原 著

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

坪田 雅仁¹⁾²⁾・將積日出夫²⁾・堀 悦郎³⁾・藤坂実千郎²⁾

西条 寿夫³⁾・渡辺 行雄²⁾

Sound evoked potential around orbita in awaked monkeys

Masahito Tsubota¹⁾²⁾, Hideo Shojaku²⁾, Etsuto Hori³⁾, Michiro Fujisaka²⁾,

Hisao Nishijo³⁾, Yukio Watanabe²⁾

¹⁾*Otolaryngology, Joetsu general hospital*

²⁾*Otolaryngology, Head and Neck Surgery, Graduated School of Medicine and
Pharmaceutical Science, University of Toyama*

³⁾*System Emotional Science, Graduated School of Medicine and
Pharmaceutical Science, University of Toyama*

Intense brief sound evokes short-latency myogenic potentials around the eyes in humans. These potentials are named ocular vestibular-evoked myogenic potentials (OVEMP), but the origin and pathway of these responses remain unclear. To establish an animal model for OVEMP, we recorded sound-evoked potentials around the eyes using awake monkeys. Two macaque monkeys were used in the research. A pair of electrodes was attached under an eye, and each animal was made to gaze at the monitor with their eyes in a fixed position while sitting in a primate chair. When a 135-dB SPL air-conducted 500-Hz tone burst was applied, the peak latencies of the first negative and second positive waves were 10.4 msec and 13.7 msec. The peak latency of the first negative wave did not change when the frequency was changed. The threshold of the myogenic potentials at a frequency of 500 Hz was lowest among the 4 tested frequencies (500 Hz, 1 kHz, 2 kHz and 4 kHz). The contralateral amplitude to the sound stimulation was greater than the ipsilateral amplitude. Furthermore, the amplitude for an upward-gazing position was greater than that for a downward-gazing position. The characteristics of these potentials were similar to those of OVEMP in humans, suggesting that the sound-evoked myogenic potentials around the eyes in monkeys may be utilized as an animal model of OVEMP.

Key words: vestibular evoked myogenic potentials, macaque monkey, otolith

¹⁾ 上越総合病院耳鼻咽喉科 ²⁾ 富山大学大学院医学薬学研究部耳鼻咽喉科頭頸部外科学

³⁾ 富山大学大学院医学薬学研究部システム情動科学

はじめに

前庭誘発筋電位 (vestibular evoked myogenic potential: VEMP) は1992年のColebatchらの報告¹⁾以降広く臨床応用されている数少ない耳石器機能検査法である。VEMPの記録には、一般に強大音刺激によって誘発される胸鎖乳突筋における反応 (cervical VEMP: CVEMP) が広く用いられている。これまで、我々はCVEMPの起源や神経経路を明らかにするため、サルを用いたCVEMP動物モデルを作成し発表してきた^{2,3)}。

2005年、Rosengrenらは、外眼筋におけるVEMP (ocular VEMP: OVEMP) を報告した⁴⁾。OVEMPはCVEMPに比べ姿勢の保持や患者に要求される負担が少ない点で優れているが、起源や神経経路について未だ不明な点が多い。OVEMP発生の機序を解明するための動物モデルを作成して、起源や神経経路を検討することは、臨床的に有意義であると思われる。そこで、今回我々は、OVEMP動物モデル作成を目的に、強大音によりサルの眼窩周囲にて誘発される電位を記録したので報告する。

対象と方法

対象はニホンザル2頭 (雄1頭・雌1頭) とした。図1に実験の模式図を示す。実験に関する全ての手続きは、The Policy of the NIH Standards for Treatment of Laboratory Animals および富山大学動物実験取扱規則に準じ、富山大学動物実験委員会による審査を事前に受けたうえで行った。まず、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 (40 mg/kg, i.m.) にて無菌的に行い、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 (ベッドサイドモニター、日本光電、東京)。サル用脳定位固定装置 (成茂科学器械研究所、東京) 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蓋骨に固定した。手術終了後、サルの体調を観察しつつ、必要に応じて抗生物質 (GENTACIN Injection, 100 mg/kg, i.m., MSD 株式会社、東京) および鎮痛剤 (Pentazocine 40 mg/kg, i.m., 第一三共株式会社、

東京) 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。

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開始した。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固定用ホルダーを固定した。これにより、サル頭部を無痛的に固定する事が可能となる。さらに、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。馴化を十分に行った後、視覚刺激に対する注視課題の訓練へと移行した。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⁵⁾により行った。サルが注視を開始してから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。

十分にサルが訓練された後、誘発電位の記録へと移行した。ヒトのOVEMPと同様に、探查電極を眼窩下方、基準電極を探查電極の約5 mm下、接地電極を前額部に貼付した。音刺激および誘発電位の記録にはCVEMPの記録と同様^{2,3)}に、ニューロパックΣ (日本光電、東京) を用いた。音刺激は専用のイヤホンにてtone-burst音 (rise/plateau/fall = 1/2/1 msec) を3 Hzで呈示し、対側耳にはマスキング音としてホワイトノイズ (刺激音の-30 dB) を呈示した。誘発電位の記録では、帯域フィルタを5-1500 Hzとし、200回の反応を加算平均した。誘発電位の記録中、眼球撮影記録装置によりサルが前方のモニター上に呈示した視標を固視している事を確認した。

OVEMPの特性を調べるため、刺激と同側および対側の両側で記録を行い、誘発電位の振幅を比較した。また、刺激音周波数を500 Hz, 1 kHz, 2 kHz, 4 kHzと変化させ、周波数毎に閾値および反応潜時を測定、比較した。最大刺激音圧から5 dBずつ刺激音を減少させ、誘発電位が観察される最小刺激音圧を閾値と定義した。さらに、眼

位の影響について調べるため、前方モニター上の視標を上方および下方に呈示し、上方および下方固視時の誘発電位の振幅を比較検討した。

得られた結果に対しては一元配置分散分析法 (one-way ANOVA 検定) もしくは t 検定を用いて評価し、 $p < 0.05$ の場合に統計学的に有意差があると判定した。

結 果

図2に上方固視状態で刺激と反対側から記録したサル OVEMP の典型的な波形を示す。音刺激に対する誘発反応は2相性であり、最初に陰性成分 ($n1$) が見られその後続いて陽性成分 ($p1$) が認められた。以後の解析では、 $n1$ から $p1$ までの peak to peak を誘発電位の振幅として用いた。また、135 dB SPL の 500 Hz tone burst 刺激における平均潜時は、 $n1$ および $p1$ でそれぞれ 10.4 ± 1.16 msec および 13.7 ± 1.13 msec であった ($n = 54$)。これらの誘発反応は、2頭のサルより再現性よく記録されたので、以後に示す結果については1頭のサルを用いて行った。

まず、記録側の影響について検討した結果、135 dB SPL の 500 Hz tone burst 刺激において、刺激と対側の反応の振幅が平均 2.00 ± 0.69 μV ($n = 9$) であったのに対し、同側の反応の振幅は平均 0.69 ± 0.44 μV ($n = 9$) であり、刺激と対側の振幅が同側の振幅に比べ有意に大きかった ($P < 0.01$) (図3)。

次に、刺激音周波数に基づく誘発反応の変化を検討した。刺激音周波数を 500 Hz, 1 kHz, 2 kHz および 4 kHz と変化した場合の $n1$ 潜時は、それぞれ 10.4 ± 1.16 msec ($n = 54$)、 8.21 ± 1.06 msec ($n = 5$)、 8.36 ± 1.72 msec ($n = 4$) および 9.05 ± 1.13 msec ($n = 3$) であり、500 Hz の潜時が 1 kHz および 2 kHz の潜時に比べて有意に延長していた ($P < 0.01$ および $P < 0.05$) (図4)。また、反応閾値は 500 Hz, 1 kHz, 2 kHz および 4 kHz でそれぞれ 117 ± 9.08 dB SPL ($n = 5$)、 121 ± 10.3 dB SPL ($n = 4$)、 125 ± 6.12 dB SPL ($n = 5$) および 135 ± 0 dB SPL ($n = 5$) であり、500 Hz と 4 kHz の間に有意差を認めた ($P < 0.01$) (図5)。

最後に、記録中の視線 (眼位) が誘発電位に及ぼす影響を検討するため、記録中の視線を上方および下方に固定して誘発電位を記録した。その結果、上方視に固定した場合の振幅が平均 $3.50 \pm$

図1 本実験の模式図。サルに対してディスプレイに指標を呈示し、一定時間固視させるように訓練した後実験を行った。眼位については CCD カメラにてモニターし、音刺激および記録の反応にはニューロバックΣを用いた。

1.84 μV , 下方視に固定した場合の振幅が平均 1.64 ± 1.50 μV であり、上方視の場合の振幅が有意に大きくなった ($P < 0.01$) (図6)。

考 察

OVEMP は CVEMP と比較し、強い筋の収縮が不要なことや頸部病変のある症例にも適用できることから、近年臨床応用が進んでいる検査である。神経経路に関しては卵形囊および上前庭神経由来であるとされているが未だ不明な点も多い。以前に我々はサルにおいて CVEMP の動物モデルを作成²⁾し、CVEMP は上下前庭神経切断にて消失するが上前庭神経の選択的切断にて消失しないことを報告した³⁾。これらから CVEMP は下前庭神経由来の反応であることが強く示唆されている。今回、CVEMP と同様に OVEMP についても動物モデルの作成が可能であるかどうか検討を行ったところ、強大音刺激にてヒトの OVEMP と類似した、眼窩周囲に生じる陰性一陽性の2相性の反応を記録することができ、いくつかの特徴が認められたので考察を加える。

まず、刺激と同側に比べ、反対側で誘発電位の振幅が大きくなった。Chihara らはヒト健常者における気導 OVEMP において刺激と同側および対側の誘発反応を比較した検討を行い、反応が得られる確率は対側記録の方が高く、なおかつ振幅も対側記録の方が大きくなると報告した⁶⁾。この点、本研究で得られた反応とヒト OVEMP の性

図2 135 dB SPL, 500 Hz のトーンバースト音刺激で得られた反応。M1・M2は異なる個体から得られたものであり、いずれも左耳に音刺激を加えた場合の右側の眼窩下から得られた反応を示している。刺激開始から約8 msecに最初の陰性波が出現し、12 msec 付近に引き続き陽性成分を認めた。

質に類似していた。

2つ目に、刺激音周波数が低くなるほど反応潜時が長くなる傾向があった。これについて、Chiharaらはヒトで刺激音周波数別の OVEMP の潜時を調査しており、250 Hz にて $n1$ 潜時が 11.6 ± 0.7 msec, 500 Hz にて 11.0 ± 0.5 msec, 1000 Hz にて 10.2 ± 0.7 msec であり刺激音周波数が低くなると潜時が長くなると報告しており¹³⁾、今回の結果と一致している。但し、刺激音周波数による潜時の変化については機序が不明な点があり今後、個体数を増やして検討する必要があると考える。

3つ目に、反応の閾値が最も小さくなる音周波数(特徴周波数)が500–1000 Hz 付近にあり、音周波数が低いほど反応閾値が低くなる傾向があった。CVEMP については特徴音周波数が低く、500–1000 Hz にあることが動物実験^{2)(3)(7)–11)} およびヒト¹²⁾ で報告されている。OVEMP については Chihara らがヒト健常者12例の調査において500 Hz において最も閾値が低く、振幅が大きくなったとし¹³⁾、他にも同様の報告¹⁴⁾⁽¹⁵⁾ が散見される。今回得られた反応も500 Hz で最も閾値が低く、振幅が大きくなる傾向があり、過去のヒトでの結果に類似していた。

最後に、下方視に比べて上方視で振幅が大きくなった。Rosengren らは眼球のみを摘出した患者において OVEMP が記録されることを報告⁴⁾ し、Chihara らは外眼筋を温存した眼球摘出例、高度感音難聴例、顔面神経麻痺例でも OVEMP の記

録が可能であったと報告している¹⁶⁾。さらに、Rosengren ら⁴⁾ は、下眼瞼に電極を貼付した際には上内側を注視した際に最も振幅が大きくなり、下内側を注視した際に振幅が最も小さくなったとしている。その後も Chihara ら⁶⁾ や Govender ら¹⁷⁾ が同様の報告をしており、OVEMP の波形は音刺激と同側の場合の記録でも対側の記録の場合でも上方視の際に振幅が最も大きくなったとしており本研究の結果に一致する。Welgampola らは OVEMP の振幅は眼球を下転した際に小さくなることを報告し、これは下斜筋が弛緩した際に生じるためと考察した¹⁸⁾。以上のことから OVEMP は下斜筋由来の反応と推測されている。今回の結果でも同様に眼球を上転した際に反応が大きくなったことより、下斜筋の反応であることが推測された。

以上より本研究で得られた反応は1. 刺激側と対側記録にて反応が大きい 2. ヒト OVEMP と同様に特徴周波数が低い 3. 下方視に比べ上方視で振幅が大きい という性質を持ち、我々の作成したモデルでの記録はヒトの OVEMP と似た性質を持っていることが示唆された。

ヒト OVEMP では、気導と骨導刺激による誘発電位の記録側に違いがあると報告されている。まず、気導 OVEMP では、対側優位と考えられているが両側性である⁶⁾。一方、骨導 OVEMP では、一側前庭神経切断術後の症例において手術側と反対側の反応が消失する¹⁹⁾、CVEMP 反応残存、温度刺激検査反応が消失する上前庭神経炎患者群において、患側と反対側の反応が消失する²⁰⁾ ことから交差性の反応であると報告されている。今回、我々が作成したモデルを活用し、複数の個体で気導と骨導刺激の反応を比較することで、2種類の刺激による OVEMP の相違性を明らかにすることに役立つと考えられる。

ヒト VEMP では、気導刺激による CVEMP と OVEMP の反応に解離が認められたという報告²¹⁾ がある。そのため、これまでの臨床面での報告からは CVEMP と起源が異なる可能性が示唆されている。動物実験においては、Suzuki らがネコの卵形囊神経を刺激し同側の上斜筋および対側の下斜筋で強い収縮が得られたという報告をしている²²⁾。さらに、Curthoys らはモルモットにおいて頭部に骨導刺激を加えたところ耳石器ニューロン

図3 500 Hz, 135 dB SPL 刺激における音刺激と同側の反応および対側の反応の振幅。対側の振幅は同側に比べ有意に増大していた ($P<0.01$)

図5 異なる周波数における反応の閾値。一頭のサルにおいて、各周波数とも5回ずつ閾値を測定。刺激周波数が低くなるほど閾値が低くなる傾向を認めた。

図4 異なる刺激周波数における陰性成分の平均反応潜時。周波数により明らかな違いは認められなかった。

図6 500 Hz, 135 dB SPL 刺激における上方視と下方視の反応の振幅。上方視は下方視に比べ有意に振幅が増大していた ($P<0.01$)。

に反応を認め、半規管ニューロンには反応が認められなかったと報告した²³⁾²⁴⁾。Isu らはネコにおいて球形囊-眼反射は卵形囊および半規管-眼反射や球形囊-頸反射に比べ弱いという報告²⁵⁾をした。さらに、球形囊-眼反射の斜筋への入力、他の直筋に比べて殆ど見られないことも報告した。そのため、下斜筋由来の反応であると推定される OVEMP は球形囊由来の誘発電位である可能性が殆どない。これらの研究から、現時点では卵形囊由来で上前庭神経を経由する誘発電位であると考えられている。近年、アミノ配糖体抗生物質の投与により卵形囊を破壊したモルモットでは OVEMP が記録されなかったという報告があり²⁶⁾、今後、類似の破壊実験が行われることが予想される。OVEMP の受容器や神経経路をさらに明らかにするために本研究において作成されたモデルは役立つことが期待される。

耳石器は、重力加速度、直線加速度の受容器である。これらの刺激に対する耳石器系前庭動眼反射の周波数特性は、健常人の左右方向の直線加速度刺激実験から眼球偏位を出力とした場合に 0.25 Hz~0.5 Hz で利得が増加する²⁷⁾ことが明らかとなっており、半規管系前庭動眼反射の利得の周波数特性に比べて低いことが特徴である。一方、OVEMP は強音に対する耳石器系前庭動眼反射の1つであることが強く示唆されているおり²⁶⁾²⁸⁾、ヒト OVEMP の特徴周波数は 500-1000 Hz 付近にある可能性が報告されている^{13)~15)}。耳石器系前庭動眼反射の周波数特性が、刺激の種類により大きく異なる理由やその生理的意義については未だ明らかとなっておらず、その解明についても本研究の動物モデルが役立つことが期待される。

まとめ

強音刺激により無麻酔サル眼窩周囲で記録さ

れる誘発反応につき報告した。本反応はヒトの OVEMP と類似した反応であることが示唆され、今後、OVEMP の動物モデルとしての応用が期待される。

文 献

- 1) Colebatch JG, Halmagyi GM: Vestibular evoked myogenic potentials in human neck muscles before and after unilateral vestibular deafferentation. *Neurology* 42: 1635–1636, 1992
- 2) Tsubota M, Shojaku H, Hori E, et al.: Sound-evoked myogenic potentials on the sternocleidomastoid muscle in monkeys. *Acta Otolaryngol* 126: 1171–1175, 2006
- 3) Tsubota M, Shojaku H, Hori E, et al.: Effects of vestibular nerve section on sound-evoked myogenic potentials in the sternocleidomastoid muscle of monkeys. *Clin Neurophysiol* 118: 1488–1493, 2007
- 4) Rosengren SM, McAngus Todd NP, Colebatch JG: Vestibular-evoked extraocular potentials produced by stimulation with bone-conducted sound. *Clin Neurophysiol* 116: 1938–1948, 2005
- 5) Matsuda K, Nagami T, Kawano K, et al.: A new system for measuring eye position on a personal computer. *SF N, Abst.*, 744.2, 2000
- 6) Chihara Y, Iwasaki S, Ushio M, et al.: Vestibular-evoked extraocular potentials by air-conducted sound: Another clinical test for vestibular function. *Clin Neurophysiol* 118: 2745–2751, 2007
- 7) McCue MP, Guinan JJ: Acoustically responsive fibers in the vestibular nerve of the cat. *J Neurosci* 14: 6058–6070, 1994
- 8) McCue MP, Guinan JJ: Sound-evoked activity in primary afferent neurons of a mammalian vestibular system. *Am J Otol* 18: 355–360, 1997
- 9) Cazals Y, Aran JM, Erre JP, et al.: Acoustic response after total destruction of the cochlear receptor: brainstem and auditory cortex. *Science* 210: 83–86, 1980
- 10) Cazals Y, Erre JP, Aourousseau C: Eighth nerve auditory evoked responses recorded at the base of the vestibular nucleus in the guinea pig. *Hearing Res* 31: 93–98, 1987
- 11) Young ED, Fernandez C, Goldberg JM: Responses of squirrel monkey vestibular neurons to audio-frequency sound and head vibration. *Acta Otolaryngol* 84:352–360, 1977
- 12) 將積日出夫: 耳石機能検査としての VEMP. *Equilibrium Res* 69: 168–175, 2010.
- 13) Chihara Y, Iwasaki S, Fujimoto C, et al.: Frequency tuning properties of ocular vestibular evoked myogenic potentials. *Neuroreport* 20: 1491–1495, 2009
- 14) Todd NPM, Rosengren SM, Colebatch JG: A utricular origin of frequency tuning to low-frequency vibration in the human vestibular system? *Neuroscience Letters* 451: 175–180, 2009
- 15) Park HJ, Lee IS, Shin JE, et al.: Frequency-tuning characteristics of cervical and ocular vestibular evoked myogenic potentials induced by air-conducted tone bursts. *Clin Neurophysiol* 121: 85–89, 2010
- 16) Chihara Y, Iwasaki S, Ushio M, et al.: Ocular vestibular-evoked myogenic potentials (OVEMPs) require extraocular muscles but not facial or cochlear nerve activity. *Clin Neurophysiol* 120: 581–587, 2009
- 17) Govender S, Rosengren SM, Colebatch JG.: The effect of gaze direction on the ocular vestibular evoked myogenic potential produced by air-conducted sound. *Clin Neurophysiol* 120: 1386–1391, 2009
- 18) Welgampola MS, Migliaccio AA, Myrie OA, et al.: The human sound-evoked vestibulo-ocular reflex and its electromyographic correlate. *Clin Neurophysiol* 120: 158–166, 2009
- 19) Iwasaki S, McGarvie LA, Halmagyi GM, et al.: Head Taps evoke a crossed vestibulo-ocular reflex. *Neurology* 68: 1227–1229, 2007
- 20) Iwasaki S, Chihara Y, Smulders YE, et al.: The role of the superior vestibular nerve in generating ocular vestibular-evoked myogenic potentials to bone conducted vibration

- Fz. Clin Neurophysiol 120: 588–593, 2009
- 21) Curthoys IS, Iwasaki S, Chihara Y, et al.: The ocular vestibular-evoked myogenic potentials to air-conducted sound; probable superior vestibular nerve origin. Clin Neurophysiol 122: 611–616, 2011
 - 22) Suzuki J, Tokumasu K, Goto K.: Eye movements from single utricular nerve stimulation in the cat. Acta Otolaryngol 68: 350–362, 1969
 - 23) Curthoys IS, Kim J, Samara K, et al.: Bone conducted vibration selectively activates irregular primary otolithic vestibular neurons in the guinea pig. Exp Brain Res 175: 256–267, 2006
 - 24) Curthoys IS, Vulovic V: Vestibular primary afferent responses to sound and vibration in the guinea pig. Exp Brain Res 210: 347–352, 2011
 - 25) Isu N, Graf W, Sato H, et al.: Sacculo-ocular reflex connectivity in cats. Exp Brain Res 131: 262–268, 2000
 - 26) Yang TH, Liu SH, Young YH: Evaluation of guinea pig model for ocular and cervical vestibular-evoked myogenic potentials for vestibular function test. Laryngoscope 120: 1910–1917, 2010
 - 27) 藤野明人：正弦波直線加速度刺激による代償性眼球運動の研究—健常人耳石器眼反射の周波数特性と耳石器の機能的局在— 日耳鼻会報 90：335–347, 1987
 - 28) 時田喬, 宮田英雄, 田口拓雄, 他：ヒトの迷路性眼運動系の生理. 日耳鼻会報 79：784–797, 1976
 - 29) Curthoys IS: A critical review of the neurophysiological evidence underlying clinical vestibular testing using sound, vibration and galvanic stimuli. Clin Neurophysiol 121: 132–144, 2010
- 本研究は、平成20年度～22年度科学研究費補助金（課題番号20591975）から補助を受けて行われた。本研究は、利益相反に該当する事項なく実施された。
-
- 別刷請求先：坪田雅仁