

論文内容要旨

論文題目

Type I hair cell ablation in vestibular organs after a novel transtympanic gentamicin administration in guinea pigs

(ゲンタマイシン鼓室内投与による内耳前庭 I 型有毛細胞障害モデルの新規開発)

責任講座：耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

氏名：千葉真人

【内容要旨】(1,200 字以内)

目的

平衡感覚器である内耳前庭の感覚細胞は I 型有毛細胞、II 型有毛細胞の 2 種類が知られているが、前庭における I 型有毛細胞、II 型有毛細胞の役割は現在までのところ議論のあるところである。前庭研究を行うためのモデルとして、ゲンタマイシン (GM) 投与による前庭障害動物モデルがあり、様々な投与方法が報告されているが、これまで安定した障害方法は確立されていない。今回我々は I 型、II 型有毛細胞の機能を調べるため、難治性メニエール病の治療法として臨床応用されている GM 鼓室内投与方法に独自の改良を加え、II 型有毛細胞、支持細胞を消失させずに I 型有毛細胞のみを消失させた前庭障害動物モデルを作成することを試みた。作成した動物モデルの有用性を前庭の機能障害および形態学的障害、死亡率、体重増加量の観点から検討した。

方法

42 匹の Dunkin-Hartley 種モルモットを用いて研究を行った。モルモットは GM 暴露時間を変えた鼓室内投与群 2 群、腹腔内投与群、コントロール群の 4 群に分けた。鼓室内投与群においては麻酔下に GM 液 (40 mg/ml) を経鼓膜的に鼓室を満たすまで注入を行い 2 時間 (n=12) ないしは 6 時間 (n=12) 麻酔下に安置した。麻酔からの覚醒前に鼓室内を生理食塩水にて洗浄し、覚醒させた。腹腔内投与群は 125 mg/kg の GM を 10 間連続で腹腔内投与された (n=12)。コントロール群は処置を受けなかった (n=6)。鼓室内投与群は左耳を、腹腔内投与群とコントロール群は両耳を評価の対象とした。最終障害から 14 日目までを観察期間とし、死亡率、体重増加量、カロリックテストによる前庭機能評価を行い、ホールマウントによる卵形囊有毛細胞数カウント、半規管、卵形囊垂直切片による I 型、II 型有毛細胞数、支持細胞数カウントを行った。統計処理は one-way ANOVA を行い、多重比較法として Turkey-Kramer test を用いた。p<0.05 を有意差ありとした。

結果

鼓室内投与 2 時間群では死亡例はなかった。体重増加もコントロール群と有意差なく、全例で前庭機能障害が生じた。有毛細胞は卵形囊分水嶺付近で有意な減少がみられた (p<0.001)。また、I 型有毛細胞数は有意に減少していたが (p<0.05) II 型有毛細胞数はコントロール群と有意差がなかった。6 時間群では死亡例はなく全例で前庭機能障害が生じたがコントロール群と比べ有意に体重増加量が抑制されていた (p<0.001)。有毛細胞は卵形囊分水嶺に加え辺縁部まで有意に減少していた (p<0.001)。さらに I 型、II 型両有毛細胞数の有意な減少を認めた (いずれも p<0.001)。腹腔内投与群は死亡率が 25% と高く、生存した個体でも有意に体重増加の抑制を認め (p<0.001)、機能障害率は 75% であった。腹腔内投与群全体での機能障害作製率は 50%にとどまった。いずれの群においても支持細胞の有意な減少は認めなかった。

結論

今回の研究では、GM 鼓室内投与 2 時間曝露群において、全身的な副作用を最小限とし II 型有毛細胞、支持細胞の障害を伴うことなく I 型有毛細胞の障害を持った動物モデルの作成が可能であった。また障害時間依存性に両有毛細胞へ障害が拡大し、障害範囲も辺縁部まで拡大した。本研究のモデルは、今後の前庭における I 型有毛細胞、II 型有毛

細胞の役割を解明していく上で重要な前庭障害動物モデルになると考えられた。また、この投与方法が安定した内耳への **drug delivery system** として、難治性メニエール病に対する GM 治療の至適用量を決定するための研究に応用可能であると考えられた。

平成 29 年 1 月 13 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 千葉 真人

報告書題目： Type I hair cell ablation in vestibular organs after a novel transtympanic gentamicin administration in guinea pigs

(ゲンタマイシン鼓室内投与による内耳前庭 I 型有毛細胞障害モデルの新規開発)

審査委員：主審査委員

内藤 輝

副審査委員

藤井 聡

副審査委員

鈴木 匡子



審査終了日：平成 29 年 1 月 13 日

【 論 文 審 査 結 果 要 旨 】

内耳前庭の感覚細胞には I 型および II 型有毛細胞があるが、これらの機能の違いについては未だ明らかとなっていない。また、前庭機能を研究するために、ゲンタマイシン (GM) の種々の投与方法による前庭障害動物モデルの作成が試みられてきたが、未だ安定した障害を作る方法は確立されていない。申請者は、難治性メニエール病の治療法の一つである GM 鼓室内投与法に独自の改良を加えた方法を用いて、I 型有毛細胞のみが脱落した動物モデルの作成を試みた。

Dunkin-Hartley 種モルモット雄 4 週令 42 匹を材料とし、GM 暴露時間を変えた鼓室内投与群 2 群、腹腔内投与群、コントロール群の 4 群に分けた。鼓室内投与群では、麻酔下で GM 液 (40 mg/ml) を経鼓膜的に鼓室を満たすまで注入し、2 時間 (n=12) と 6 時間 (n=12) 安置、覚醒前に鼓室内を生理食塩水にて洗浄し覚醒させた。腹腔内投与群では、125 mg/kg の GM を 10 日間連続で腹腔内投与した (n=12)。コントロール群は無処置とした (n=6)。最終障害から 14 日目までを観察期間とし、死亡率、体重増加量、カロリックステストによる前庭機能評価を行い、ホールマウントによる卵形嚢有毛細胞数、半規管と卵形嚢垂直切片による I 型、II 型有毛細胞数、支持細胞数を調べた。統計処理は one-way ANOVA を行い、多重比較法として Tukey-Kramer test を用いた。p<0.05 を有意とした。

その結果、鼓室内投与 2 時間群では、死亡例はみられず、体重増加も抑制されず、全例に前庭機能障害が生じ、有毛細胞は卵形嚢分水嶺付近で減少 (p<0.001)、I 型有毛細胞は減少 (p<0.05)、II 型は減少しないこと、6 時間群では、死亡例はみられないものの、体重増加は抑制され (p<0.001)、全例に前庭機能障害が生じ、有毛細胞は卵形嚢分水嶺に加え辺縁部まで減少 (p<0.001)、I 型、II 型有毛細胞ともに減少すること (p<0.001)、腹腔内投与群では、死亡率 25%、体重増加は抑制され (p<0.001)、機能障害率は 75% (腹腔内投与群全体では 50%) になること、いずれの群においても支持細胞は減少しないことなどが示された。

以上の結果から、申請者は、GM 鼓室内投与 2 時間曝露により、全身的な副作用が小さく、II 型有毛細胞、支持細胞の減少脱落を伴うことなく I 型有毛細胞のみが脱落した動物モデルが作成できたと判定した。また、このモデルが、前庭における I 型、II 型有毛細胞の役割の解明に寄与する可能性などについて考察した。

本審査委員会では、審査の過程で変更となった結果の一部について論文を修正する必要があるが、新たに改良を加えた GM 鼓室内投与 2 時間曝露法が、前庭 I 型有毛細胞の脱落した動物モデルの作成に有効であることを示した点は新規であり、本研究が学位修得に十分に値すると判断した。

(1,200 字以内)