

氏 名	ディアス 茉莉
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	乙第 876 号
学位授与年月日	令和 7 年 2 月 27 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	カナマイシン局所投与による片側性難聴マウスモデルにおける、らせん神経節のマクロファージ抑制効果
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教授 吉 田 尚 弘 (委 員) 講 師 澤 城 大 悟      講 師 高 柳 友 紀

## 論文内容の要旨

### 1 研究目的

内耳性難聴では、蝸牛コルチ器の細胞死とらせん神経節の神経変性が引き起こされる。らせん神経節の細胞死まで至ると、人工内耳による聴力の回復も見込めなくなることから、らせん神経節細胞の保存は聴覚機能の維持に極めて重要である。

内耳障害がおきると、損傷された有毛細胞を標的として蝸牛内の組織マクロファージや浸潤マクロファージの遊走と集積が誘導されることが報告されている。しかし、薬剤性難聴の病態において、マクロファージが炎症促進的に働くのか、炎症収束的に働くのかはいまだに明らかになっていない。これまでの研究から蝸牛損傷時の炎症経路を制御することで、損傷した蝸牛の機能を維持できる可能性が示唆されている。そこで、我々は、薬剤性マウスモデルにおける蝸牛損傷時のマクロファージの活性化状態とらせん神経節の損傷を解析し、マクロファージを枯渇化させることによってらせん神経節および聴覚が温存されうるかどうかを検証した。

そこで、本研究では、らせん神経節におけるマクロファージの役割を検討するために、蝸牛損傷後のらせん神経節のマクロファージの活性化状態と損傷の程度を解析した。さらに、クロドロン酸配合リポソームを腹腔内投与することで全身および蝸牛内のマクロファージを枯渇化させ、らせん神経節の変性と残存聴力に対するマクロファージ減少の影響を検討した。

### 2 研究方法

カナマイシン局所投与片側難聴マウスモデルを用いて、術後 7 日の聴力とコルチ器の損傷の程度をプラセボ群と比較した。次に、らせん神経節の変性について術後 1、3、7、14、28 日目に ABR 測定および組織・免疫組織学的検証を行った。HE 染色でらせん神経節細胞の脱落の程度を比較し、ATF3 陽性細胞数と Iba1 陽性細胞数を定量化し、神経損傷とマクロファージの活性化の程度を解析した。

次に、クロドロン酸内包リポソームを投与した群とコントロールリポソームを投与した群を比較した。術後 3 日目の ATF3 陽性細胞数と、Iba1 陽性細胞の比較を行い、術後 28 日目の HE 染色によるらせん神経節細胞数と ABR 測定による聴力を比較した。

### 3 研究成果

カナマイシン局所投与片側難聴マウスモデルでは、術後 7 日目に高度難聴をきたすことが示され、HE 染色では、蝸牛基底回転で有毛細胞の脱落とコルチトンネルの破裂を認めた。らせん神経節細胞はカナマイシン投与後に脱落し、術後 28 日目には HEAD 染色で著明な減少を認めた。神経損傷のマーカーである ATF3 とマクロファージ活性のマーカーである Iba1 はいずれも術後 3 日目にピークを示した。

マクロファージを抑制するクロドロン酸内包リポソームを投与した群とコントロールリポソームを投与した群を比較したところ、ピークとなる術後 3 日目でのらせん神経節での Iba1 の発現および ATF3 の発現はクロドロン酸内包リポソームを投与した群で抑制され、術後 28 日目のらせん神経節は温存されていた。術後 28 日目の聴力は 10–15 dB 程度の限局的回復が認められた。これにより、クロドロン酸内包リポソームの神経保護効果が示唆された。

### 4 考察

本研究において、カナマイシン投与後早期にマクロファージの活性化が惹起されるとともに、ATF3 陽性の初期神経障害が認められ、遅れてらせん神経節の神経細胞死が観察されたが、この反応はクロドロン酸内包リポソーム投与によって抑制された。しかし、コルチ器と聴力は部分的にのみ回復しており、その原因として、カナマイシンを直接蝸牛に投与するモデルでは有毛細胞の神経損傷が急速に惹起され、24 時間後に投与されたクロドロン酸の効果は遅れてゆっくりとすすんだらせん神経節の変性・障害に対してのみ発現したのではないかと推察している。したがって、有毛細胞をはじめとしたコルチ器への影響を確認するためにはカナマイシン局所投与後さまざまなタイミングでクロドロン酸投与を行う検証が必要であるかもしれない。

### 5 結論

本研究において、片側カナマイシン内耳投与後に、らせん神経節の初期神経細胞損傷とほぼ同じタイミングでマクロファージの活性化が観察されたことから、らせん神経節の神経細胞とマクロファージの相互作用が示唆された。さらに、クロドロン酸内包リポソームを用いてマクロファージを薬理的に減少させると、らせん神経節は変性から保護されたことから、難聴症例に対してクロドロン酸内包リポソームなどのマクロファージ活性化抑制因子による内耳らせん神経節の保護効果の臨床応用も期待される

## 論文審査の結果の要旨

人工内耳埋込術は 蝸牛の有毛細胞の減少に伴う高度感音難聴に対して有効な方法であるが、その効果はらせん神経節細胞 (Spiral Ganglion Neuron:SGN) 数と関連する。SGN の多くを温存する治療は、人工内耳埋込による聴力回復には重要である。蝸牛には、免疫細胞であるマクロファージが脳底膜、骨性らせん膜、らせん靭帯、脈管、らせん神経節などに存在し、蝸牛環境の恒常性維持に重要な役割を果たしている。本研究では蝸牛内マクロファージの機能に注目して、カナマイシンを内耳に局所投与した薬剤性難聴モデルマウスを作成し、マクロファージの組織損傷

時の M1（炎症性/毒性系）と M2（抗炎症性/組織修復系）いずれの作用を有しているか、さらにマクロファージを抑制することで SGN の減少、蝸牛損傷を抑制し、聴力を温存することが可能かを検討した。その結果、1）薬剤性難聴においてマクロファージの内耳毒性作用があること 2）クロドロン酸抱合リポソームによるマクロファージの枯渇化によって SGN が保護され、治療のタイミングが SGN 保護には重要である可能性が示唆された。

本研究のマクロファージに作用する SGN 保護効果の新たな知見をもとに、内耳損傷時のマクロファージと神経細胞の相関する要因や経路をさらに明らかにしていくことより今後予防法の開発につながる可能性が示唆された。

令和 6 年 6 月 25 日に行われた学位審査委員会での申請者の発表に対して、以下の点が修正点として指摘された。その後、それぞれのコメントに対して回答、また学位論文の改訂があった。

1. 学位審査の講演では論理立ててわかりやすく説明されていたが、一方で、学位論文としては、背景の説明が十分でなく、主論文（Scientific Reports）に使用された内容だけでなく、可能な範囲で各実験の手技確認や条件検討で記録された予備検討データもできるだけ用いて、いかに幅広く薬剤性難聴の機能的評価や組織学的解析の系を立ち上げ、主論文での実際の適用に耐えうる基盤を整備したかを示した方が良い。
2. 研究方法に必要な内容が記載されていない点、研究方法と結果の整合性がとれない部分がある点、一部の結果が省略されていた点の改善も必要である。
3. 全体的に図や写真が小さくパネル 2-3 個/ページくらいに拡大して細部まで確認できるようにすると良い。
4. 試問で示した数々の文献紹介用の表・図も、第 5 章の考察に用いて内容を深めることが望ましいと考える。また考察では本論文の結果と結びつけるだけでなく、最新の論文や知見の内容も含めながら「内耳障害での各組織の破壊や再生」、「免疫細胞それぞれの極性変化やその関与・タイミング」、「クロドロネートや DTR 等各マクロファージ depletion モデルの効果やメカニズムの相違」「人工内耳の効果を最大化するための免疫細胞を利用した SGN 温存法や前処置とは」等に細分化して記載することも詳述を助けると考える。

＞上記 1-4 のご指摘に従って、各論で示したように変更修正を加えました。

5. P4 「内耳の解剖」を「アミノグリコシド系抗菌薬による薬剤性難聴の病態について」の前に持ってくる方が読者に病態（障害を受ける細胞・組織構造）が理解しやすいので検討してください。

＞説明の順番を入れ替えました。

6. 有毛細胞の tip link にあるチャンネルは **Mechanoelectrical Transduction Channel (MET Channel)**が英語名称ですので日本語訳が適当ではない。「有毛細胞の MET チャンネルより内リンパの  $K^+$ イオンが細胞内へ流入し有毛細胞膜の脱分極を起こし、有毛細胞の求心性神経終末より神経伝達物質（Glutamate）が放出される」と文中の記載を修正したほうが良い。

＞文中の記載を下記の通り修正しました。

「外リンパ液の振動は基底板といわれる膜状の細胞外基質を振動させ、その上にのっている音の感覚細胞である 1 列の内有毛細胞と周波数弁別や音受容の感受性に関わる 3 列の外有毛細胞およびその下にある支持細胞を揺らす。この音受容の構造をコルチ器という。有毛細胞

の不動毛が屈曲し、Mechanoelectrical Transduction Channel (MET Channel)が開口すると、内リンパ液から  $K^+$  イオンが細胞内に流入し、有毛細胞膜の脱分極を起こし、有毛細胞の求心性神経終末より神経伝達物質 (Glutamate) が放出される。有毛細胞はラセン神経（一次聴神経）とシナプスを形成している。」

7. アミノグリコシド系抗菌薬による薬剤性難聴の病態やその進行、炎症細胞浸潤の様子 (Iba1 陽性細胞) 等について分かっていることは先行論文の図等を用いてもう少し詳しく述べる事が出来るのではないか。実際の実験での評価指標に使用された項目の妥当性を示す根拠になると考える。

＞アミノグリコシド抗菌薬による薬剤性難聴の病態や進行について、下記の記載を追加しました。

「In vitro の実験では、アミノグリコシドが有毛細胞上の不動毛の MET チャネルを通して有毛細胞に浸透することが示された。また、内リンパ液から有毛細胞にアミノグリコシドが取り込まれるかどうかを検証するために in vivo で鼓室階にアミノグリコシドを添加した人工外リンパ液を灌流したモデルでは、全身投与と比較して、基底側からの有毛細胞への取り込みが大幅に減少したことから、アミノグリコシドは主に BLB を通って、血管条に到達し、そこから内リンパに排出されて有毛細胞の上部から取り込まれることが示唆された。(Li, H., and Steyger, P. S. (2011). Systemic aminoglycosides are trafficked via endolymph into cochlear hair cells. Sci. Rep. 1:159. doi: 10.1038/srep00159)」

内耳の炎症細胞浸潤について、Iba 1 を用いた実験としては、人工内耳挿入後の Iba1 陽性細胞を調べたものがあり、これを下記の通り、第 4 章の実験 3 の Iba1 の説明に追記しました。

「内耳領域の研究では、人工内耳挿入後のマクロファージの分布と出現率を検討した報告で螺旋靱帯とらせん神経節で Iba1 陽性細胞の密度が著しく高かったことが報告されており、マクロファージがこれらの特定の部位で増加していることが示唆された。(Okayasu T, Quesnel AM, O'Malley JT, Kamakura T, Nadol JB Jr. The Distribution and Prevalence of Macrophages in the Cochlea Following Cochlear Implantation in the Human: An Immunohistochemical Study Using Anti-Iba1 Antibody. Otol Neurotol. 2020 Mar;41(3):e304-e316.)」

また、LPS による急性中耳炎マウスモデルにおいて、ゲンタマイシン投与後、マクロファージ活性を Iba1 で示した文献があり、図も含めてこれを考察に追加しました。Chai Y, He W, Yang W, Hetrick AP, Gonzalez JG, Sargsyan L, Wu H, Jung TTK, Li H. Intratympanic Lipopolysaccharide Elevates Systemic Fluorescent Gentamicin Uptake in the Cochlea. Laryngoscope. 2021 Sep;131(9):E2573-E2582. doi: 10.1002/lary.29610. Epub 2021 May 6. PMID: 33956344; PMCID: PMC8453712.

8. なぜカナマイシン局所投与をモデルとして使用したのか、他難聴モデルとの経時的な差異(内耳障害→らせん神経節の神経細胞脱落の経過)を図示することで本モデルの特徴(長所・短所)が明確になるのではないか。

＞全身投与モデルと局所投与モデルを直接比較した報告はないが、局所投与モデルでは、より完全な内耳障害が示されており、これに関する文献を下記の通り追記しました。「モルモットの内耳にカナマイシンとフロセミドを局所投与した実験では、局所投与による有毛細胞の損失とらせん神経節の変性が特に蝸牛の基底回転で顕著に確認されており、薬剤が基底回に

作用していると考えられている。全身投与モデルでは聴覚喪失が不完全であったり、可逆的であったりする一方、局所投与モデルでは安定して、不可逆的な難聴モデルを作成することが可能であることが示された。(Bako P, Gerlinger I, Wolpert S, Müller M, Löwenheim H. The ototoxic effect of locally applied kanamycin and furosemide in guinea pigs. *J Neurosci Methods*. 2022 Apr 15;372:109527. doi: 10.1016/j.jneumeth.2022.109527. Epub 2022 Feb 17. PMID: 35182603.)」

また、投与経路の違いによる差異を図示しました。Alec N. Salt, Stefan K. Plontke; Principles of Local Drug Delivery to the Inner Ear. *Audiol Neurotol* 1 November 2009; 14 (6): 350–360. <https://doi.org/10.1159/000241892>

さらに、実臨床と局所投与モデルのところでも考察で追記しました。

9. P5-6「内耳の免疫応答とマクロファージ」では先行論文でこういったマーカーでそれぞれらせん神経節・血管条・らせん板縁等に分布しているマクロファージが見えているのか図示することでこちらも実際の実験での評価指標に使用された画像・マーカーの妥当性を示す根拠になると考える。

＞シスプラチンをマウスに腹腔内投与したモデルで、multiplex immunohistochemistry (mIHC)技術を用いて、蝸牛内のマクロファージを多重免疫染色し、マクロファージの分類とその分布を示したものが報告されている。この文献の内容を図示しました。

Bedeir MM, Ninoyu Y, Nakamura T, Tsujikawa T, Hirano S. Multiplex immunohistochemistry reveals cochlear macrophage heterogeneity and local auditory nerve inflammation in cisplatin-induced hearing loss. *Front Neurol*. 2022 Oct 20;13:1015014.

また、フラクタルカインのところでもマクロファージマーカーについて追記しました。

10. P8 1行目：アミノグリコシド薬剤の聴覚障害メカニズム追記部について

当該箇所は細菌におけるアミノグリコシドの採用機序（原核生物 30S リボゾーム）に関する記載であり、ヒト内耳（真核細胞生物）における障害作用機序とは異なります。ヒト細胞における副作用に言及するのであれば下記参考論文で報告されている聴力障害が出やすい説明：「ミトコンドリア遺伝子 1555A→G 変異によりミトコンドリア立体構造が変化し、バクテリア類似となりアミノグリコシドの結合性が強くなることにより毒性が高くなる可能性がある」に記載の内容を追記した方が文意に沿ったより正確な内容となると考える。

・ Hutchin T, Haworth I, Higashi K, Fischel-Ghodsian N, Stoneking M, Saha N, Arnos C, Cortopassi G. A molecular basis for human hypersensitivity to aminoglycoside antibiotics. *Nucleic Acids Res* 21:4174-4179, 1993.

・ Cortopassi G, Hutchin T. A molecular and cellular hypothesis for aminoglycoside-induced deafness. *Hear Res* 78: 27-30, 1994.

＞追記いたしました。

11. P14、聴力測定結果はまとめの折れ線グラフだけでなく実際の代表的 ABR 波形があると説得力が増すと考ええる。

＞代表的 ABR 波形を追加しました。

12. P15、“基底部の上皮のほとんどは強く損傷されていたが、頂回転および中回転の上皮は、蝸牛によって損傷の程度が異なる傾向があった（データは示さず）。”との記載があるが、可能であればデータを加えると良い。

＞申し訳ありません。結論を出せるほどのデータが揃っておりませんでした。

13. P18 実験3結果、らせん神経節の Iba1 陽性細胞の活性化について形態から言及するのであれば Cells. 2021 Aug 28;10(9):2236. doi: 10.3390/cells10092236.等、reference を示すべきである。

＞ご指摘ありがとうございます。アメーバ状に細胞体が大きくなっていたことを追記し、リファレンスを示しました。

14. 「アミノグリコシド系抗菌薬による薬剤性難聴の病態について」のなかで、薬剤性難聴モデルにおけるカナマイシンの作用点について明確にした方が良い。提出された論文の背景に関する記載では、どこまでがカナマイシンの効果なのかが不明瞭である。審査会の質疑では、「カナマイシンは有毛細胞の変性のみダイレクトに効果があり、それに続くらせん神経節の変性とマクロファージの集積は有毛細胞の変性によって二次的に起こったことである」とのことであったが、先行論文を示して現在わかっているところまでの機序を記載したほうが良い。

＞第1章「アミノグリコシド系抗菌薬による薬剤性難聴の病態について」の中で、先行文献からわかっていることを追記しました。カナマイシンは有毛細胞を障害し、その結果、二次的にらせん神経節の変性がおきることを明記し、参考文献を追加しました。

15. カナマイシンは「実際に耳毒性があるから」ということではなく、他の臓器に比べて内耳に集積しやすい性質があるのか排出されにくい性質があるのか、先行論文の結果の記載があると良い。また、臨床で末梢に連続投与した場合に耳に到達するカナマイシンの濃度と今回マウスに局所投与している量の妥当性はどうか。

＞カナマイシンは他の臓器に比べて内耳に集積しやすい性質があることがわかっており、下記の記載を追加しました。

「カナマイシンは内耳の有毛細胞や腎臓の近位尿細管細胞に特異的に取り込まれやすく、これらの細胞は他の細胞に比べてアミノグリコシドを長期間保持する性質をもっている。これは、これらの細胞が高い代謝活性をもち、イオンチャネルやエンドサイトーシスを介した薬物の取り込みが活発であることに起因している。(Jiang M, Karasawa T, Steyger PS.

Aminoglycoside-Induced Cochleotoxicity: A Review. Front Cell Neurosci. 2017 Oct 9;11:308. doi: 10.3389/fncel.2017.00308. PMID: 29062271; PMCID: PMC5640705.)」

また、カナマイシンの投与方法別の耳内に到達するカナマイシンの濃度について比較検討した報告はみつけれませんでした。その理由として、そもそも、リンパ液内の薬物濃度を経時的に検討することは技術的に難しいことが挙げられます。経時的に繰り返しサンプルを採取するなどした場合、CSF を蝸牛に引き込むことになり、薬物濃度の減少に寄与してしまいます。微小透析法を用いた研究でも同様に微小透析法自体が排泄限となるため、有効な指標が得られません。 <https://doi.org/10.1159/000241892> 様々な投与経路・投与濃度・回数などのマウスの耳毒性モデルを比較した報告があり、これを追記しました。

16. 試問の際には有毛細胞にはマクロファージの集積はあまりないとのことであったが、そうなりとクロドロン酸を早期に投与しても有毛細胞の変性を免れるのは難しく、聴力機能の低下は解消できないのではないのかと考えるがどうか。また、クロドロン酸の投与によるコルチ器

の保護作用のことが議論されていたが、コルチ器の有毛細胞以外の部分にはマクロファージの集積があるという考えでよいのか。先行論文なども含めて、考察が必要である。

＞以下の記載を追加しました。これまでの報告では、蝸牛に障害がおきると、有毛細胞の喪失後に炎症および免疫応答がおこり、その後、神経変性を起こすことが示されており、また、自然免疫と獲得免疫の両方が関与している可能性が示唆されている。Rahman, M. T., Bailey, E. M., Gansemer, B. M., Pieper, A. A., Manak, J. R., and Green, S. H. (2023).

Anti-inflammatory therapy protects spiral ganglion neurons after aminoglycoside antibiotic-induced hair cell loss. *Neurotherapeutics* 20, 578–601. doi:

10.1007/s13311-022-01336-2 マクロファージはコルチ器でも有毛細胞以外の支持細胞や基底膜などに集積していることが示されており、これらの部位でのマクロファージの役割は組織修復や炎症抑制、異物や損傷細胞の除去などが主と考えられており、マクロファージの種類や集積する場所によって異なる働きをする可能性が示唆されている。したがって、マクロファージの種類に関係なくマクロファージ全体を枯渇化させてしまうクロドロン酸の働きは、逆に有毛細胞を保護する役割をしているマクロファージを除去してしまっている可能性も否定できない。

17. フラクタルカインの実験によるマクロファージの神経保護機能と、今回の実験によるマクロファージの神経毒性機能の違いについて、フラクタルカインの論文では CX3CR1 をマーカーとしたマクロファージを見ているようだが、Iba1 をマーカーとするマクロファージと同じ物を見ていると考えられるか。

＞フラクタルカインによるシグナル伝達を受けた CX3CR1 陽性マクロファージは M2 型の神経保護的に近く、Iba1 陽性マクロファージは損傷部位で強い炎症シグナルを出していることから M1 に近いと考えられます。マクロファージのマーカーについて、図をまじえて考察を加えました。

18. 図 3 の BIII-tubulin 陽性細胞数と、BIII-tubulin 陽性細胞数あたりの ATF3 陽性細胞数の結果があれば示した方が良い(今、出されている ATF3 陽性細胞数のみの結果を消す必要はない)。  
＞BIII-tubulin 陽性細胞数あたりの ATF3 陽性細胞数の結果については、残念ながらシャムのデータがありませんが、1、3、7、14、28 日目のデータを追加しました。

19. 図 3 の(e)(f)ですが、Sham のデータは入れるべきと考えるが、もしあれば示し他方が良い。また、細胞サイズについても言及するのであればサイズを測定するべきだったと思うがどうか。

＞ご指摘ありがとうございます。Iba1 については Sham のデータが残念ながらありませんでした。大変申し訳ありません。細胞サイズについてもおっしゃる通りと思います。今後の課題とさせていただきたいと思います。

20. 各実験で 1 匹あたり数えた切片の数と、最終的に計算に用いたデータは各個体の○枚分の細胞数の平均値であることを記載すべきである。

＞下記を組織解析の項に追加しました。

「細胞数のカウントは、一個体につき 4 枚の切片を無作為に抽出し、その平均値をその個体の細胞数とした。」

21. 使用した動物の匹数について、方法と結果を一致させるのが難しいため、再度書き方や間違いが無いかの見直しが必要である。方法のセクションで気づいた例を以下に示す。

① カナマイシンの蝸牛内注射で “すべてのマウス(N=25)に対して”と書いているが、この25匹で全データを出したのでか？また、プラセボ群は何匹か。

>ご指摘誠にありがとうございます。書き間違いがありましたので確認し、訂正しました。  
カナマイシン投与群 (N=4□9) + シャム手術群 (N=10) でした。

② 聴力測定で、1日目、3日目、7日目、14日目、28日目にABRを測定したと書いてあるが、そのデータがどれか分からない。どの段階で聴力が失われたのか重要なデータでデータを出せる様でしたら示すべきである。

>データを追加しました。

③ また、“聴力測定”に書かれている N=5 は上記 25 匹を 5 群に分けたと言う意味か。カナマイシン投与群なのか、sham 群なのかこれを見てもよくわからないため、わかりやすく記載すべきである。

>聴力測定は、Day1, 3, 7, 14, 28 とシャム群 (7 日目) (各 5 匹) および CL とコントロールリポソーム群のそれぞれ 3 日目と 28 日目 (各 4 匹) に行ったことをはじめに明記しました。

④ 組織解析のところで、HE 染色用に N=12 灌流固定し、免疫染色に N=24 と記載がある。まず、どの条件(術後何日)のどの群(カナマイシン or Sham)を何匹ずつ使用したのか。どの抗体染色にどの群を何匹ずつ使用したのか。また、上記①のところで N=25 に全てのマウスとあるが、それとの相関が分からない。

>組織解析で扱った検体について N を明記しました。

⑤ クロドロン酸の投与の所でも、“クロドロン酸抱合リポソーム CL (N=16)”とあるが、その後“CL またはコントロールリポソームを腹腔内投与した(各群 N=8)”という記載もあり、非常に混乱する。

→CL およびコントロールは各群 8 匹ずつで、それぞれ 3 日目、28 日目を 4 匹ずつでしたので、N=16 が誤記でした。訂正しました。

22. 本研究に用いたカナマイシンの蝸牛内投与難聴マウスモデルは、臨床的に頸静脈で投与される場合とは実際には病態として異なっている可能性もある。論文のどこかで、実験系の違いがどこまで実際の臨床の病態と相関したものとなっていると考えて良いかを記載しておいた方が良い。

>下記を追記しました。

「臨床における薬剤性難聴は通常、全身的に投与された薬剤が血流を通じて内リンパ液を通じて MET チャネルを介して有毛細胞に達し、結果として難聴をきたすことが多い。一方で、正円窓から直接注入されたアミノグリコシドは、外リンパ液を拡散し、その後内リンパ液に移行したのちに有毛細胞に取り込まれるため、局所投与では全身的な薬剤動態や毒性の影響が十分に再現できない可能性に留意する必要がある。」

「実臨床で遭遇することの多い耳毒性薬剤全身投与や外傷モデルは、安定したモデル作成が難しく、内耳を観察する目的では、健側との対比ができないことなどが制約となる。また、聴器毒性を有する局所用薬剤は少なからずあり、例えばクロルヘキシジングルコン酸エタノール (ヒビテン)、ポピドンヨード液、ピオクタニン液、ブロー液 (13% 酢酸アルミニウム溶液)、アミノグリコシド系抗菌薬 (ゲンタマイシンなど) などが挙げられる。これらの薬剤を鼓膜穿孔を伴う症例に使用し、内耳障害を発症する事例があり、日本耳科学会からも注意喚



起が出されており、本研究のモデルはこのような臨床における耳毒性薬剤の局所投与による難聴の病態に即したものである。

23. 混合性難聴」が「混合難聴」と記載されているところなど、用語表記に誤字がないか確認が必要。

＞「混合性難聴」に統一しました。ご指摘ありがとうございました。

主要論文は **Scientific Reports** に受理、掲載されており、ディアス茉莉氏は、学位論文に関する審査委員の指摘に対して丁寧に対応し、論旨が明確な新たな知見を含む修正論文を提出した。

以上の理由で、学位審査員全員一致で学位論文として相応しいものと判断し、本学位論文審査は合格と判断した。

## 試問の結果の要旨

蝸牛には、免疫細胞であるマクロファージが脳底膜、骨性らせん膜、らせん靭帯、脈管、らせん神経節（SGN）などに存在し、蝸牛環境の恒常性維持に重要な役割を果たしている。蝸牛内マクロファージの機能に注目して、カナマイシンを内耳に局所投与した薬剤性難聴モデルマウスを作成し、マクロファージの作用、さらにマクロファージを抑制することでSGN、蝸牛損傷を抑制し、聴力を温存することが可能かを検討した本研究について、研究方法、結果、考察、今後の課題について発表がなされた。

この発表について以下の質問があった。

1. カナマイシン局所投与モデルをマクロファージ遊走に関する本研究に用いた理由は何か カナマイシン投与量・濃度はどのように設定したのか ABR の結果の解釈について
2. 臨床で行われるカナマイシンの全身投与と本研究の鼓室内投与で投与方法による差はないのか
3. カナマイシン難聴の進行や病態、特に蝸牛（有毛細胞、SGN）での障害部位、特徴は何か
4. 炎症細胞浸潤の様子（Iba1 陽性細胞）についてわかっていること、結果の解釈について
5. フラクタルカインの実験によるマクロファージの神経保護機能と、今回の実験によるマクロファージの神経毒性機能の違いについて、フラクタルカインの論文では CX3CR1 をマーカーとしたマクロファージを見ているが、Iba1 をマーカーとするマクロファージと同じ物を見ていると考えてよいのか
6. 有毛細胞にはマクロファージの集積はあまり多くないとすると、クロドロン酸を早期に投与しても有毛細胞の変性を免れるのは難しく、聴力機能の低下は解消できないと考えるが抑制効果機序はどう考えたらよいのか

以上の質問に対して、研究結果をもとに的確に回答されていた。委員より、審査・試問の発表での論旨の展開は提出されていた学位論文よりも明快となっており、試問の内容に則して学位論文を一部修正することで対応することとした。

論理的、かつ現在の科学的医学的知識に基づいて的確に質疑応答がなされており全員一致で試問は合格と判定した。