷路破壊による前庭障害（5頭、迷路破壊術群）、内耳微小循環血栓による前庭障害（8頭、めまい対照群）、抗血小板薬アスピリン 10mg/kg を前投与した同障害（8頭、アスピリン投与群）をそれぞれ作成した。また3頭のラットに模擬手術を施行した（模擬手術群）。

(1) 迷路破壊術：ラットの左中耳骨胞を開放してツチ骨、キヌタ骨を除去した。さらに蝶口蓋動

¹⁾ 浜松医科大学医学部薬理学教室

²⁾ 浜松医科大学医学部耳鼻咽喉科学教室

脈を電気凝固した後、アブミ骨も除去した。電気ドリルにて前庭及び半規管膨大部を含む骨迷路を開放し、内部の膜迷路を可及的に除去した。前庭神経節や内耳道には極力侵襲を加えないよう配慮した。皮膚切開創を縫合した後、感染予防のためセフメタゾール 20mg/kg を筋注した。抗生物質投与は術後3日間続けた。

(2) 内耳微小循環血栓によるめまいモデル：Kohno, et al¹⁾の方法に倣い一側大腿静脈にカテーテルを留置し、左中耳骨胞を開放してツチ骨、キヌタ骨を除去した。卵円窓に緑色光（波長 540 nm, 照度約 600000 ルクス）を照射しながら、静脈カテーテルから光増感物質であるローズベンガルを生理食塩水に溶解させて 20mg/kg になるように 10 秒間で注入した。注入後 10 分間照射を続けて光増感反応による微小循環血栓を内耳に誘導した後、皮膚切開創を縫合した。アスピリン投与群では光照射 5 分前にヴェノピリン® 水溶液（アセチルサリチル酸として 10mg/kg の用量）をカテーテルより静注した。それ以外の操作は同様に行った。

(3) 模擬手術群：(2)と同様の手術を施行し、光増感反応による血栓誘導は行わずに皮膚切開創を縫合した。

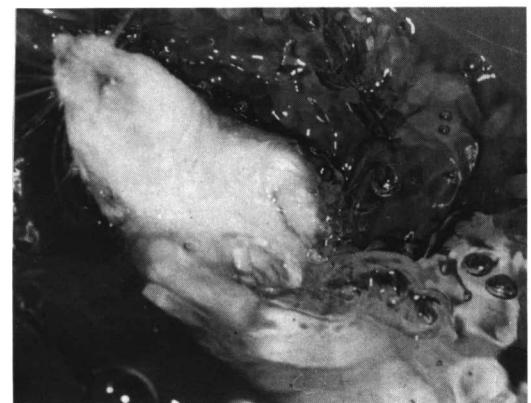
(Ⅱ) 遊泳検査による運動時平衡障害のスコア化：観察は手術後24時間の時点でおこなった。直径 40cm, 高さ 60cm の円筒形水槽に水温約 25℃ の水道水を水深約 45cm になるように満たした。背中を把持したラットを水面中央に静かに入水させ、計時器を 2 つ用いて遊泳時間の計測を開始した。水中に放たれた迷路障害のないラットは通常、若干の浮き沈みを繰り返しながらも鼻尖部及び両側耳を水面上に出して遊泳する（正常遊泳, 図 1-A）。前庭代償がある程度進んだラットや前庭障害が比較的軽度なラットは水没せずに患側耳を水面下に沈めた状態での遊泳（異常遊泳, 図 1-B）を呈するが、一側前庭障害の急性期にあるラットは水中での平衡を保てずに躯幹長軸を軸として激しく回転しながら水没してゆく（図 1-C）。本検査ではラットへの負担を考慮して観察時間を最長 60 秒間とし、60 秒以内にラットが水没した際は直ちに水中から救出して、その時点までの秒数を合計遊泳時間とした。計測は 1 個体につき 1 回のみ行った。一方の計時器で合計遊泳時間を計測しながら



A



B



C

図 1 ラットの遊泳 3 態

- A 正常遊泳：鼻尖部及び両側耳を水面上に出した遊泳。
- B 異常遊泳：患側耳を水面下に沈めた状態での遊泳。
- C 遊泳不能：躯幹長軸で回旋しながらの水没。

表1 遊泳スコアの算出

異常遊泳時間(秒)の1/2を正常遊泳時間(秒)に加えて「遊泳スコア」を求め、遊泳時平衡障害の指標とした。

遊泳スコア＝

$$\text{正常遊泳時間(秒)} + [\text{異常遊泳時間(秒)}] \times 1/2$$

ら、もう一方の計時器でラットが異常遊泳を呈する度に随時その時間を計測、加算していった。正常遊泳時間は検査終了後に合計遊泳時間から異常遊泳時間分を差し引いて求めた。表1の如き計算式より「遊泳スコア」を求め、遊泳時平衡障害の指標とした。この際、正常遊泳と異常遊泳を区別して重み付けするために異常遊泳時間を1/2倍して加えた。

(Ⅲ) 組織学的検討：めまい対照群並びにアスピリン投与群の中で、遊泳スコアがそれぞれ58, 25, 10, 5を示したラット4頭及び正常ラット1頭について組織学的検討を行った。ペントバルビタール麻酔下に生食及びホルマリン水溶液にて経口的に灌流固定し、両側の側頭骨を含めて頭蓋骨を摘出した。脱灰後パラフィン包埋し、H.E.染色を施した。標本は5μm切片に薄切して光学顕微鏡下に観察した。

結 果

(1) 遊泳スコア：図2に各群における術後24時間後の遊泳スコアの平均値を示した。模擬手術群では3頭とも遊泳スコアは60を示した。迷路破壊術群の遊泳スコアが最も低かった。次いで内耳微小循環血栓によるめまい対照群、さらにアスピリン投与群の順で平均遊泳スコアは大きくなっていった。

(2) 遊泳スコアと病理所見との相関：図3及び図4に一側内耳に血栓を誘導したラットの耳石器膜並びに半規管膨大部稜の典型的顕像を示した。それぞれ健常側(図3-A, 図4-A)と障害側(図3-B, 図4-B)に分けてある。正常像を示した健常側と比較して照射側の有毛細胞は高度に変性脱落していた。表2は各ラットの遊泳検査での計測結果と遊泳スコア並びに病理組織学的な末梢前庭器の障害度を示したものである。合計遊泳時間による評価だけではNo.2のような軽度障害例では正常ラット(No.1)と同じく60秒間泳いだことになり、軽度な異常を検出できていなかった。正常遊泳時

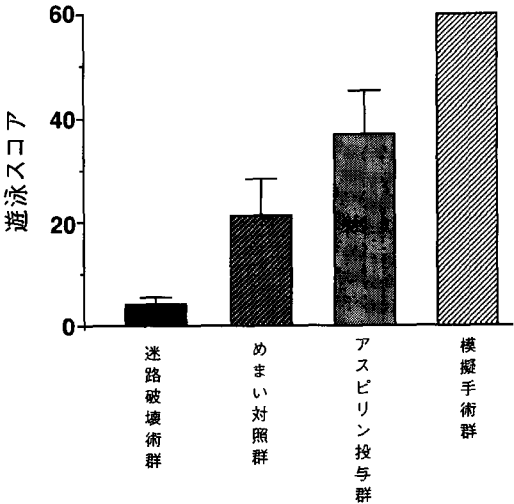


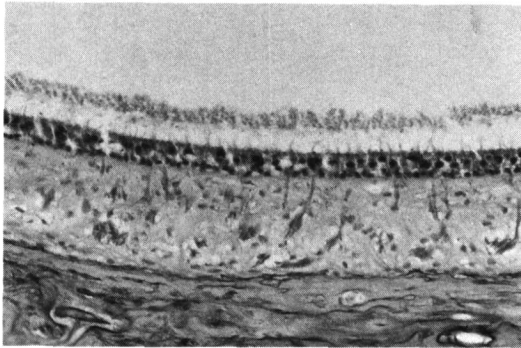
図2 遊泳スコア平均値

迷路破壊術施行群の遊泳スコアが最も低く、内耳微小循環血栓によるめまい対照群、さらにアスピリンを前投与した同群の順で平均遊泳スコアは大きくなっていった。模擬手術群では3例とも遊泳スコアは60を示した。

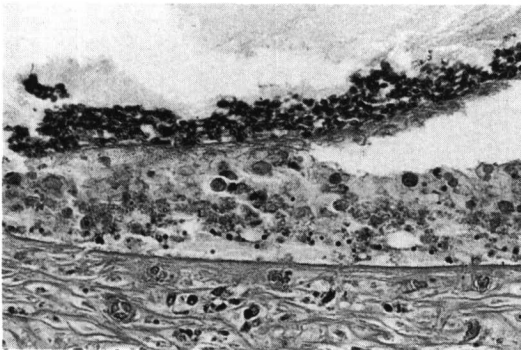
間による評価では高度障害例で差がつきにくく、また異常遊泳時間だけではむしろ逆の順位になっていた。一方、遊泳スコアによる評価では組織学的障害度と水中での平衡障害(異常回旋の程度)が概ね反映されていた。すなわち耳石器に関しては、すべての内耳障害ラットにおいて卵形嚢と球形嚢の両方が障害されていたが、特に遊泳中に異常回旋運動を呈して水没したNo.3～5のラットでは遊泳スコアの順位に半規管障害の程度が反映されていた。しかし異常回旋を呈さなかったNo.2のラットでも半規管障害を伴っていた。対照ラットでは組織学的内耳障害は認められなかった。

考 察

めまいの薬理的治療に関する基礎的研究には、実際の病態に近い実験的めまいモデルとその評価法の工夫が必要である。我々は、これまでラットにおける実験的血栓形成による内耳循環障害めまいモデル¹⁾を作成し、めまい治療薬開発への応用を図ってきた。しかしながら、このようなモデルで薬効評価を行う際、小動物の平衡障害の程度を如何に数値化するかが問題となった。一側性末梢前庭障害による平衡失調は安静時または運動時に

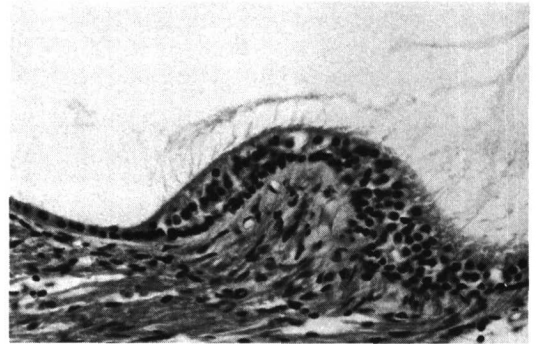


A

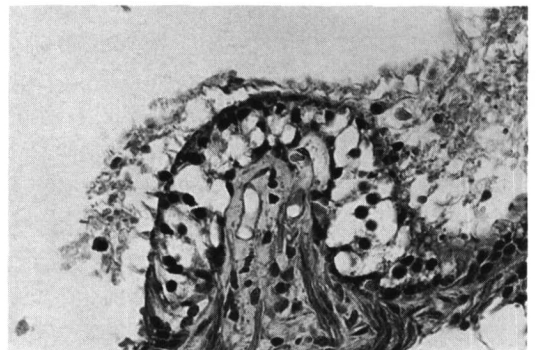


B

図3 耳石器膜の光顕像(A 健常側, B 障害側)
一側内耳に血栓を誘導したラット耳石器膜の典型的な光顕像を示した。照射側では高度に変性脱落していた。



A



B

図4 半規管膨大部の光顕像(A 健常側, B 障害側)
照射側有毛細胞の変性脱落が明らかであった。

表2 遊泳スコアと病理所見との相関

遊泳検査での計測結果並びに末梢前庭器の病理組織学的障害度を示した。遊泳スコアには組織学的障害度が概ね反映されていた。(＋；障害あり，－；障害なし)

	No.	異常回旋	遊泳所見				病理組織学的所見				
			合計遊泳(秒)	正常遊泳(秒)	異常遊泳(秒)	遊泳スコア	耳石器		半規管		
							卵形嚢	球形嚢	前半規管	後半規管	水平半規管
対 照	1	無	60	60	0	60	－	－	－	－	－
	2	無	60	56	4	58	＋	＋	－	＋	－
実験的 内 耳 障害群	3	有	43	6	37	25	＋	＋	＋	－	－
	4	有	19	1	18	10	＋	＋	－	＋	＋
	5	有	9	1	8	5	＋	＋	＋	＋	＋

現われる。自発眼振や頭部偏倚などの安静時平衡障害、言い換えれば前庭神経核静止電位の不均衡による現象はその計測が比較的容易で、ばらつき

が小さいという点でしばしば評価の対象²⁾³⁾になってきた。しかし急性前庭障害作成後24時間から48時間で速やかに代償されてしまうため、観察期間

に限られ、薬効を判定する時点で差がつきにくいという不都合な面もある。一方、運動時平衡障害、すなわち前庭反射異常の場合は、その代償に週ないしは月単位の時間を要する。これは障害後、運動時に生ずる誤った入出力を感知しながら、そのズレを補正すべく反射利得を再校正していく⁹⁾ためと考えられる。従って長期に亘る計測が可能であり、また負荷をかけた状態で計測するため、安静時よりも軽微な異常を検出できる。反面、計測のばらつきが大きくなる傾向もあるが、薬効評価の指標としては、より鋭敏で長期の観察も可能な後者の方が適していると考えた。さて、運動時体平衡障害を評価するには、まず一定の自発運動を誘発しなければならない。過去に rotating rail を用いてラットの運動時体平衡障害を定量化した報告⁹⁾もあるが、特別な装置と事前の訓練を必要とし、また試技における練習効果が混入し易いといった点でルーチンの薬効評価法として実用的とは言えない。この点、遊泳検査は水刺激によって動物に活発な自発運動を誘発でき、特別な装置や訓練を必要としない。また水中は浮力がある代わりに床反力がなく、深部知覚系や機械受容器からの入力が遮断され、体平衡異常が出現し易い環境である。以上のような理由から前庭障害に対する基礎的薬理実験の指標として今回の遊泳検査法を考案した。

遊泳検査の方法論については、モルモットでは過去にも検討されているが¹⁰⁾、我々の知る限りラットでは、まとまった方法論としての報告は見当たらない。Petrosini⁹⁾は片側迷路破壊術後モルモットに遊泳検査を行い、鼻尖部を水面上に出して遊泳できた時間を前庭代償過程の指標とした。しかし今回のような前庭障害に程度の差があるラットの遊泳を Petrosini と同様の基準、すなわち本検討で定義した合計遊泳時間で評価しても、特に障害が軽度な場合 (No.2) にはその異常を検出にくい。一方、正常遊泳時間だけでは、障害が高度な例 (No.4 と No.5) では差がつきにくくなる。そこで両者をスコアに反映させて適切に平衡障害の程度を順位化するため、異常遊泳時間を 1/2 倍して重み付けし、これを正常遊泳時間に加えることにした。その結果、前庭器の組織学的障害度が本スコアに反映され、例えば平衡障害が軽度の場合でも高度の場合でも、それらの差を検出できた。

さらに迷路破壊術群のスコアが最も低かったこと、内耳微小血栓モデルにおいて抗血小板薬を前投与した群が投与しなかった群より、スコアが低かったことも本スコアにより、一側性末梢前庭障害ラットの遊泳時体平衡障害が適切に順位化されていたことを示した。今回、異常遊泳時間の重み付けに 1/2 という数字を採用した点には議論の余地があるかもしれない。しかし、薬理学的実験に汎用されるラットにおいて簡便に運動時平衡障害をスコア化できる本法は、めまい治療のための基礎実験に有用と考えた。

結 語

一側性末梢前庭障害ラットの体平衡異常を遊泳検査によりスコア化した。検査は障害作成後24時間の時点で行い、観察時間は最長 60 秒間とした。鼻尖部及び両側耳を水面上に出した遊泳を正常遊泳、患側耳を水面下に沈めた状態での遊泳を異常遊泳とし、正常遊泳時間 (秒) に異常遊泳時間 (秒) の 1/2 倍を加えた数字を「遊泳スコア」とした。遊泳スコアには組織学的障害度が概ね反映されており、本法はめまい治療のための薬理学的基礎研究に有用と考えた。

本稿の内容の一部は第50回日本平衡神経科学会学術講演会 (横浜市) にて口演した。

文 献

- 1) Kohno Y, Umemura K, Asai Y, et al : A new model of equilibrium dysfunction induced by photochemical damage to the inner ear's microcirculation. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 249 : 283-286, 1992
- 2) Darlington CL, Smith PF : The effects of N-methyl-D-aspartate antagonists on the development of vestibular compensation in the guinea pig. *Eur J Pharmacol* 174 : 273-278, 1989
- 3) Tolu E, Mameli O : Pharmacological improvement of vestibular plasticity : Effects of a Ca^{2+} -antagonist agent. *Pharmacol Res Communications* 16 : 1161-1173, 1984
- 4) Pfaltz CR : Vestibular compensation : physiological and clinical aspects. *Acta Otolaryngol* 95 : 402-406, 1983
- 5) Clark DL : Effects of chronic 2g centrifugation on the development of vestibular compensation in the guinea pig. *Acta Otolaryngol* 95 : 407-411, 1983

gation on equilibrium behavior in the rat.
Behav Biol 12 : 509-516, 1974

- 6) Petrosini L : Task-dependent rate of recovery from hemilabyrinthectomy : An analysis of swimming and locomotor performances. Physiol Behav 33 : 799-804, 1984
- 7) 澤田 泉 : 内リンパ嚢局所免疫法による実験

的内リンパ水腫. Equilibrium Res 45 : 231-251, 1986

(原稿到着 : 平成 5 年 5 月 12 日
別刷請求先 : 浅井美洋
〒431-31 静岡県浜松市半田町3600番地
浜松医科大学医学部薬理学教室)